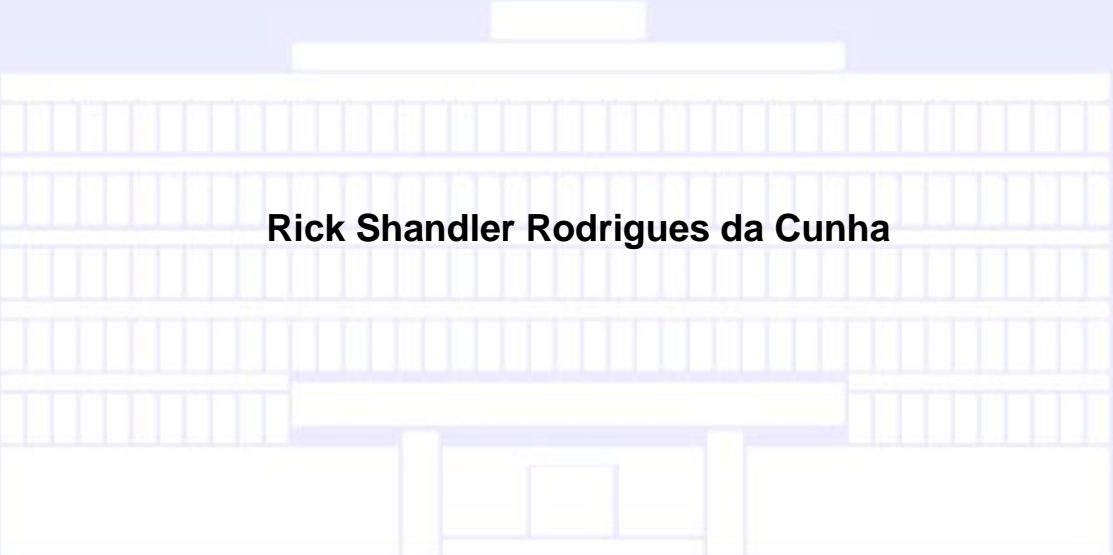


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**



**Rick Shandler Rodrigues da Cunha**

**Efeito da modulação de *NEK1* na expressão gênica da família NEK em células de glioblastoma**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre  
2022**

**Rick Shandler Rodrigues da Cunha**

**Efeito da modulação de *NEK1* na expressão gênica da família NEK em células de glioblastoma**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Dinara Jaqueline Moura

**Porto Alegre  
2022**

#### Catálogo na Publicação

Rodrigues da Cunha, Rick Shandler

Efeito da modulação de Nek1 na expressão gênica da família Nek em células de glioblastoma / Rick Shandler Rodrigues da Cunha. -- 2022.

60 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2022.

Orientador(a): Dinara Jaqueline Moura.

1. Nek. 2. Zeocina. 3. Temozolomida. 4. Glioblastoma. 5. Resposta ao dano no DNA. I. Título.

## **INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCEIRA**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. O projeto teve suporte financeiro da FAPERGS/MS/CNPq/SESRS – PPSUS.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
	1.1 Câncer.....	10
	1.1.1 Instabilidade genômica.....	11
	1.1.2 Resposta ao dano no DNA.....	12
	1.1.3 Controle do ciclo celular.....	17
	1.2 Família <i>NIMA related kinase</i> (NRK).....	18
	1.2.1 <i>Never in Mitosis A</i> (NIMA).....	18
	1.2.2 <i>NIMA related Kinases</i> (NRKs).....	19
	1.2.3 Neks.....	20
	1.2.4 Interações das Neks.....	23
	1.3 Nek1.....	24
	1.3.1 Nek1 no contexto de glioblastoma.....	25
	1.4 Análise de expressão gênica.....	27
	1.4.1 PCR em tempo real.....	27
	1.4.2 RNAseq.....	28
2.	OBJETIVOS.....	30
	2.1 Objetivo Geral.....	30
	2.2 Objetivos específicos.....	30
3.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
4.	DISCUSSÃO.....	42
5.	CONCLUSÃO.....	46
6.	REFERÊNCIAS.....	47
7.	ANEXOS.....	56
8.	CURRÍCULO LATTES.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

5'-dRP – 5'-desoxirribose fosfato

alt-NHEJ – do inglês *alternative non-homologous end-joining*

ATM – do inglês *ataxia telangiectasia mutated*

ATR – do inglês *Rad3-related protein*

BER – do inglês *base excision repair*

CDK – do inglês *cyclin dependent kinase*

DDR – do inglês *DNA damage response*

GBM – glioblastoma multiforme

GEPIA2 – *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2*

HR – do inglês *homologous recombination*

hRAD23b – do inglês *human RAD23b*

KO – do inglês *knockout*

MLH – do inglês *MutL homologs*

MMR – do inglês *mismatch repair*

MSH – do inglês *MutS homologs*

NEK – Cinases Relacionadas à NIMA

NER – do inglês *nucleotide excision repair*

NHEJ – do inglês *non-homologous end-joining*

NRK – do inglês *NIMA related kinase*

OMS – Organização Mundial de Saúde

SSA – do inglês *single strand annealing*

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TFIIH – do inglês *transcription factor II human*

TMZ – temozolomida

XPC – do inglês *xeroderma pigmentosum, complementation group C*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Os *Hallmarks* do câncer. Fonte: adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011 11
- Figura 2 – Tipos de dano ao DNA e vias de reparo ativadas. Fonte: adaptado de Hoeijmakers, 2001 16
- Figura 3 – As principais funções das Neks. Fonte: adaptado de Meirelles et al., 2014 22

## RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum e agressiva de tumor cerebral primário em adultos. O tratamento pouco efetivo com radioterapia e temozolomida (TMZ) traz a necessidade de busca por novas terapias e alvos terapêuticos, e a Nek1, primeira proteína da família NEK descrita, é uma candidata. A proteína Nek1 tem sido descrita como alvo relevante para resposta terapêutica em GBM, sendo sua expressão correlacionada com a resistência à TMZ em pacientes. Para entender melhor a relação entre Nek1 e os demais membros da família NEK no contexto de GBM, o presente estudo fez o uso do The Cancer Genome Atlas (TCGA) e do Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) para realizar uma análise de correlação. As *NEKs* que apresentaram maior correlação nestes estudos *in silico* foram avaliadas em estudos de expressão de RNA *in vitro*, utilizando células U87 knockout (KO) para *NEK1*. A expressão destas proteínas da família NEK foram comparadas em condições de tratamento com o radiomimético zeocina e com o alquilante TMZ. *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* e *NEK11* apresentaram a maior correlação com *NEK1*. As células U87 KO de *NEK1* tratadas com zeocina apresentaram uma maior expressão de *NEK9* e *NEK11* quando comparadas com a U87 selvagem. Já o tratamento com TMZ diminuiu a expressão de *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* e *NEK11* em células U87 com KO de *NEK1*. A diminuição da expressão de *NEK4* foi a única que persistiu no cotratamento com zeocina e TMZ. Estes dados demonstram uma clara associação entre os membros da família NEK no contexto de GBM, devendo essa relação ser melhor investigada.

## ABSTRACT

The glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults. The ineffective treatment with radiotherapy and temozolomide (TMZ) demands new therapeutic alternatives and the NEK family protein, in particular Nek1, is a candidate. Studies have demonstrated an involvement of the Nek1 protein in TMZ resistance in patients with GBM. To understand the relation between Nek1 and the other NEK family members in the GBM context the present study applied The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) to perform a *in silico* correlation analysis. The most correlated Neks were further analyzed *in vitro*, using *NEK1* knockout (KO) U87 cells. The relative expression was evaluated following treatment with the radiomimetic zeocin and TMZ. *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* presented the higher correlation with *NEK1*. *NEK1* KO U87 cells treated with zeocin presented an increased expression of *NEK9* and *NEK11* compared to wild-type U87. Treatment with TMZ decreased the expression of *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* in *NEK1* KO U87 cells. *NEK4* decreased expression was the only one to persist in the co-treatment of zeocin plus TMZ. These data indicate a clear association between the NEK family members in a glioblastoma context that must be further investigated.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer figura entre as principais preocupações de saúde pública global. Dados anteriores a pandemia da Covid-19 mostram o câncer como a segunda causa de morte no mundo, sendo que a cada seis mortes, uma seria relacionada a esta doença. Em 2018, foram diagnosticados aproximadamente dezoito milhões de casos e cerca de dez milhões de mortes foram associadas ao câncer. A previsão da Organização Mundial da Saúde (OMS) é de que em 2040 sejam diagnosticados cerca de trinta milhões de casos, e de que uma em cada cinco pessoas desenvolva câncer antes de atingir os setenta e cinco anos de vida(1).

O câncer representa um conjunto de doenças que têm como característica primária a proliferação não controlada de células e a capacidade de invadir outros tecidos. Cada tipo de câncer, conforme o local e o tecido envolvido, apresenta suas próprias características, as quais terão repercussão na prática clínica. Todavia, por maior que seja a diferença entre os tipos de câncer, eles seguem apresentando características em comum, principalmente no que diz respeito a sua origem. Estas características comuns apresentadas pelos diferentes tipos de câncer são conhecidas pela comunidade científica como *hallmarks* do câncer(2)(Fig1).

O processo carcinogênico necessariamente passa pelo desenvolvimento desses *hallmarks*, entre os quais já estão bem estabelecidos (i) a manutenção da sinalização proliferativa, (ii) a insensibilidade a inibidores de crescimento, (iii) a resistência à destruição imune, (iv) a imortalidade replicativa, (v) a inflamação, (vi) a ativação de invasão e metástase, (vii) a indução de angiogênese, (viii) a instabilidade genômica e mutação, (ix) a evasão de apoptose e (x) a desregulação energética da célula. Os *hallmarks* compreendem características essenciais para o progresso tumoral e o desenvolvimento do câncer seja qual for o tecido. Cabe destacar que para que a célula neoplásica desenvolva cada uma dessas características ela tem que passar por uma série de alterações em seu genoma, ou seja, o processo carcinogênico pressupõe instabilidade genômica(2–4).



**Fig1.** Os *Hallmarks* do câncer. Diferentes tipos de câncer apresentam características em comum, necessárias para que haja o seu desenvolvimento, os chamados “*Hallmarks*”. O esquema ilustra os *hallmarks* já bem estabelecidos, entre os quais a “Instabilidade genômica e mutação”, considerado um *hallmark* precursor dos demais. Fonte: adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

### 1.1.1 Instabilidade Genômica

A instabilidade genômica passou a ser retratada como precursora dos demais *hallmarks* do câncer. A aquisição de cada um dos *hallmarks*, em grande parte, ocorre por mudanças no genoma das células, ou seja, mutações. Entretanto, nossa integridade genômica é garantida por um sofisticado sistema de resposta a danos no DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*), composto por diferentes vias de reparo, além de um rigoroso controle de ciclo e morte celular, capaz de impedir a progressão celular destas células com DNA alterado. Desta forma, mutações tornam-se eventos tão raros que o intrincado arranjo de mutações

encontrado em células cancerígenas seria inviável de acontecer durante o tempo normal de uma vida humana(3).

Não obstante, cerca de vinte milhões de casos novos de câncer são diagnosticados anualmente(1). Como pode haver uma incidência tão alta de câncer com uma probabilidade tão baixa de ocorrer esse complexo arranjo de mutações? Para que isso ocorra é necessário que a célula cancerígena apresente instabilidade genômica, ou seja que seus mecanismos de preservação da integridade genômica estejam de alguma forma deficitários a ponto de haver uma maior quantidade de mutações, tornando possível o arranjo de mutações necessário para o desenvolvimento dos *hallmarks*(5–8).

A hipótese da relação direta entre a instabilidade genômica e o desenvolvimento das características necessárias para a carcinogênese consolidou-se nas últimas décadas. Apesar de já estarem descritos casos específicos em que *hallmarks* são adquiridos de forma não mutacional(4,9–11), em sua grande maioria eles dependem de mutações e de instabilidade genômica. Ou seja, para haver câncer tem que haver mutação e tem que haver instabilidade genômica (5-8).

### 1.1.2 Resposta ao Dano no DNA

A preservação do material genético tem um papel chave na biologia, sendo primordial para a perpetuação da vida. Danos no DNA quando não reparados, ou quando reparados de forma incorreta, podem levar a consequências severas, como o próprio câncer(12,13). Em resposta a esse desafio, desenvolvemos evolutivamente diversas vias de reparo capazes de responder aos mais diferentes tipos de danos que o DNA possa ser exposto(12,14)(Fig2).

Cada via de reparo apresenta seus próprios mecanismos, respondendo a certos estímulos específicos. Entretanto, tipicamente elas seguem a mesma sequência: reconhecimento da lesão, amplificação do sinal e resposta celular. Podemos dividir as diferentes vias de reparo em três grandes grupos: (i) reparo direto, (ii) reparos que respondem a danos a uma das cadeias de nucleotídeos de DNA, chamados de danos de fita simples, e, (iii) reparos que respondem a danos nas duas cadeias de nucleotídeos de DNA, chamados danos de fita dupla (12,13).

Entre os mecanismos que não envolvem excisão e ressíntese de uma parte do DNA, referidos como reversão direta, podem ser inclusos a reparação dependente da luz visível de dímeros de pirimidina por fotolases, desalquilação de base por alquiltransferases suicidas específicas, desalquilação oxidativa de nucleobases N-alquiladas do anel por oxigenases de reparo de DNA e ligação direta de quebras de fita simples de DNA com terminais não modificados. Todos os outros processos de reparo de DNA envolvem degradação de pelo menos um nucleotídeo danificado seguido de ressíntese de DNA(15).

O reparo por erro de emparelhamento (MMR, do inglês *mismatch repair*) corrige erros cometidos por DNA polimerases durante a replicação, removendo nucleotídeos canônicos incorporados em desemparelhamento, bem como pequenos loops de inserção/deleção, da fita de DNA recém-sintetizada. Esta é uma via de reparo conservada ao longo da evolução, desde bactérias até os mamíferos. As proteínas humanas envolvidas com o reconhecimento desse erro são denominadas MSH (do inglês *MutS homologs*), sendo homólogas a proteína bacteriana MutS. As proteínas MSH2 e MSH6 ao reconhecerem o erro de pareamento e ligarem-se a fita de DNA recrutam MLH1 (do inglês *MutL homologs*) e PMS2, ambas homólogas da proteína bacteriana MutL. É o complexo MLH1-PMS2 que irá conduzir o reparo, ligando-se a endonucleases, helicases e exonucleases (16,17).

A via de reparo por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*) permite a remoção de bases modificadas, sendo iniciada por uma glicosilase, que cliva a ligação glicosídica que liga a lesão ao esqueleto açúcar-fosfato e gera um sítio abásico; as glicosilases monofuncionais catalisam apenas a clivagem da ligação glicosídica, enquanto as glicosilases bifuncionais também catalisam a clivagem da espinha dorsal 3' para o sítio abásico; as etapas subsequentes do BER incluem a ação de endonuclease, que incisa o esqueleto açúcar-fosfato para criar um corte com terminais 3'-OH e 5'-desoxirribose fosfato (5'-dRP), a polimerase que remove o 5'-dRP e catalisa a incorporação de nucleotídeos na posição 3'-OH e, por fim, uma ligase de DNA sela o corte para se juntar ao esqueleto de fosfato e completar o reparo(18).

Quando a extensão da lesão ao DNA chega a danificar a estrutura do DNA, provocando distorções da dupla-hélice, a via de escolha é a de Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER, do inglês *nucleotide excision repair*). Essa via de reparo se apresenta de duas formas distintas, uma que ocorre durante a transcrição, sendo chamada de reparo acoplado à transcrição, e outra independente da transcrição, chamada de reparo do genoma global. A diferença entre essas duas formas de NER está no reconhecimento da lesão. No reparo acoplado à transcrição o reconhecimento da lesão se dá pela própria RNA polimerase II, enquanto no reparo global o reconhecimento ocorre através de um complexo das proteínas XPC e hRAD23b. Em ambas formas de reconhecimento da lesão há o recrutamento do complexo proteico TFIIH, o qual é responsável por afastar as cadeias de DNA no local da lesão, permitindo que as demais proteínas do NER possam atuar, fazendo a incisão e excisão do dano bem como a síntese e ligação de uma nova fita(19,20).

Por sua vez, os danos de fita-dupla do DNA são caracterizados como os mais perigosos tipos de dano ao DNA, visto que podem levar a aberrações cromossômicas e até mesmo à morte celular. Majoritariamente, duas vias estão envolvidas com a resposta a este tipo de dano, o reparo por recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e a ligação de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end-joining*). Porém, outras vias de reparo também respondem ao dano de fita-dupla ao DNA, como é o caso da ligação de extremidades não homólogas alternativa (alt-NHEJ) e o anelamento de fita-simples (SSA, do inglês *single strand annealing*)(21).

Na HR há a correção precisa da lesão utilizando-se da cromátide irmã como referência, o que leva a manutenção da sequência de DNA. Esta via de reparo inicia pelo reconhecimento da lesão pelo complexo MRN, formado pelas proteínas MRE11, RAD53 e NBS1. Este complexo proteico facilita a atividade endonucleolítica nas extremidades da lesão e o recrutamento de ATM e RPA. ATM é uma proteína chave do processo de checkpoint do ciclo celular e atua fosforilando diversas outras proteínas de forma a dar continuidade ao processo de reparo, como é o caso da histona H2AX, cuja ação na cromatina, após fosforilação por ATM, permite o acesso das demais proteínas ao sítio de reparo. RPA, por sua vez, atua revestindo a fita-simples de DNA. É ao DNA revestido por RPA que se ligam ATR

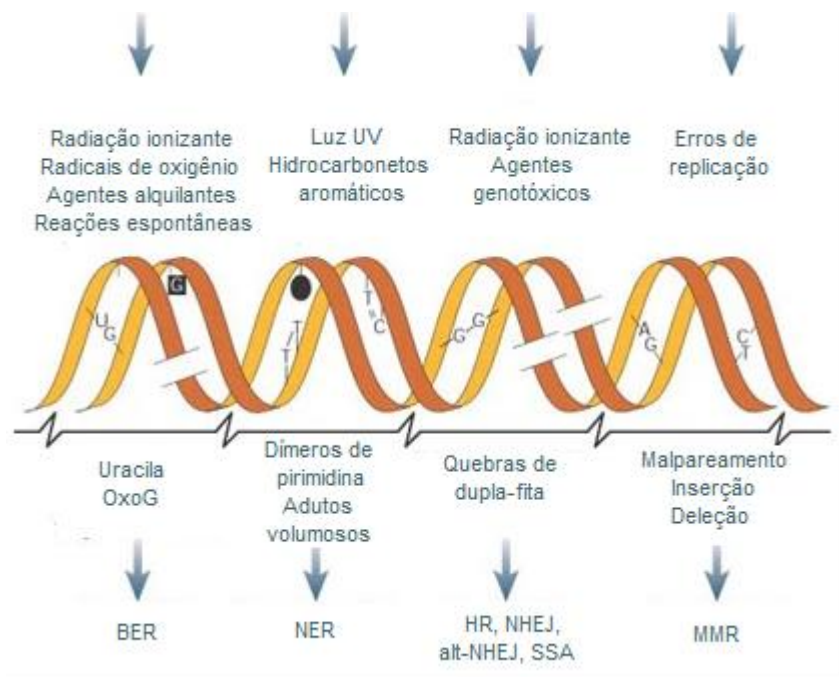
e seu parceiro de ligação ATRIP. O complexo ATR-ATRIP, assim como ATM, fosforila uma série de proteínas importantes para a DDR, como é o caso da cinase Chk1, capaz de causar a parada do ciclo celular, fundamental para o reparo. Diferente do que acontece com ATM que é diretamente ativado por MRN, ATR-ATRIP ao ligar-se a RPA não tem sua atividade cinase ativada, precisando da ação de outras proteínas para que isso ocorra. Entre estas proteínas envolvidas com a ativação de ATR-ATRIP está Nek1, foco do presente estudo. Após a atuação de ATR-ATRIP, RPA é substituído na fita-simples por Rad51 através da atuação de BRCA1 e BRCA2 entre outras proteínas mediadoras. É através de RAD51 que há a invasão da fita simples do DNA lesado na dupla-hélice do DNA intacto em busca de regiões de homologia, formando junções de Holliday. Desta forma o DNA lesado é reparado de forma fidedigna, tendo por molde a cromátide irmã(21–24).

Já no NHEJ clássico, há apenas o processamento e a religação das extremidades danificadas, levando a deleção de uma porção da sequência de DNA. Nesta via de reparo há a ligação inicial do dímero Ku70/Ku80 ao sítio da quebra, protegendo o DNA da ação de exonucleases. Ku70/ku80 também é responsável pelo recrutamento de DNA-PKcs, formando o complexo DNA-PK, o qual irá orquestrar o processamento das extremidades da lesão através da fosforilação de diferentes proteínas, como é o caso da nuclease Artemis. Ku70/Ku80 também interage com Pol  $\mu$  e Pol  $\lambda$ , de forma a incorporar os nucleotídeos necessários para o reparo. Por fim, após o alinhamento das cadeias, elas são ligadas pela DNA ligase IV, na presença da proteína Xrcc4(22–24).

Quando, por algum motivo, o NHEJ está comprometido, há a atuação do alt-NHEJ. O NHEJ alternativo funciona de forma semelhante ao clássico, havendo, contudo, algumas diferenças, como o uso de sequências de micro-homologia para o reparo. No alt-NHEJ o complexo MRN é utilizado para ressecção das extremidades da lesão, havendo ainda a atuação de PARP1, Pol  $\theta$  e Ligase III/XRCC1(21,23).

Assim como o NHEJ, o HR também apresenta vias alternativas à clássica, como é o caso do SSA. O SSA, apesar de também usar sequências de homologia, é uma via de reparo não conservativa que leva a deleções no DNA. Os primeiros passos desta via são idênticos ao HR, no entanto no lugar de haver a ligação de

Rad51 há a ligação de Rad52, a qual promove o anelamento das fitas complementares. As porções não homólogas, que acabam não se alinhando, são removidas pelo complexo XPF-ERCC1, sendo as extremidades restantes ligadas pela DNA ligase 1(21,23).



**Fig2.** Tipos de dano ao DNA e vias de reparo ativadas. Ao topo da figura observamos os agentes que mais comumente causam danos ao DNA. Ao centro estão destacados exemplos de lesões ao DNA causadas por estes agentes. Na parte inferior da figura estão elencadas as principais vias de reparo responsáveis pela remoção destas lesões. Fonte: adaptado de Hoeijmakers, 2001.

### 1.1.3 Controle do Ciclo Celular

O controle do ciclo celular é uma parte importante da DDR, estando relacionado com a instabilidade genômica; o controle do ciclo celular, assim como

toda DDR, atua de forma a manter a integridade do genoma. Alterações no ciclo celular ocorrem em resposta ao dano do DNA, preparando a célula para decidir entre iniciar uma tentativa de reparo ou iniciar um processo de senescência/morte celular programada(25).

A tomada desta decisão tem por base um complexo arranjo de sinais de transdução que atuam como verdadeiros sistemas de monitoramento do ciclo celular, sendo chamados de *checkpoints*. Os *checkpoints* do ciclo celular atuam através de vias de feedback, as quais permitem um controle preciso da transição entre as etapas do ciclo celular. Fatores de estresse, como o dano ao DNA, ativam esse sistema de monitoramento que em última instância é capaz de parar o ciclo celular, criando tempo para que toda maquinaria de reparo atue(25–27).

Os grandes atores desta regulação do ciclo celular são as Cinasas Dependentes de Ciclina (CDKs), as quais são serina/treonina cinases que atuam fosforilando diversos substratos de forma a promover o início e a regulação do ciclo celular, através da síntese de DNA e a progressão da mitose(28). A regulação destas CDKs, e por consequência do ciclo celular, se dá através do controle da síntese e proteólise de ciclina bem como na inibição direta das CDKs. Ou seja, as diferentes proteínas de *checkpoint* atuam em última instância dessa forma, ativando ou inibindo CDKs. Este é o caso das já abordadas ATM, ATR, p53, MRE11, Rad50, NBS1, Chk1, Chk2 entre outras(25,29–31).

Mutações nos genes que codificam estas proteínas de *checkpoint* são rotineiramente encontradas em células cancerígenas, acarretando um controle do ciclo celular alterado, com importantes consequências para o processo carcinogênico, bem como para a resposta a possíveis tratamentos. O estudo destas proteínas se mostra essencial, tanto para uma maior compreensão dos diferentes tipos de câncer quanto para elaboração de futuras alternativas terapêuticas(32–36).

## 1.2 Família NRK

A família de proteínas NRK (*Nima-related kinases*) compreende serina/treonina cinases envolvidas com o controle do ciclo celular. A origem do

estudo destas cinases remonta a década de 70, quando o desenvolvimento da biologia molecular permitiu avanços no estudo do ciclo celular. Um dos importantes estudos conduzidos nessa época foi o de Ronald Morris.

Morris(37) estudou diferentes mutantes de *Aspergillus nidulans* sensíveis a temperatura, classificando-os como *bim* ou *nim*. Os mutantes classificados como *bim* foram aqueles que acabaram tendo o ciclo celular bloqueado ao entrar em mitose (*blocked in mitosis*), apresentando a condensação dos cromossomos bem como a formação do fuso mitótico. Entre os genes envolvidos com essas mutações encontrou-se, por exemplo, genes que dão origem a proteínas componentes do complexo promotor de anáfase. Já os mutantes classificados como *nim* foram aqueles que jamais chegaram a entrar em mitose (*never in mitosis*), ficando parados na interfase. Entre os mutantes *nim* foram identificados vários reguladores do ciclo celular já bem descritos, como a ciclina do tipo B, a fosfatase CDC25 e DNA-polimerase. Entretanto, um resultado também interessante foi a descoberta de quatro alelos de um gene denominado *nimA*.

### 1.2.1 NIMA

Morris deu continuidade aos seus estudos durante a década de 80. Com o objetivo de obter um método para sincronizar a mitose em *A. nidulans*, o pesquisador testou cada um dos 26 mutantes *nim* previamente estudados. Desta forma, acabou descrevendo a mutação do gene *nimA*, onde o ciclo celular é bloqueado no fim de G2, imediatamente antes do início da mitose. Tanta proximidade do bloqueio com o início da mitose que foi possível observar a duplicação do corpo polar do fuso, organela equivalente ao centróssomo(38).

Utilizando-se desse modelo de sincronização, Morris conduziu uma série de estudos sobre o processo de mitose. Em 1987 seu grupo de pesquisa descreveu a expressão do gene *nimA* ao longo do ciclo celular. Nesse estudo foi demonstrado um aumento significativo nos níveis de mRNA proveniente desse gene quando a célula entra em mitose, seguido por uma queda drástica conforme a célula avança em mitose. Ademais, células bloqueadas na fase S apresentaram baixos níveis de mRNA de *nimA*, enquanto aquelas bloqueadas durante a mitose mostraram níveis elevados. O conjunto desses dados demonstrou não só haver a necessidade da

expressão de *nimA* para que a célula entre em mitose, mas também que a transcrição desse gene é cíclica e fortemente controlada, indicando que ele possui uma ação regulatória na iniciação de mitose(39).

Depois de descoberto o gene e analisada a expressão de seu mRNA foi a vez de analisar a proteína codificada pelo *nimA*. Através do sequenciamento de cDNA do gene *nimA*, Morris e seu grupo descreveram a proteína codificada como uma serina/treonina-cinase, denominada NIMA. No mesmo estudo testaram a superexpressão de *nimA*, a qual levou a uma indução de mitose, seguida de bloqueio. As células entram em mitose, mas não são capazes de sair, havendo a manutenção de cromossomos condensados e a formação de fusos aberrantes(40).

Entretanto, um dos achados mais importantes ainda estava por vir. Osmani e colaboradores(41) conduziram estudo pareando a atividade de NIMA com a de p34-cdc2, um importante regulador do ciclo celular já bem descrito pela literatura. Os resultados demonstraram que quando há mutações de *nimA* e consequentemente bloqueio do ciclo celular em G2, Cdc2 permanece plenamente ativo. Essa é apontada como a primeira circunstância em que a ativação de Cdc2 não leva a mitose. Por outro lado, os resultados também demonstraram que mutações de Cdc2 levam ao bloqueio em G2 sem interferir na ativação de NIMA. Dessa forma concluiu-se que a ativação de apenas uma dessas cinases não é suficiente para iniciar a mitose, sendo necessária a atuação de ambas. A somatória de todos esses estudos fez com que NIMA passasse a receber uma maior atenção, estabelecendo-a como uma integrante chave do processo de regulação do ciclo celular.

### 1.2.2 NRKs

Grande parte dos reguladores do ciclo celular são conservados em diferentes organismos. Considerando a relação da proteína NIMA com a regulação do ciclo, iniciou-se uma busca por cinases homólogas à NIMA, as *NIMA-related kinases* (NRKs).

Para ser classificada como uma NRK, a cinase deve apresentar uma sequência semelhante ao domínio catalítico de NIMA em sua extremidade amino-terminal, sendo que muitas das NRKs também apresentam similaridades em sua

extremidade carbóxi-terminal, não catalítica(42). Apesar de possuírem sequências similares, as NRKs apresentam diferentes funções relacionadas ao ciclo celular. Enquanto algumas atuam regulando a progressão de mitose de forma semelhante a NIMA em *A. nidulans*, outras acabam atuando em diferentes processos celulares. Essas funções podem ser divididas basicamente em 3: (i) função centriolar e regulação de mitose; (ii) função ciliar primária; (iii) reparo de dano no DNA(43).

Além de funções diferentes, as NRKs também são encontradas em quantidades diferentes nos organismos. *A. nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* expressam apenas uma NRK, as quais são denominadas respectivamente NIMA, Kin3 e Fin1. Dados sugerem haver uma relação entre o número de NRKs e a complexidade de estruturas moleculares envolvidas com a formação de cílios e flagelos no organismo. Dessa forma, a evolução da família NRK teria ocorrido em paralelo com a do aparato ciliar, visto que organismos que necessitam de um controle mais complexo dessas estruturas tiveram um aumento no número de NRKs, bem como uma diversificação em suas funções durante a evolução. Um exemplo pode ser visto com o caso extremo da *Giardia lamblia*, que expressa aproximadamente 200 NRKs. O ser humano apresenta 11 NRKs, denominadas Neks(44,45).

### 1.2.3 Neks

Foram descritas 11 Neks em humanos, denominadas Nek1 a Nek11(43). A proteína Nek1 possui uma importante relação com a doença renal policística, já bem caracterizada. Ela está localizada no citoplasma, nos cílios e no centrossomo, sendo relacionada a estabilidade e função dos cílios primários (envolvidos com a doença renal policística) e a resposta ao dano ao DNA induzido por radiação ionizante e mutagênicos químicos(47,48). Como a Nek1 é o tópico do presente estudo, ela será discutida mais detalhadamente no tópico 1.3.

A proteína Nek2 é a mais estudada, possuindo a maior similaridade com a NIMA. Esta proteína encontra-se no centrossomo e está ligada à promoção e regulação da separação dele na transição de G2 para mitose. Esta cinase também apresenta forte relação com a resposta ao dano ao DNA, sendo amplamente estudada como alvo para estratégias terapêuticas em oncologia(49,50).

Nek3 encontra-se no citoplasma e tem como suas principais funções já estabelecidas a regulação da resposta à prolactina e a desacetilização de microtúbulos em neurônios. Também está relacionada com um prognóstico ruim em diferentes tipos de câncer, como o gástrico e o de tireoide(51,52).

As Neks 4 e 5 estão entre as que possuem menos dados na literatura. A primeira encontra-se no corpo basal de cílios, estando relacionada com estabilidade de microtúbulos. Já a segunda ainda não teve sua localização dentro da célula definida, porém já é associada a diferenciação muscular esquelética e a regulação da função mitocondrial, além de já ter sido demonstrado seu envolvimento com a progressão metastática em câncer de mama(53).

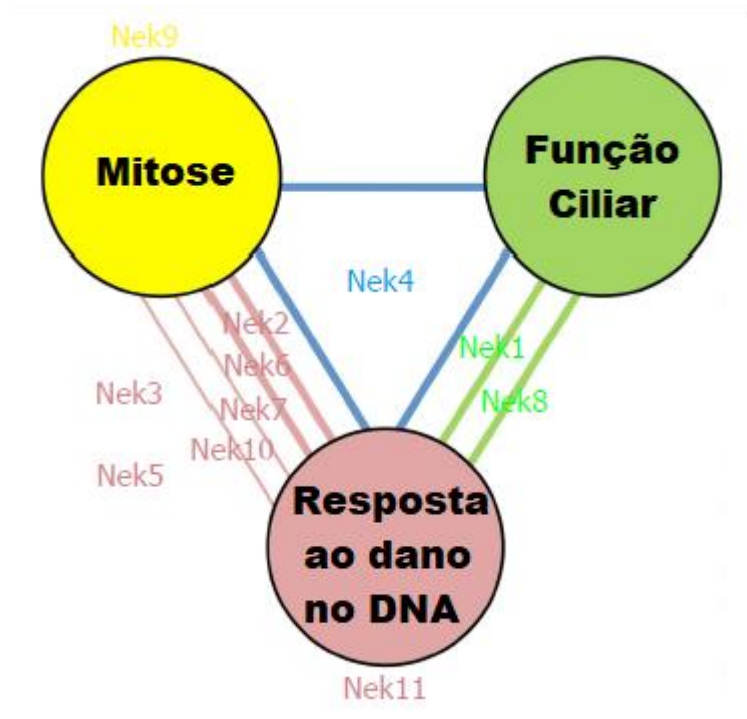
As Neks 6 e 7 são caracterizadas como as de estruturas menores e mais simples. Ambas possuem alta similaridade dentro de seu domínio catalítico, sendo encontradas nos pólos do fuso mitótico e estando relacionadas com a formação do mesmo e com a separação do centrôssomo. No contexto do câncer, já foi demonstrado também que as duas cinases apresentam aumento de expressão em carcinoma hepatocelular(54,55).

Nek8, assim como Nek1 está relacionada com a doença renal policística. Encontra-se também no centrôssomo e nos cílios, atuando na estabilidade e função dos cílios primários. Semelhante com a Nek3, a Nek8 também está associada com um mal prognóstico para pacientes com câncer gástrico(56).

Nek9 é uma das Neks de maior extensão, possuindo 979 aminoácidos. Encontra-se nos polos dos fusos, no centrôssomo e no citoplasma. Suas funções já estabelecidas são a formação do fuso mitótico e a separação dos centrôssomos. Além disso possui uma interessante relação com câncer de mama, sendo que quanto menor a sua expressão, pior o prognóstico(57).

Nek10 ainda não possui sua localização estabelecida, porém o centrôssomo é apontado como um forte candidato. Sua atuação já descrita está na resposta a dano ao DNA induzido por radiação UV. Recentemente, algumas interações importantes têm sido descobertas para esta cinase, como por exemplo o controle de p53 via fosforilação e atividade transcricional além do controle do DNA mitocondrial(58,59).

Nek11 encontra-se no núcleo e está envolvida na resposta ao dano no DNA causado por radiação ionizante. A inibição de *NEK11* provoca morte celular em câncer colorretal, já em células de câncer ovariano a diminuição da expressão de *NEK11* está associada à resistência ao tratamento(60,61).



**Fig 3.** Principais funções das Neks. Os integrantes da família NEK atuam majoritariamente em 3 processos: mitose, função ciliar e respostas ao dano no DNA. Algumas Neks estão mais associadas a um destes processos, como é o caso de Nek11 e a resposta ao dano ao DNA, outras já possuem sua atuação mais distribuída entre os 3 processos, como é o caso de Nek4. Nek1 está mais associada à função ciliar e a resposta ao dano ao DNA. Fonte: adaptado de Meirelles et al., 2014.

É importante ressaltar que somando-se as funções já estabelecidas para cada uma das Neks encontradas em humanos àquelas ainda em investigação fica evidente que praticamente todos os integrantes dessa família de cinases estão relacionados com reparo de DNA. Tal constatação serve de base a estudos que ampliam a concepção inicial de atuação das Neks apenas na regulação do ciclo

celular, estabelecendo o reparo de DNA como uma das principais funções destas cinases e tornando-as alvos ainda mais interessantes para o tratamento de câncer.

#### **1.2.4 Interações das Neks**

Diversos estudos de interação vêm elucidando detalhes importantes da relação das Neks não só com agentes já estabelecidos do ciclo celular e do reparo de DNA, mas também entre si. Membros da família NEK vêm sendo descritos em vias de sinalização e regulação relacionadas às 3 funções previamente descritas: (1) centrossomo e mitose; (2) cílios primários; (3) reparo de dano ao DNA.

A interação entre Nek9, Nek6 e Nek7 ocorre formando uma importante cascata mitótica com funções vitais para o progresso da mitose. Nek6 e Nek7 possuem alta similaridade em seus domínios catalíticos, sendo ambas ativadas por Nek9. A proteína Nek9 é capaz de fosforilar essas duas Neks em um importante sítio de suas alças de ativação (62). Ademais, a interação direta do domínio não catalítico de Nek9 com Nek6 e Nek7 é capaz de ativar alostericamente essas duas cinases, através da mudança de sua conformação auto-inibitória(63).

Outra interação já estabelecida ocorre entre Nek2 e Nek11. Nek2 autofosforilada é capaz de fosforilar Nek11, tirando-a de sua conformação inibida e ativando-a. Esse processo de ativação ocorre no núcleo, durante a parada entre G1 e S, onde Nek11 é apontada como tendo atuação relacionada ao dano ao DNA por radiação ionizante(64).

Outras Neks, apesar de não possuírem uma interação direta já descrita, atuam nas mesmas vias, podendo ainda haver interações a serem descobertas. É o caso de Nek10 e Nek11, as quais atuam no checkpoint de reparo de dano ao DNA entre G2 e mitose(65).

Nek1 e Nek8 são outro exemplo; estas cinases estão fortemente relacionadas à função dos cílios primários, sendo marcadas por seu envolvimento com a doença renal policística. Mutações nos genes dessas cinases são utilizadas em modelos animais da doença. Da mesma forma, mutações nesses genes também foram encontradas em ciliopatias humanas (47).

### **1.3 Nek1**

Nek1 foi descrita pela primeira vez como uma serina/treonina cinase em 1992. Letwin e colaboradores(66) fizeram uma triagem de bibliotecas de cDNA de camundongos com anticorpos para fosfotirosina, identificando essa cinase com um domínio catalítico 42% similar ao da NIMA. Desde sua descoberta, Nek1 vem sendo relacionada a diversos processos celulares importantes relacionados tanto à fisiologia ciliar quanto ao reparo de DNA.

Uma de suas melhores relações estabelecidas ocorre com a doença renal policística. Camundongos que não expressam Nek1 apresentam falhas durante a embriogênese, as quais levam a um tipo de doença renal policística, além de dimorfismo facial, esterilidade masculina, nanismo e anemia (67). Estudos sobre a interação de Nek1 e outras proteínas reforçam sua ligação com a doença renal policística, bem como com o reparo de DNA, uma vez que foram sugeridas interações com proteínas como tuberina, KIF3A, MRE11 e ATRX (68).

Yumai Chen e seu grupo publicaram ao longo dos últimos anos uma série de estudos descrevendo a ação de Nek1 nos processos de reparo de dano no DNA. Em um de seus primeiros estudos com Nek1, Chen mostra que Nek1 responde a danos no DNA aumentando sua atividade cinase e que células sem Nek1 funcional não são capazes de reparar seu DNA corretamente após dano induzido por radiação ionizante(69). No entanto, a resposta de Nek1 não ocorre apenas a dano causado por radiação ionizante. Danos causados por radiação ultravioleta, peróxido de hidrogênio e por uma série de quimioterápicos também acarretam realocação de Nek1 formando *foci* nucleares(48).

A forte relação com reparo de DNA já indica um importante envolvimento entre Nek1 e câncer. De forma a estreitar ainda mais essa relação, outro estudo de Chen(70) demonstra que mutações em *NEK1* levam a instabilidade cromossômica. Mais do que isso, a injeção de células com mutação em *NEK1* em camundongos leva à formação de tumores. Ainda no mesmo estudo, Chen apresentou uma coorte de um modelo animal com insuficiência haploide para *NEK1*. O resultado é impactante, 89% dos camundongos *NEK1*<sup>+/-</sup> desenvolveu tumor linfóide, alguns até mesmo com metástase.

O silenciamento de *NEK1* também tem efeitos significativos, condizentes com o descrito na literatura sobre essa cinase. Pelegri(71) demonstrou respostas

alteradas ao dano ao DNA em células com *NEK1* silenciado. Essas células apresentaram um significativo atraso no reparo ao DNA quando expostas a MMS, peróxido de hidrogênio e cisplatina. As respostas à cisplatina foram as mais significativas na ausência de Nek1. Ademais, essas células não sofrem parada de ciclo celular em G2 após serem expostas a MMS e peróxido de hidrogênio, como ocorre com as linhagens selvagens, o que sugere falha no *checkpoint* G2/M.

O conjunto de todos esses dados demonstra que a Nek1 possui papel de grande relevância nas 3 funções estabelecidas para as Neks. Nek1 atua junto aos cílios, possui diversas ligações com o reparo de DNA e é capaz de influir no ciclo celular.

Estudos recentes demonstram uma interessante relação entre Nek1 e o sistema nervoso. Um estudo publicado em 2018 demonstrou haver acúmulo de dano ao DNA em motoneurônios provenientes de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA) quando há mutações que levam à perda de função de Nek1(72). A síndrome oro-facio-digital tipo 2, conhecida como síndrome de Mohr, também possui relação descrita com *NEK1*(73). A relação entre Nek1, reparo de DNA e sistema nervoso também se estende ao desenvolvimento de câncer, sendo que a superexpressão de *NEK1* já foi descrita em gliomas(74).

### **1.3.1 Nek1 no contexto de glioblastoma**

Gliomas são os tumores primários mais comuns no sistema nervoso central de adultos, compondo uma categoria histologicamente e geneticamente heterogênea de tumores cerebrais. A atual classificação da OMS distingue os gliomas em diferentes classes levando em consideração marcadores moleculares, além dos já estabelecidos parâmetros histológicos. A OMS também classifica esses tumores em 4 graus diferentes, conforme a malignidade que apresentam (75).

Os gliomas de grau 4, também chamados de glioblastomas (GBM), além de serem os mais agressivos, são os mais comuns. Apenas 5% dos pacientes diagnosticados com esse tipo de tumor, o qual corresponde a 45% de todos gliomas, sobrevivem mais do que 5 anos(76). A agressividade dos gliomas, a ineficácia do seu tratamento e sua importante incidência trazem à tona a

necessidade de estudos na área, de forma a haver uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares dos gliomas.

Na busca por essa melhor compreensão, Zhu e seus colaboradores(74) encontraram uma interessante relação entre gliomas e Nek1. Eles não só descreveram a superexpressão de *NEK1* em diferentes tecidos de glioma humanos e linhagens celulares, mas também demonstraram correlação entre essa superexpressão e o desempenho na escala Karnofsky Performance Score (KPS), comumente utilizada para medir o comprometimento funcional dos pacientes com glioma. Além disso, correlacionaram a superexpressão de *NEK1* com uma baixa sobrevida global desses pacientes. Ao silenciar *NEK1* em linhagens celulares de glioblastoma, os pesquisadores obtiveram interessantes resultados que reforçam a relação desta cinase com o desenvolvimento dos gliomas: inibição do crescimento celular e sensibilização a temozolamida, o tratamento padrão utilizado para esse tipo de câncer.

Publicação recente do nosso grupo de pesquisa corrobora com este resultado mostrando que a inibição de Nek1 combinada com o tratamento com TMZ reduz significativamente a viabilidade de células de GBM, além de diminuir o tamanho tumoral em modelo animal(77). Dados ainda não publicados pelo nosso grupo com células de glioblastoma com knockout (KO) de *NEK1* também reforçam a relevância da modulação desta cinase no tratamento de GBM. O KO de *NEK1* em células de glioblastoma aumentou a sensibilidade a danos de DNA causados pelo tratamento com TMZ concomitante ao radiomimético zeocina (Morás et al., manuscrito em preparação). O conjunto desses dados aponta que esta cinase está relacionada com a resposta ao tratamento do glioblastoma, sendo um importante campo de estudo.

#### **1.4 Análise de expressão gênica**

Conforme o dogma central da biologia molecular, a informação contida no DNA é transcrita em moléculas de RNA, as quais serão traduzidas em proteínas que por sua vez irão desempenhar as mais diferentes funções nas células. A transcrição do DNA é um momento chave deste dogma sendo a molécula de RNA mensageiro (mRNA) um dos principais objetos de estudo da biologia molecular. A

quantificação de mRNA é uma das mais utilizadas formas de se avaliar a expressão gênica(78).

As aplicações dessa metodologia são inúmeras e diversos exemplos podem ser vistos nos tópicos anteriores. No contexto de DDR e câncer, por exemplo, a avaliação de diferenças na expressão de genes entre células cancerígenas e normais, bem como entre células tratadas e não tratadas fornece dados importantes para uma melhor compreensão da patologia e ainda é capaz de apontar possíveis candidatos a intervenção farmacológica. Atualmente, as metodologias mais usadas para a análise de expressão gênica são PCR em tempo real (qPCR) e RNAseq(78).

#### **1.4.1 PCR em tempo real**

A PCR tradicional representou um grande avanço para a biologia molecular, entretanto, por ser uma análise qualitativa era inviável para o uso em análises de expressão gênica. O advento da qPCR permitiu análises quantitativas que potencializaram os estudos de expressão gênica. A qPCR apresenta uma série de vantagens que popularizaram seu uso: é uma técnica sensível, específica, rápida, simples e robusta(78).

A quantificação se dá pela quantidade de ciclos decorridos até um estabelecido ponto mínimo de fluorescência (Ct). Quanto menor o Ct, maior a expressão gênica. Assumindo uma eficiência de 100% para a reação, cada ciclo dobra o valor de material genético na reação. Ou seja, a diferença de um ciclo representa um aumento ou diminuição de 2 vezes na expressão gênica(78).

Para comparação dos dados de forma a se obter a quantificação relativa o método mais utilizado é o do  $\Delta\Delta Ct$ . Neste método a expressão dos genes de interesse é normalizada com o um gene de referência, dando origem ao  $\Delta Ct$ . A diferença entre o  $\Delta Ct$  dos genes em análise dá origem ao  $\Delta\Delta Ct$ (78).

Entretanto, apesar das vantagens desta técnica, ela apresenta também diversas variáveis que podem interferir na qualidade dos resultados. Cuidados desde a extração do RNA até a escolha dos genes de referência devem ser tomados de forma a obter resultados mais fidedignos e reprodutíveis. Desta forma,

diretrizes com as informações mínimas para publicação de experimentos de PCR em tempo real passaram a ser adotadas(79).

#### 1.4.2 RNAseq

Com o avanço das técnicas de sequenciamento e o desenvolvimento de sequenciadores de alta performance, a análise de transcriptoma passou a ser possível. O RNAseq engloba todo RNA transcrito pela célula e sua metodologia consiste na escolha do tecido de interesse para extração do RNA, na construção de bibliotecas de cDNA e no uso de sistemas de sequenciamento de alta performance. A coleta dos dados é a parte fácil dessa metodologia. A quantidade massiva de dados gerados requer ferramentas de bioinformática apuradas para sua análise(78).

O TCGA é o maior banco de dados em câncer. Dados genômicos de mais de 11.000 indivíduos representando mais de 30 diferentes tipos de câncer são disponibilizados de forma gratuita por esta iniciativa. A qualidade e a quantidade dos dados disponibilizados têm proporcionado uma revolução no estudo do câncer(80,81). Mais uma vez, a quantidade massiva de dados, em um primeiro momento, seria um limitante para sua análise. No entanto, o projeto do TCGA engloba também a produção de ferramentas para facilitar o uso destes dados, sendo todas essas ferramentas de livre acesso. É o caso do Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2)(82).

O GEPIA2 é uma ferramenta de análise da expressão gênica de dados do TCGA. É uma ferramenta online e gratuita, que pode ser acessada no endereço <http://GEPIA2.cancer-pku.cn/index.html>. Através desta ferramenta uma série de análises pode ser realizada, como análise da diferença de expressão gênica entre tecido tumoral e normal, curvas de sobrevida, análise de correlação entre a expressão de dois genes e a detecção de genes com padrão de expressão similar(82). No presente estudo o GEPIA2 foi utilizado para a análise de correlação da expressão de *NEK1* e os demais membros da família NEK em células de glioblastoma.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a associação da expressão de *NEK1* e os demais membros da família NEK em células de glioblastoma, usando ferramentas *in silico* e *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

*In silico*

- Analisar a correlação entre *NEK1* e os demais membros da família NEK em glioblastoma através de bancos de dados de RNAseq.

*In vitro*

- Avaliar o impacto da deleção de *NEK1* na expressão relativa das Neks com maior correlação com *NEK1* em glioblastoma.

- Avaliar o impacto da deleção de *NEK1* na expressão relativa das Neks com maior correlação com *NEK1* em glioblastoma após tratamento agudo com zeocina.

- Avaliar o impacto da deleção de *NEK1* na expressão relativa das Neks com maior correlação com *NEK1* em glioblastoma após tratamento agudo com TMZ.

- Avaliar o impacto da deleção de *NEK1* na expressão relativa das Neks com maior correlação com *NEK1* em glioblastoma após cotratamento agudo com zeocina e TMZ

### 3.ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido a revista *Life Sciences*.  
<https://www.sciencedirect.com/journal/life-sciences>

#### **The effect of *NEK1* knockout on NEK family expression in glioblastoma**

Rick Shandler Rodrigues da Cunha<sup>1</sup> and Dinara Jaqueline Moura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences from Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

#### **Abstract**

The glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults. The ineffective treatment with radiotherapy and temozolomide (TMZ) demands new therapeutic alternatives and the NEK family protein, in particular Nek1, is a promising candidate. We and others have demonstrated an involvement of the Nek1 protein in TMZ resistance in patients with GBM. To understand the relation between Nek1 and the other NEK family members in the GBM context the present study applied The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPiA2) to perform an *in silico* correlation analysis. The most correlated Neks were further analyzed *in vitro*, using *NEK1* knockout (KO) U87 cells. Their relative expressions were compared under treatment with the radiomimetic zeocin and TMZ. *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* presented the higher correlation with *NEK1*. *NEK1* KO U87 cells treated with zeocin presented an increased expression of *NEK9* and *NEK11* compared to wild-type U87. Treatment with TMZ decreased the expression of *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* in *NEK1* KO U87 cells. *NEK4* decreased expression was the only one to persist in the co-treatment of zeocin plus TMZ. These data indicate a clear association between the NEK family members in the glioblastoma context that must be further investigated.

#### **Introduction**

The glioblastoma multiforme (GBM) is assigned as grade IV, the highest grade in the World Health Organization (WHO) classification of brain tumors(1). GBM is the most common and aggressive primary brain tumor in adults. The clinical management consists in surgery, radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ). Still, only 5% of GBM patients

survive more than 5 years(2). The aggressiveness of GBM and the ineffectiveness of its treatment demand the discovery of new therapeutic alternatives. In this scenario, protein kinase Nek1 appears to be a promising candidate.

Nek1 is the first member of the NEK family of kinases. This serine/threonine kinase was discovered in 1992 and presents a catalytic domain 42% similar to NIMA, a serine-threonine kinase related to mitosis in *A. nidulans*(3). Nek1 is involved in DNA damage response (DDR), particularly to the ionizing radiation induced(4–6). In the nervous system, Nek1 has already been associated with Mohr syndrome(7) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)(8). Furthermore, *NEK1* has an important relation with gliomas, being overexpressed in different glioma cell lines and associated with glioma resistance. The expression of *NEK1* is directly related to proliferation marker, tumor grade, Karnofsky performance scale, TMZ resistance and patients' poor survival(9).

The NEK family of kinases, despite low overall sequence homology, contain broadly conserved organizational features of NIMA, such as N-terminal catalytic domain, coiled-coil motifs, and PEST sequences(10). Therefore, although certain Nek kinases have unique protein domains suggesting novel functions, the regions of homology, particularly in these organizational features, bring in conserved functions related to the NIMA protein that may be shared by them. These shared conserved functions point to possible interactions in the different pathways that Nek kinases participate in(10,11).

To assess this closeness of the NEK family in the GBM context, the present study applied The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2)(12) to perform a correlation analysis between *NEK1* and the others NEK family members in glioblastoma. Further, the relative expression of the most correlated Neks was analysed in a *NEK1* knockout (KO) GBM cell treated with the radiomimetic zeocin and TMZ.

## **Materials and Methods**

### **Correlation analysis**

GEPIA2 database (<http://GEPIA2.cancer-pku.cn/index.html>) was utilized to analyse the correlation of gene expression between *NEK1* and the others 10 *NEKs* in GBM. GEPIA2 is a web resource for gene expression analysis based on the TCGA. The analysis was

performed with TCGA Glioblastoma multiforme RNA-seq dataset with 163 tumor samples, using TATA-Box Binding Protein (TGP) gene to normalize the gene expression data. Pearson correlation coefficient was used for the analysis.

### **Reagents**

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), L-glutamine, antibiotics (penicillin/streptomycin) and Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Temozolomide (TMZ) was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Zeocin was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY).

### **Cell culture**

Human GBM cell U87 MG was obtained and maintained in accordance with the protocols from American Type Culture Collection (ATCC) bank, being cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 units.mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin. The cell culture was regularly tested to ensure absence of mycoplasma. Cell identification was checked by karyotype (data not shown).

### **Plasmid and cell knockout construction**

pSpCas9 vector for co-expression with Cas9 (PX459) was purchased from Addgene. Five sgRNAs were cloned into the PX459. The sgRNA were:

5'-CACCGTTCCTATGATCTCCGCAGTT-3',

5'-CACCGACCAAACACTGCGGAGATCAT-3',

5'-CACCGCTAAAAACATTTTCGAAGTT-3',

5'-CACCGGTATTCATATTTAGCGGC-3',

5'-CACCGACAAAGCCTGCCGCTAAATA-3'.

The cells were transduced with a pool (1:1:1:1:1) of five sequences and selected by puromycin. The knockout efficiency was checked by immunoblotting and PCR.

### **Drug treatments**

Cells were treated with zeocin (200 µg/ml), TMZ (100 µM) and zeocin (200 µg/ml) plus TMZ (100 µM) for 1 hour.

### **Quantitative real-time PCR**

Total cellular RNA was extracted with PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR (q-PCR) was performed using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) with a StepOnePlus (Applied Biosystems) real-time PCR system. The relative gene expression levels were calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method. Expression of ACTB and TBP were used as internal control. A list of primers employed in this study is presented in the supplemental table.

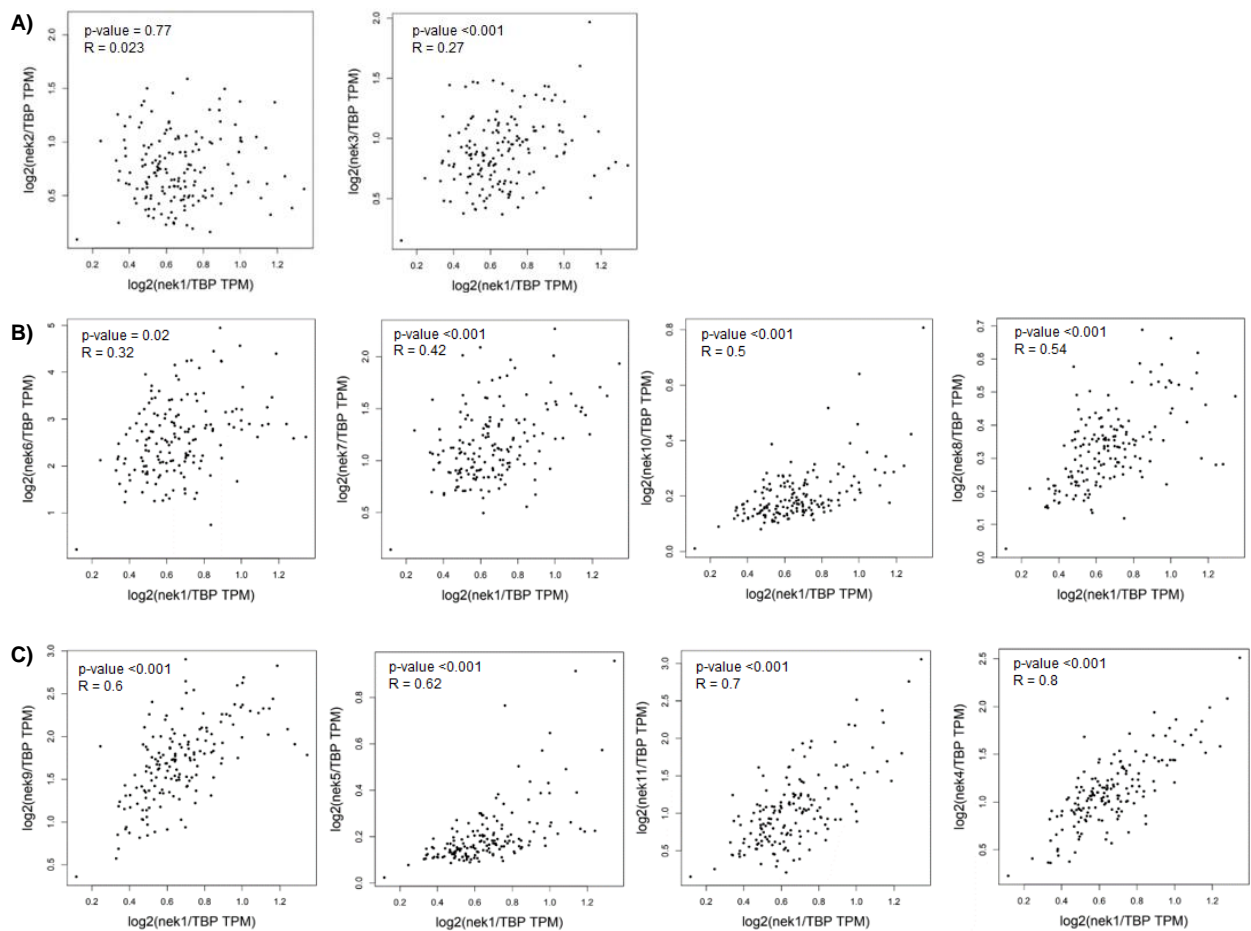
### **Statistical analyses**

Data were analysed using GraphPad Prism 6. All experiments were repeated in triplicate. The student's t-test was performed to analyse the statistical differences between U87 WT and KO groups and the data are presented as mean + SEM. Pearson correlation coefficient was applied to the correlation analysis. The non-log scale was used for calculation and the log<sub>2</sub> scale was used for visualization. Differences with  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results and Discussion**

### **Nek1 expression correlation**

The gene expression correlation analysis of *NEK1* and the others Neks in the GBM context showed different correlation patterns. Interestingly, from the weakest to the strongest, all correlations were positive. Figure 1 displays these different associations. The R value ranged from 0.023 to 0.8, characterizing from low to high correlations.



**Fig.1-** Nek1 correlation analysis with different Neks in glioblastoma. **(A)** Nek2 and Nek3 presented low correlations with Nek1. **(B)** Nek6, Nek7, Nek10 and Nek11 presented moderate correlations with Nek1. **(C)** Nek9, Nek5, Nek11 and Nek4 presented high correlations with Nek1. The relative amount of each mRNA was normalized with TBP. Pearson correlation coefficient was used for the analysis.

### Low correlation

*NEK2* and *NEK3* presented the poorest correlation with *NEK1*, showing a R value, respectively, of 0.023 and 0.27, being both low correlations (Fig1 A). *NEK2* is the closest mammalian NimA homologue, being the most studied between Neks(10). It has a well characterized function in centrosome separation regulation, being its knockdown capable of impair chromosome segregation(13). Furthermore, *NEK2* is overexpressed in multiple cancers, often predicting poor overall prognosis, and, consequently, *NEK2* inhibition is frequently researched in cancer treatments, including in the glioblastoma context(14–16). *NEK2* is significantly upregulated in glioblastoma, being its higher expression associated with poorer prognosis and its inhibition associated with growth attenuation(17).

Nek3 is one of the least studied Neks. Recent work suggests that Nek3 plays a role in important cellular processes, as in cytoskeleton and cellular motility through a prolactin-dependent signalling pathway(18,19). In cancer context, Nek3 is associated with poor prognosis in patients with gastric and thyroid cancer(20,21). Although there is no reported association between glioblastoma and Nek3, it was already found that Nek3 influences neuronal morphogenesis and polarity through microtubule acetylation(22). Unfortunately, the present correlation analysis data does not support any association between *NEK1* and *NEK2*, nor between *NEK1* and *NEK3* in GBM, which would bring interesting perspectives for further analysis.

### **Moderate correlation**

*NEK6*, *NEK7*, *NEK10* and *NEK8* presented a moderate correlation, showing a R value, respectively, of 0.32, 0.42, 0.5 and 0.54 (Fig1 B). Nek6 and Nek7 are closely related, presenting a proximity in morphology and function and being both phosphorylated by Nek9. Nek6 and Nek7 participate in cytokinesis, telomere maintenance and cell cycle regulation(23). Both have been linked to several cancers(24–27), showing high levels of expression in them, however there is no reported association with GBM or Nek1.

Nek10, as Nek3, is one of the least studied Neks. Nevertheless, studies indicated that Nek10 interacts with important DDR proteins, such as p53. These interactions lead to potential implications in oncogenesis, correlating *NEK10* mutations and different cancers, particularly breast cancer(28). Again, no correlation has been reported between Nek10 and GBM or Nek1.

Nek8 was a strong candidate to present a gene expression association with Nek1 in glioblastoma. Nek1 and Nek8, both located at cilia and centrosome, are key regulators of ciliogenesis. They have been linked with polycystic kidney disease and their mutations cause cilia-related disorders(29). In addition to the proximity in location and ciliary function, Nek8 also has a role in glioma pathogenesis, being high levels of *NEK8* expression associated with poorer prognosis(30). These data suggest a strong association between Nek8 and Nek1 that is not supported by the moderate correlation found.

### **High correlation**

The highest correlations were presented by *NEK9*, *NEK5*, *NEK11* and *NEK4*, showing,

respectively, a R value of 0.6, 0.62, 0.7 and 0.8 (Fig1 C). Nek9 has been extensively studied, presenting some interesting characteristics. As already mentioned, Nek9 phosphorylates Nek6 and Nek7, acting in the control of microtubules and regulating spindle organization and cell cycle progression(23). Nek9 is also implicated in DDR, showing an increase in its levels in response to replication stress, activating CHK1 and regulating gene expression and function of p53(31,32). *NEK9* expression is upregulated in meningiomas(33) and high levels of Nek9 in GBM increase the chances of tumour recurrence(34).

Nek5 is another understudied protein. Studies suggest that Nek5 is involved in DDR(35), centrosome integrity(36) and cancer processes(37). Moreover, Nek5 participates in the mitochondrial homeostasis through regulation of mitochondrial functions and maintenance of mtDNA(38). Although there is no relation with GBM reported yet, Nek5 shows a regulatory activity with breast cancer cells(39).

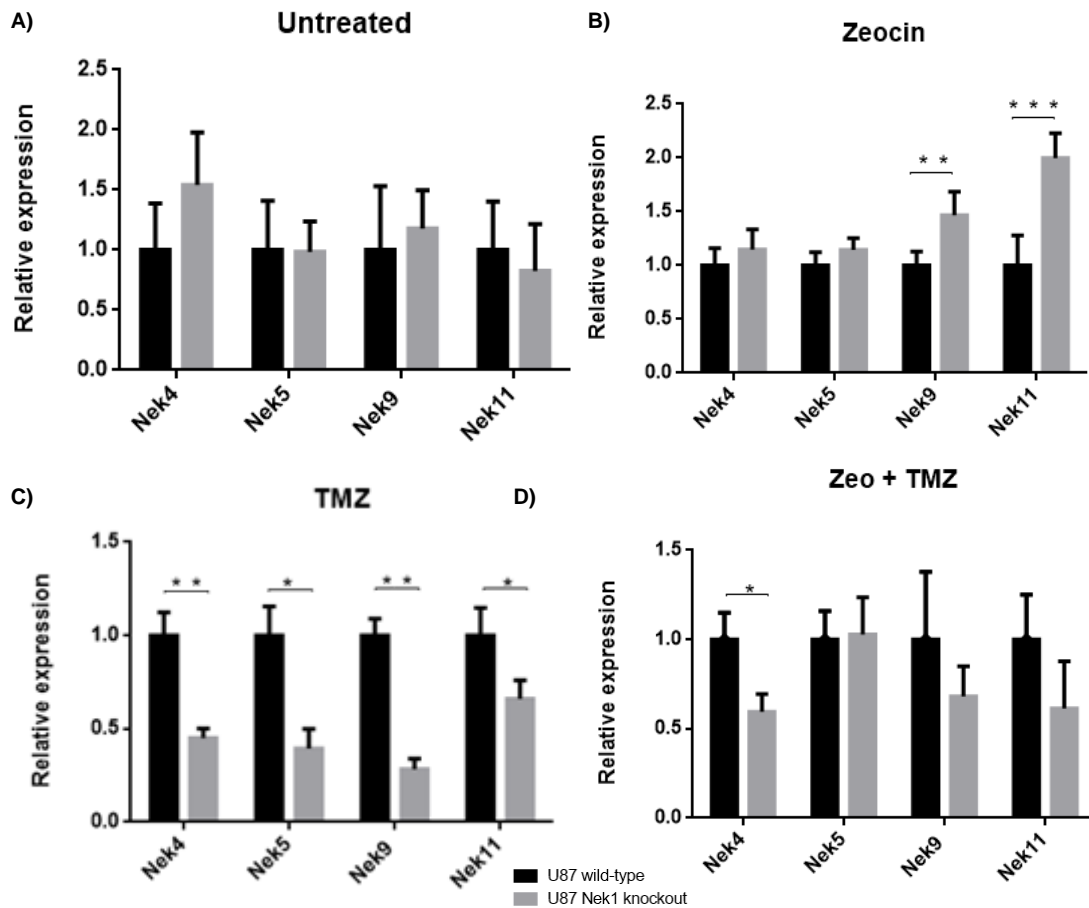
Nek11 is a DDR kinase. It is directly activated by CHK1 and regulates CDC25A in a classic IR-induced checkpoint(40). Nek11 also interacts with Nek2, a characterized DDR agent(41). The downregulation of *NEK11* is associated with drug resistance in ovarian cancer(42), while in colorectal cancer cells, loss of Nek11 reduces cell survival(43).

*NEK4* presented the highest correlation with *NEK1* in GBM. Nek4 acts in cilia dynamics, as well as Nek1, and its downregulation leads to reduced number of ciliated cells(44). Nek4 also plays a role in microtubule regulation, replicative senescence, and DDR. *NEK4* suppression delays entry in replicative senescence and leads to defective cell cycle arrest in response to DNA damage(45,46). These impairments in senescence and DDR are commonly associated with accumulation of mutations and, not surprisingly, oncogenesis. Nek4 was associated with colorectal cancer stages(47) and lung cancer metastasis(48).

### **NEK1 KO context**

The highest correlations were further analysed in the *NEK1* knockout context. Without treatment there was no difference in the expression of *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* between WT and *NEK1* KO cells (Fig2 A). Zeocin treatment led to an expression increase of *NEK9* and *NEK11* in *NEK1* KO cells compared to WT (Fig2 B). On the other hand, treatment with TMZ led to a decrease in the expression of all Neks analyzed, including *NEK9* and *NEK11*(Fig2 C). In the co-treatment of TMZ plus zeocin, only *NEK4* presented a

decreased expression in *NEK1* KO cells (Fig2 D).



**Fig.2-** The relative expression of *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* in *NEK1* KO U87 cells. (A) Relative expression of mRNA in untreated cells. (B) Relative expression of mRNA in cells treated with zeocin. (C) Relative expression of mRNA in cells treated with TMZ. (D) Relative expression of mRNA in cells treated with zeocin plus TMZ. The relative amount of each mRNA was normalised with ACTB and TBP. The significance level was represented by \*  $P < 0.01$ ; \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ .

### Limitations of the study

The present study focused on mRNA expression analysis, being required further analysis in protein expression as well as phosphorylation state for a better interpretation of the subject. Furthermore, the correlation analysis does not determine causal relationships, only showing an association between two variables.

### Conclusions and future directions

The structure proximity and the overlapping functions of the different Neks, particularly in DDR and cancer context, give rise to the search of possible interactions and associations.

This study demonstrated high correlations of *NEK1* with *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11* in GBM. Furthermore, the *NEK1* KO U87 cells showed a different expression of these Neks after treatment. Each treatment led to a different response. *NEK1* KO U87 cells treated with radiomimetic zeocin showed a higher expression of *NEK9* and *NEK11*, compared to wild-type strain. Treatment with the alkylating agent TMZ led to a decrease in the expression of *NEK4*, *NEK5*, *NEK9* and *NEK11*. *NEK4* decreased expression was the only one to persist in the co-treatment of zeocin plus TMZ. The difference between treatments is supported by their different mechanism of action and different repair pathways activated, however still intriguing. The absence of Nek1 can lead to either an increase or a decrease in the expression of others Neks, depending on treatment. These four *NEKs* that presented the highest correlation with *NEK1* are candidates to further analyses. From the poorly studied Nek4 and Nek5 until the established DDR agents Nek9 and Nek11, each one of them showed interesting results. The study of these Neks in GBM can elucidated aspects of the pathogenesis of this disease as well as its response to treatment and may point to future targets to pharmacological approaches.

#### References

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Webster JT, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;3:803–20.
2. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro Oncol.* 2014;16(7):896–913.
3. Letwin K, Mizzen L, Motro B, Ben-David Y, Bernstein A, Pawson T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J.* 1992;11(10):3521–31.
4. Polci R, Peng A, Chen PL, Riley DJ, Chen Y. NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res.* 2004;64(24):8800–3.
5. Chen Y, Chen PL, Chen CF, Jiang X, Riley DJ. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle.* 2008;7(20):3194–201.
6. Pelegri AL, Moura DJ, Brenner BL, Ledur PF, Marques GP, Henriques JAP, et al. Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis.* 2010;25(5):447–54.
7. Monroe GR, Kappen IFPM, Stokman MF, Terhal PA, Van Den Boogaard MJH, Savelberg SMC, et al. Compound heterozygous *NEK1* variants in two siblings with oral-facial-digital syndrome type II (Mohr syndrome). *Eur J Hum Genet.* 2016;24(12):1752–60.
8. Higelin J, Catanese A, Semelink-Sedlacek LL, Oeztuerk S, Lutz AK, Bausinger J, et al. *NEK1* loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in ALS patient-derived motoneurons. *Stem Cell Res [Internet].* 2018;30(May):150–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.06.005>
9. Zhu J, Cai Y, Liu P, Zhao W. Frequent *Nek1* overexpression in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2016;476(4):522–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.156>
10. Meirelles GV, Perez AM, de Souza EE, Basei FL, Papa PF, Melo Hanchuk TD, et al. “Stop Ne(c)king around”: How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. *World J Biol Chem [Internet].* 2014;5(2):141–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4050109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Bachus S, Graves D, Fulham L, Akkerman N, Stephanson C, Shieh J, et al. In Mitosis You Are Not: The NIMA

Family of Kinases in Aspergillus, Yeast, and Mammals. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7).

12. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res [Internet].* 2019 Jul 7 [cited 2022 Aug 23];47(W1):W556. Available from: [/pmc/articles/PMC6602440/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32289147/)
13. Au FKC, Hau BKT, Qi RZ. Nek2-mediated GAS2L1 phosphorylation and centrosome-linker disassembly induce centrosome disjunction. *J Cell Biol [Internet].* 2020 May 4 [cited 2022 Aug 23];219(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32289147/>
14. Lee J, Gollahon L. Mitotic perturbations induced by Nek2 overexpression require interaction with TRF1 in breast cancer cells. *Cell Cycle [Internet].* 2013 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];12(23):3599–614. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24091727/>
15. Fang Y, Zhang X. Targeting NEK2 as a promising therapeutic approach for cancer treatment. *Cell Cycle [Internet].* 2016 Apr 2 [cited 2022 Aug 23];15(7):895–907. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019372/>
16. Wan H, Xu L, Zhang H, Wu F, Zeng W, Li T. High expression of NEK2 promotes gastric cancer progression via activating AKT signaling. *J Physiol Biochem [Internet].* 2021 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];77(1):25–34. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13105-020-00776-8>
17. Wang J, Cheng P, Pavlyukov MS, Yu H, Zhang Z, Kim SH, et al. Targeting NEK2 attenuates glioblastoma growth and radioresistance by destabilizing histone methyltransferase EZH2. *J Clin Invest.* 2017;127(8):3075–89.
18. Miller SL, Antico G, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Clevenger C V. Nek3 kinase regulates prolactin-mediated cytoskeletal reorganization and motility of breast cancer cells. *Oncogene.* 2007 Jul 12;26(32):4668–78.
19. Miller SL, DeMaria JE, Freier DO, Riegel AM, Clevenger C V. Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. *Mol Endocrinol [Internet].* 2005 Apr [cited 2022 Aug 23];19(4):939–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15618286/>
20. Cao Y, Song J, Chen J, Xiao J, Ni J, Wu C. Overexpression of NEK3 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. 2018 [cited 2022 Jul 15]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000009630>
21. Diniz Melo-Hanchuk T, Bonjorno Martins M, Leite Cunha L, Augusto Soares F, Sterian Ward L, Vassallo J, et al. Expression of the NEK family in normal and cancer tissue: an immunohistochemical study. [cited 2022 Jul 15]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6408-4>
22. Chang J, Baloh RH, Milbrandt J. The NIMA-family kinase Nek3 regulates microtubule acetylation in neurons. *J Cell Sci [Internet].* 2009 Jul 1 [cited 2022 Aug 23];122(Pt 13):2274–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19509051/>
23. Belham C, Roig J, Caldwell JA, Aoyama Y, Kemp BE, Comb M, et al. A mitotic cascade of NIMA family kinases: Nerc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34897–909.
24. Wang J, Chen S, Liu M, Zhang M, Jia X. NEK7: a new target for the treatment of multiple tumors and chronic inflammatory diseases. *Inflammopharmacology [Internet].* 2022 Aug 13 [cited 2022 Aug 23];30(4):1179–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35829941>
25. Li YK, Zhu XR, Zhan Y, Yuan WZ, Jin WL. NEK7 promotes gastric cancer progression as a cell proliferation regulator. *Cancer Cell Int [Internet].* 2021 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34419048/>
26. He Z, Ni X, Xia L, Shao Z. Overexpression of NIMA-related kinase 6 (NEK6) contributes to malignant growth and dismal prognosis in Human Breast Cancer. *Pathol Res Pract [Internet].* 2018 Oct 1 [cited 2022 Aug 23];214(10):1648–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30153958/>
27. Jee HJ, Kim AJ, Song N, Kim HJ, Kim M, Koh H, et al. Nek6 overexpression antagonizes p53-induced senescence in human cancer cells. *Cell Cycle [Internet].* 2010 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];9(23):4703–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21099361/>
28. Haider N, Dutt P, van de Kooij B, Ho J, Palomero L, Pujana MA, et al. NEK10 tyrosine phosphorylates p53 and controls its transcriptional activity. *Oncogene.* 2020 Jul 23;39(30):5252–66.
29. Quarby LM, Mahjoub MR. Caught Nek-ing: Cilia and centrioles. *J Cell Sci.* 2005;118(22):5161–9.
30. Xiao M, Du C, Zhang C, Zhang X, Li S, Zhang D, et al. Bioinformatics analysis of the prognostic value of NEK8 and its effects on immune cell infiltration in glioma. *J Cell Mol Med [Internet].* 2021 Sep 1 [cited 2022 Aug 23];25(18):8748–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34374193/>
31. Jung R, Radko S, Pelka P. The Dual Nature of Nek9 in Adenovirus Replication. *J Virol [Internet].* 2015 Feb 15 [cited 2022 Aug 23];90(4):1931–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26676776/>
32. Smith SC, Petrova A V., Madden MZ, Wang H, Pan Y, Warren MD, et al. A gemcitabine sensitivity screen

identifies a role for NEK9 in the replication stress response. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Oct 13 [cited 2022 Aug 23];42(18):11517–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217585/>

33. Dunn J, Ferluga S, Sharma V, Futschik M, Hilton DA, Adams CL, et al. Proteomic analysis discovers the differential expression of novel proteins and phosphoproteins in meningioma including NEK9, HK2 and SET and deregulation of RNA metabolism. *EBioMedicine* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];40:77–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30594554/>
34. Varghese RT, Liang Y, Guan T, Franck CT, Kelly DF, Sheng Z. Survival kinase genes present prognostic significance in glioblastoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 12 [cited 2022 Aug 23];7(15):20140–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26956052/>
35. Melo-Hanchuk TD, Slepicka PF, Pelegrini AL, Menck CFM, Kobarg J. NEK5 interacts with topoisomerase II $\beta$  and is involved in the DNA damage response induced by etoposide. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Aug 23];120(10):16853–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31090963/>
36. Prosser SL, Fry AM. Nek5: a new regulator of centrosome integrity. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2022 Aug 23];6(28):24594–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26309075/>
37. Matossian MD, Wells CI, Zuercher WJ, Collins-Burow BM, Drewry DH, Burow ME. Targeting Never-In-Mitosis-A Related Kinase 5 in Cancer: A Review. *Curr Med Chem* [Internet]. 2021 Mar 23 [cited 2022 Aug 23];28(30):6096–109. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33749548/>
38. De Castro Ferezin C, Basei FL, Melo-Hanchuk TD, Luisa De Oliveira A, Peres De Oliveira A, Mori MP, et al. NEK5 interacts with LonP1 and its kinase activity is essential for the regulation of mitochondrial functions and mtDNA maintenance.
39. Pei J, Zhang J, Yang X, Wu Z, Sun C, Wang Z, et al. NEK5 promotes breast cancer cell proliferation through up-regulation of Cyclin A2. *Mol Carcinog* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Aug 23];58(6):933–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30675923/>
40. Melixetian M, Klein DK, Sørensen CS, Helin K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Aug 23];11(10):1247–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19734889/>
41. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(31):32716–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M404104200>
42. Liu X, Gao Y, Lu Y, Zhang J, Li L, Yin F. Downregulation of NEK11 is associated with drug resistance in ovarian cancer. *Int J Oncol*. 2014;45(3):1266–74.
43. Sabir SR, Sahota NK, Jones GDD, Fry AM. Loss of Nek11 Prevents G2/M Arrest and Promotes Cell Death in HCT116 Colorectal Cancer Cells Exposed to Therapeutic DNA Damaging Agents. 2015 [cited 2022 Jul 15]; Available from: [www.le.ac.uk](http://www.le.ac.uk)
44. Coene KLM, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E, et al. The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Sep [cited 2022 Aug 23];20(18):3592–605. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685204/>
45. Doles J, Hemann MT. Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];70(3):1033–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20103636/>
46. Nguyen CL, Possemato R, Bauerlein EL, Xie A, Scully R, Hahn WC. Nek4 regulates entry into replicative senescence and the response to DNA damage in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 Aug 23];32(19):3963–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22851694/>
47. Huo T, Canepa R, Sura A, Modave F, Gong Y. Colorectal cancer stages transcriptome analysis. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 Aug 23];12(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29182684/>
48. Ding NH, Zhang L, Xiao Z, Rong ZX, Li Z, He J, et al. NEK4 kinase regulates EMT to promote lung cancer metastasis. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];22(12):5877–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30247800/>

#### 4.DISCUSSÃO

A análise de correlação permite quantificar o quanto duas variáveis são relacionadas, indicando uma associação preditiva. Uma alta correlação aponta para uma forte relação entre variáveis, a qual pode ser positiva ou negativa. Correlações positivas ocorrem quando um aumento em uma variável leva a um aumento na outra variável. Por sua vez, uma correlação negativa ocorre quando o aumento de uma variável leva a diminuição de outra.

A análise de correlação da expressão gênica de Nek1 e as demais Neks em GBM apresentou diferentes padrões de correlação, entretanto todos positivos. Este é um dado interessante visto que uma das expectativas do presente estudo era encontrar correlações negativas, uma vez que elas poderiam estar relacionadas a uma possível substituição de Nek1, o que não foi o caso. De qualquer forma, as correlações positivas encontradas no estudo também são resultados importantes que apontam para uma associação entre Nek1 e outros membros de sua família, reforçando a já estabelecida sobreposição de funções e sugerindo possíveis interações entre essas proteínas.

Entre as Neks que apresentaram menor correlação com *NEK1*, surpreendentemente está *NEK2*. Nek2 é o membro mais estudado de sua família, possuindo uma relação bem estabelecida com a regulação da separação de centrôssomos, indispensável para mitose, bem como com DDR(43,83). *NEK2* é superexpresso em diferentes tipos de câncer, incluindo GBM onde o aumento em sua expressão está associado com pior prognóstico(50,84–86). Todos esses dados indicam que, assim como Nek1, Nek2 possui um importante papel no contexto de GBM abrindo margem para uma possível associação entre estes dois membros da família NEK, associação está que não foi encontrada em nosso estudo.

*NEK6*, *NEK7*, *NEK8* e *NEK10* apresentaram uma correlação moderada com *NEK1*. Nek10 é um dos membros menos estudados da família NEK, e apesar de já ter sido descrito uma importante interação dessa Nek com proteínas relacionadas com DDR, como a p53(59), não há nenhuma relação já descrita entre Nek10 e GBM ou Nek10 e Nek1. Portanto, não haviam maiores expectativas com Nek10 no

contexto do presente estudo, assim como com Nek6 e Nek7. Nek6 e Nek7 possuem uma grande proximidade estrutural e funcional e atuam em importantes processos como citocinese, manutenção dos telômeros e regulação do ciclo celular(62,87). Além disso, ambas estão relacionadas com diferentes tipos de câncer(88–91), mas com nenhuma associação com glioblastoma ou Nek1. No entanto, Nek8 foi uma das maiores surpresas do estudo. Assim como Nek1, Nek8 localiza-se no centrossomo e no cílio, sendo um regulador chave da ciliogênese. Tanto Nek8, quanto Nek1 estão relacionados com doença renal policística(47). A essa sobreposição de funções se soma a atuação de Nek8 em gliomas, onde o aumento de sua expressão leva a piores prognósticos(92). Todas essas evidências fazem de Nek8 uma forte candidata a ter uma associação com Nek1 no contexto de GBM, associação maior do que a correlação moderada encontrada neste estudo sugere.

*NEK4, NEK5, NEK9 e NEK11* apresentaram as correlações mais fortes e foram melhor analisadas na linhagem U87 *NEK1* KO. A surpresa deste grupo é a Nek5. Nek5 é mais uma proteína pouco estudada, mas que, como os demais membros de sua família, está envolvida com regulação de centrossomo(93), DDR(94) e câncer(95). Sua alta correlação com *NEK1* em GBM e sua menor expressão em U87 *NEK1* KO tratado com TMZ indicam uma relação de Nek5 com este tipo de câncer ainda não explorada e merecedora de maior atenção.

Nek9, por sua vez, possui várias características interessantes. Nek9 fosforila Nek6 e Nek7, agindo no controle de microtúbulos e regulando a organização do fuso mitótico e da progressão do ciclo celular(62). Nek9 também está relacionada com DDR, apresentando um aumento em sua expressão em resposta a estresse replicativo, ativando CHK1 e regulando p53(96,97). A expressão de *NEK9* é aumentada em meningiomas(98) e altos níveis de sua expressão em GBM aumentam as chances de recidiva(99). Todas essas atuações de Nek9, principalmente no contexto de GBM, reforçam sua alta correlação com Nek1 encontrada neste estudo, bem como a influência causada pelo KO de *NEK1* na sua expressão. Na linhagem U87 *NEK1* KO, *NEK9* apresentou diferentes respostas conforme o tratamento. O tratamento com zeocina levou a um aumento de sua expressão, comparado com a linhagem selvagem. Já o tratamento com TMZ

diminuiu sua expressão. Este foi mais um achado interessante do estudo. Como cada um destes tratamentos está mais relacionado com a ativação de uma via de reparo (zeocina com reparo de quebra dupla e TMZ com BER), fica claro que a associação entre essas cinases está relacionada com a DDR.

Nek11 é uma clássica cinase da DDR. Ela é ativada por CHK1 e regula CDC25A(100). Ademais, Nek11 também interage com Nek2(64), outra Nek já bem estabelecida como agente de DDR. A menor expressão de *NEK11* é associada com resistência ao tratamento em câncer de ovário(60), enquanto em câncer colorretal a perda de Nek11 diminui a sobrevivência das células cancerígenas(61). A forte atuação de Nek11 na DDR corrobora com sua alta correlação com Nek1 em glioblastoma. No experimento com a linhagem U87 *NEK1* KO, *NEK11* apresentou o resultado mais significativo, com um aumento de cerca de duas vezes na sua expressão no tratamento com zeocina. Surpreendentemente, houve uma reversão desse perfil no tratamento com TMZ, onde *NEK11* apresentou uma expressão menor quando comparada com a linhagem selvagem. Mais uma vez, assim como com Nek9, fica evidente a influência do tratamento na expressão desta Nek.

*NEK4* apresentou a maior correlação com *NEK1*. Assim como Nek1, ela tem um importante papel na função ciliar, sendo que uma diminuição na sua expressão leva a uma redução no número de células ciliadas(101). Nek4 também atua na regulação de microtúbulos(102), senescência replicativa(103) e DDR(103), tendo sido associada com diferentes estágios de câncer colorretal(104) e a metástase em câncer de pulmão(105). Todas estas características ensejam sua alta correlação com Nek1 em GBM, sugerindo uma função ainda não explorada neste contexto. Na linhagem U87 *NEK1* KO, *NEK4* também apresentou resultados interessantes. Apesar de o tratamento com zeocina não ter nenhuma diferença significativa, o tratamento com TMZ diminuiu sua expressão e, entre todas Neks avaliadas, foi a única que manteve essa diminuição da expressão no cotratamento com zeocina e TMZ. Esse resultado indica um forte impacto de TMZ na expressão de *NEK4* no contexto de GBM. A alta correlação com *NEK1* e a influência de TMZ na sua expressão fazem de *NEK4* um interessante alvo para maiores investigações no contexto de tratamento para GBM.

A análise conjunta dos dados de correlação e de expressão mostram uma forte associação entre as Neks estudadas. A diminuição da expressão das Neks na linhagem U87 *NEK1* KO após tratamento com TMZ, em comparação com a linhagem selvagem, sugere uma falha de sinalização na DDR relacionada a ausência de Nek1. Esta falha de sinalização pode estar associada com a diminuição da viabilidade da linhagem U87 *NEK1* KO após tratamento com TMZ, descrita em estudo ainda não publicado por nosso grupo de pesquisa (Morás et al., manuscrito em preparação). Já o aumento da expressão de *NEK9* e *NEK11* após o tratamento com zeocina pode estar associado a um mecanismo de compensação pela ausência de Nek1. Considerando o exposto, é necessário a continuidade dos estudos para o entendimento destes dois contextos de respostas das Neks em células sem a proteína Nek1, envolvendo falha de sinalização na resposta à TMZ e a possibilidade de algum mecanismo de compensação durante o tratamento com zeocina.

## 5. CONCLUSÃO

A alta agressividade do GBM e sua resistência aos atuais tratamentos fazem necessária a procura por alternativas terapêuticas. GBM, assim como os mais diferentes tipos de câncer, é uma doença que apresenta um complexo arranjo de fatores que levam ao seu desenvolvimento. Entre esses fatores destaca-se a instabilidade genômica. O estudo da instabilidade genômica, principalmente das vias de reparo e do controle do ciclo celular, propicia um melhor entendimento do câncer, bem como de sua resposta ao tratamento. A família NEK surge neste contexto, como agente nos mais diferentes processos que envolvem a DDR, a carcinogênese e a resposta ao tratamento, sendo seus membros potenciais alvos terapêuticos. A já descrita relação de Nek1 com GBM foi explorada neste estudo, de forma a compreender melhor a relação de Nek1 com os demais membros da família Nek em GBM. Os resultados trouxeram importantes contribuições para o entendimento desta relação. A forte correlação com *NEK5*, faz desta cinase pouco explorada um futuro alvo para novos estudos em glioblastoma. Já com *NEK9*, *NEK11* e principalmente *NEK4*, as altas correlações bem como as alterações nas suas expressões na linhagem KO reforçam todos os achados já descritos para estas cinases, corroborando para a indicação destas como futuros alvos terapêuticos para GBM.

## 6.REFERÊNCIAS

1. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization. 2020.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
5. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):220–8.
6. Nair M, Sandhu SS, Sharma AK. Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2018;52(February):39–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.02.002>
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
8. Yoshioka KI, Kusumoto-Matsuo R, Matsuno Y, Ishiai M. Genomic instability and cancer risk associated with erroneous dna repair. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22).
9. Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med* [Internet]. 2019;25(3):377–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7>
10. Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, Sugiura Y, Yoshimoto S, Arai Y, et al. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-25965-x>
11. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science* (80- ). 2017;357(6348).
12. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071–8.
13. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235–63.
14. Olivieri M, Cho T, Álvarez-Quilón A, Li K, Schellenberg MJ, Zimmermann M, et al. A Genetic Map of the Response to DNA Damage in Human Cells. *Cell*. 2020;182(2):481-496.e21.

15. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39–85.
16. Baretta M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;189:45–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.04.004>
17. Fishel R. Mismatch repair. *J Biol Chem.* 2015;290(44):26395–403.
18. Kennedy EE, Caffrey PJ, Delaney S. Initiating base excision repair in chromatin. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2018;71(August):87–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.011>
19. Schärer OD. Nucleotide excision repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):1–19.
20. Jensen DM. Nucleotide excision repair in humans Graciela HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):1570–3.
21. Trenner A, Sartori AA. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. *Front Oncol.* 2019;9(December):1–10.
22. Li J, Xu X. DNA double-strand break repair: A tale of pathway choices. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2016;48(7):641–6.
23. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2016;37–38:51–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.003>
24. Brandsma I, Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 15];3:1. Available from: <http://www.genomeintegrity.com/content/3/1/9>
25. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):74–88.
26. Huang R-X, Zhou P-K. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. [cited 2022 Jul 15]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>
27. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. 2013 [cited 2022 Jul 15]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>
28. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. 2014 [cited 2022 Jul 15];15:1–10. Available from: <http://genomebiology.com/2014/15/6/122>
29. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, Robert † E, Iii M, Hurov KE, et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive

to DNA Damage. [cited 2022 Jul 15]; Available from: <https://www.science.org>

30. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. 2022 [cited 2022 Jul 15]; Available from: [www.nature.com/cdd](http://www.nature.com/cdd)

31. Qiu S, Huang J. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *J Zhejiang Univ B* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 15];22(1):31–7. Available from: [www.jzus.zju.edu.cn](http://www.jzus.zju.edu.cn); [www.springer.com/journal/11585](http://www.springer.com/journal/11585)

32. Sundar R, Brown J, Ingles Russo A, Yap TA. Targeting ATR in cancer medicine. *Curr Probl Cancer* [Internet]. 2017;41(4):302–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2017.05.002>

33. Weber AM, Ryan AJ. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2015;149:124–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>

34. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer*. 2017 Sep 1;83:258–65.

35. Ma CX, Cai S, Li S, Ryan CE, Guo Z, Schaiff WT, et al. Targeting Chk1 in p53-deficient triple-negative breast cancer is therapeutically beneficial in human-in-mouse tumor models. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1541–52.

36. Bian L, Meng Y, Zhang M, Li D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1100-5>

37. Morris NR. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res*. 1975;26(3):237–54.

38. Oakley BR, Morris NR. A mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks the transition from interphase to prophase. *J Cell Biol*. 1983;96(4):1155–8.

39. Osmani SA, May GS, Morris NR. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*. 1987;104(6):1495–504.

40. Osmani SA, Pu RT, Morris NR. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell*. 1988 Apr 22;53(2):237–44.

41. Osmani AH, McGuire SL, Osmani SA. Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell*. 1991;67(2):283–91.

42. O'Connell MJ, Krien MJE, Hunter T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol*. 2003;13(5):221–8.

43. Meirelles GV, Perez AM, de Souza EE, Basei FL, Papa PF, Melo Hanchuk

TD, et al. "Stop Ne(c)king around": How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. *World J Biol Chem* [Internet]. 2014;5(2):141–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4050109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

44. Fry AM, O'Regan L, Sabir SR, Bayliss R. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Oct 10 [cited 2022 Jul 15];125(19):4423. Available from: [/pmc/articles/PMC3500863/](http://pmc/articles/PMC3500863/)

45. Fry AM, Bayliss R, Roig J. Mitotic regulation by NEK kinase networks. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5(DEC):1–13.

46. Kishan Panchal N, Evan Prince S. The NEK family of serine/threonine kinases as a biomarker for cancer. [cited 2022 Jul 15]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00782-0>

47. Quarmby LM, Mahjoub MR. Caught Nek-ing: Cilia and centrioles. *J Cell Sci*. 2005;118(22):5161–9.

48. Chen Y, Chen PL, Chen CF, Jiang X, Riley DJ. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle*. 2008;7(20):3194–201.

49. Huang X, Zhang G, Tang T, Gao X, Liang T. One shoot, three birds: Targeting NEK2 orchestrates chemoradiotherapy, targeted therapy, and immunotherapy in cancer treatment. *BBA-Reviews on Cancer* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 15];1877:188696. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188696>

50. Wang X, Chen K, Liu H, Huang Z, Chen X, Yin L. Prognostic significance of NEK2 in human solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep*. 2019;39(1).

51. Diniz Melo-Hanchuk T, Bonjorno Martins M, Leite Cunha L, Augusto Soares F, Sterian Ward L, Vassallo J, et al. Expression of the NEK family in normal and cancer tissue: an immunohistochemical study. [cited 2022 Jul 15]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6408-4>

52. Cao Y, Song J, Chen J, Xiao J, Ni J, Wu C. Overexpression of NEK3 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. 2018 [cited 2022 Jul 15]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000009630>

53. De Castro Ferezin C, Basei FL, Melo-Hanchuk TD, Luisa De Oliveira A, Peres De Oliveira A, Mori MP, et al. NEK5 interacts with LonP1 and its kinase activity is essential for the regulation of mitochondrial functions and mtDNA maintenance. *FEBS Open Bio*. 2021 Mar;11(3).

54. Zhou L, Wang Z, Xu X, Wan Y, Qu K, Fan H, et al. Nek7 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation

in vitro and in vivo. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 15];7(14). Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

55. Zhang B, Zhang H, Wang D, Han S, Wang K, Yao A, et al. Never in mitosis gene A-related kinase 6 promotes cell proliferation of hepatocellular carcinoma via cyclin B modulation. *Oncol Lett.* 2014;8(3):1163–8.

56. Ding XF, Chen J, Zhou J, Chen G, Wu YL. Never-in-mitosis a-related kinase 8, a novel targof von-hippel-lindau tumor suppressor protein, promotes gastric cancer cell proliferation. *Oncol Lett.* 2018;16(5):5900–6.

57. Xu Z, Shen W, Pan A, Sun F, Zhang J, Gao P, et al. Decreased Nek9 expression correlates with aggressive behaviour and predicts unfavourable prognosis in breast cancer. *Pathology.* 2020 Apr 1;52(3):329–35.

58. Peres de Oliveira A, Luisa Basei F, Ferreira Slepicka P, de Castro Ferezin C, Melo-Hanchuk TD, Elisa de Souza E, et al. NEK10 interactome and depletion reveal new roles in mitochondria. [cited 2022 Jul 15]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12953-020-00160-w>

59. Haider N, Dutt P, van de Kooij B, Ho J, Palomero L, Pujana MA, et al. NEK10 tyrosine phosphorylates p53 and controls its transcriptional activity. *Oncogene.* 2020 Jul 23;39(30):5252–66.

60. Liu X, Gao Y, Lu Y, Zhang J, Li L, Yin F. Downregulation of NEK11 is associated with drug resistance in ovarian cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Jul 15];45(3):1266–74. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2014.2503/abstract>

61. Sabir SR, Sahota NK, Jones GDD, Fry AM. Loss of Nek11 Prevents G2/M Arrest and Promotes Cell Death in HCT116 Colorectal Cancer Cells Exposed to Therapeutic DNA Damaging Agents. 2015 [cited 2022 Jul 15]; Available from: [www.le.ac.uk](http://www.le.ac.uk)

62. Belham C, Roig J, Caldwell JA, Aoyama Y, Kemp BE, Comb M, et al. A mitotic cascade of NIMA family kinases: Nercc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34897–909.

63. Richards MW, O'Regan L, Mas-Droux C, Blot JMY, Cheung J, Hoelder S, et al. An Autoinhibitory Tyrosine Motif in the Cell-Cycle-Regulated Nek7 Kinase Is Released through Binding of Nek9. *Mol Cell.* 2009 Nov 25;36(4):560–70.

64. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(31):32716–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M404104200>

65. Moniz LS, Stambolic V. Nek10 Mediates G 2 /M Cell Cycle Arrest and MEK Autoactivation in Response to UV Irradiation . *Mol Cell Biol.* 2011;31(1):30–42.

66. Letwin K, Mizzen L, Motro B, Ben-David Y, Bernstein A, Pawson T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J.* 1992;11(10):3521–31.
67. Upadhyaya P, Birkenmeier EH, Birkenmeier CS, Barker JE. Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):217–21.
68. Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J. Identification of Proteins That Interact with the Central Coiled-Coil Region of the Human Protein Kinase NEK1 †. 2003 [cited 2022 Jul 15]; Available from: [www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)
69. Polci R, Peng A, Chen PL, Riley DJ, Chen Y. NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res.* 2004;64(24):8800–3.
70. Chen Y, Chen CF, Chiang HC, Pena M, Polci R, Wei RL, et al. Mutation of NIMA-related kinase 1 (NEK1) leads to chromosome instability. *Mol Cancer [Internet].* 2011;10(1):5. Available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/5>
71. Pelegri AL, Moura DJ, Brenner BL, Ledur PF, Maques GP, Henriques JAP, et al. Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis.* 2010;25(5):447–54.
72. Higelin J, Catanese A, Semelink-Sedlacek LL, Oeztuerk S, Lutz AK, Bausinger J, et al. NEK1 loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in ALS patient-derived motoneurons. *Stem Cell Res [Internet].* 2018;30(May):150–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.06.005>
73. Monroe GR, Kappen IFPM, Stokman MF, Terhal PA, Van Den Boogaard MJH, Savelberg SMC, et al. Compound heterozygous NEK1 variants in two siblings with oral-facial-digital syndrome type II (Mohr syndrome). *Eur J Hum Genet.* 2016;24(12):1752–60.
74. Zhu J, Cai Y, Liu P, Zhao W. Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2016;476(4):522–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.156>
75. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Webster J, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;3:803–20.
76. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro Oncol.* 2014;16(7):896–913.
77. Reinhardt LS, Morás AM, Henn JG, Arantes PR, Ferro MB, Braganhol E, et

al. Nek1-inhibitor and temozolomide-loaded microfibers as a co-therapy strategy for glioblastoma treatment. *Int J Pharm.* 2022 Apr 5;617:121584.

78. Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to the gene expression analysis. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Aug 23];1434:29–43. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3652-6\\_3](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3652-6_3)

79. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2022 Aug 23];55(4):611–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246619/>

80. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)* [Internet]. 2015 [cited 2022 Aug 23];19(1A):A68–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25691825/>

81. Wang Z, Jensen MA, Zenklusen JC. A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Methods Mol Biol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Aug 23];1418:111–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27008012/>

82. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 7 [cited 2022 Aug 23];47(W1):W556. Available from: </pmc/articles/PMC6602440/>

83. Au FKC, Hau BKT, Qi RZ. Nek2-mediated GAS2L1 phosphorylation and centrosome-linker disassembly induce centrosome disjunction. *J Cell Biol* [Internet]. 2020 May 4 [cited 2022 Aug 23];219(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32289147/>

84. Wang J, Cheng P, Pavlyukov MS, Yu H, Zhang Z, Kim SH, et al. Targeting NEK2 attenuates glioblastoma growth and radioresistance by destabilizing histone methyltransferase EZH2. *J Clin Invest.* 2017;127(8):3075–89.

85. Wan H, Xu L, Zhang H, Wu F, Zeng W, Li T. High expression of NEK2 promotes gastric cancer progression via activating AKT signaling. *J Physiol Biochem* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];77(1):25–34. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13105-020-00776-8>

86. Fang Y, Zhang X. Targeting NEK2 as a promising therapeutic approach for cancer treatment. *Cell Cycle* [Internet]. 2016 Apr 2 [cited 2022 Aug 23];15(7):895–907. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019372/>

87. Prosser SL, O'Regan L, Fry AM. Novel insights into the mechanisms of mitotic spindle assembly by NEK kinases. *Mol Cell Oncol* [Internet]. 2016;3(3):1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/23723556.2015.1062952>

88. Jee HJ, Kim AJ, Song N, Kim HJ, Kim M, Koh H, et al. Nek6 overexpression

antagonizes p53-induced senescence in human cancer cells. *Cell Cycle* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];9(23):4703–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21099361/>

89. He Z, Ni X, Xia L, Shao Z. Overexpression of NIMA-related kinase 6 (NEK6) contributes to malignant growth and dismal prognosis in Human Breast Cancer. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Aug 23];214(10):1648–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30153958/>

90. Li YK, Zhu XR, Zhan Y, Yuan WZ, Jin WL. NEK7 promotes gastric cancer progression as a cell proliferation regulator. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34419048/>

91. Wang J, Chen S, Liu M, Zhang M, Jia X. NEK7: a new target for the treatment of multiple tumors and chronic inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2022 Aug 13 [cited 2022 Aug 23];30(4):1179–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35829941>

92. Xiao M, Du C, Zhang C, Zhang X, Li S, Zhang D, et al. Bioinformatics analysis of the prognostic value of NEK8 and its effects on immune cell infiltration in glioma. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Aug 23];25(18):8748–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34374193/>

93. Prosser SL, Fry AM. Nek5: a new regulator of centrosome integrity. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2022 Aug 23];6(28):24594–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26309075/>

94. Melo-Hanchuk TD, Slepicka PF, Pelegrini AL, Menck CFM, Kobarg J. NEK5 interacts with topoisomerase II $\beta$  and is involved in the DNA damage response induced by etoposide. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Aug 23];120(10):16853–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31090963/>

95. Pei J, Zhang J, Yang X, Wu Z, Sun C, Wang Z, et al. NEK5 promotes breast cancer cell proliferation through up-regulation of Cyclin A2. *Mol Carcinog* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Aug 23];58(6):933–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30675923/>

96. Jung R, Radko S, Pelka P. The Dual Nature of Nek9 in Adenovirus Replication. *J Virol* [Internet]. 2015 Feb 15 [cited 2022 Aug 23];90(4):1931–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26676776/>

97. Smith SC, Petrova A V., Madden MZ, Wang H, Pan Y, Warren MD, et al. A gemcitabine sensitivity screen identifies a role for NEK9 in the replication stress response. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Oct 13 [cited 2022 Aug 23];42(18):11517–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217585/>

98. Dunn J, Ferluga S, Sharma V, Futschik M, Hilton DA, Adams CL, et al. Proteomic analysis discovers the differential expression of novel proteins and

phosphoproteins in meningioma including NEK9, HK2 and SET and deregulation of RNA metabolism. *EBioMedicine* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];40:77–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30594554/>

99. Varghese RT, Liang Y, Guan T, Franck CT, Kelly DF, Sheng Z. Survival kinase genes present prognostic significance in glioblastoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 12 [cited 2022 Aug 23];7(15):20140–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26956052/>

100. Melixetian M, Klein DK, Sørensen CS, Helin K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Aug 23];11(10):1247–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19734889/>

101. Coene KLM, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E, et al. The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Sep [cited 2022 Aug 23];20(18):3592–605. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685204/>

102. Doles J, Hemann MT. Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];70(3):1033–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20103636/>

103. Nguyen CL, Possemato R, Bauerlein EL, Xie A, Scully R, Hahn WC. Nek4 regulates entry into replicative senescence and the response to DNA damage in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 Aug 23];32(19):3963–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22851694/>

104. Huo T, Canepa R, Sura A, Modave F, Gong Y. Colorectal cancer stages transcriptome analysis. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 Aug 23];12(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29182684/>

105. Ding NH, Zhang L, Xiao Z, Rong ZX, Li Z, He J, et al. NEK4 kinase regulates EMT to promote lung cancer metastasis. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];22(12):5877–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30247800/>

## 7.ANEXOS

### A – Tabela primers

Human gene	Forward primer	Reverse primer
<b>TBP</b>	GCATCACTGTTTCTTGGCGT	CGCTGGAACTCGTCTCACTA
<b>ACTB</b>	CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
<b>NEK4</b>	AGGGGACCTAGGAATTGCC	TGGTGGCAGCTTTCCTCAA
<b>NEK5</b>	TCCTCCAAGAGGAAGAGGCA	AGCACAGACTCACTGTCAGG
<b>NEK9</b>	GATTTGACCCGGCTGTCTGA	TGCAGCTCACTGCTGAAACA
<b>NEK11</b>	AGTACTGTGAGGGCCGAGAT	CCAGGTCACAGGATCCCATT

**Tabela1** – Primers utilizados para análise de expressão gênica por qPCR.

## 8. CURRÍCULO LATTES

30/08/2022 14:53

Currículo Lattes


 Imprimir  
currículo

**Rick Shandler Rodrigues da Cunha**

 Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7772035713017570>

Última atualização do currículo em 30/08/2022

**Resumo informado pelo autor**

Biomédico formado pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), com graduação sanduíche em Medical Sciences pelo programa Ciência sem Fronteiras (CsF) na Flinders University, Austrália. Especialista em Microbiologia Clínica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Experiência em microbiologia clínica hospitalar. Mestrado em andamento pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFCSA, junto ao laboratório de Genética Toxicológica.

(Texto informado pelo autor)

**Nome civil**

Nome Rick Shandler Rodrigues da Cunha

**Dados pessoais**

Nascimento 07/01/1993 - Porto Alegre/RS - Brasil

CPF 031.056.140-01

**Formação acadêmica/titulação**

- 2019** Mestrado em BIOCÊNCIAS.  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil  
Orientador: Dinara Jaqueline Moura
- 2018 - 2021** Especialização em Especialização em Microbiologia Clínica.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Impacto da Resistência Bacteriana sobre o Tempo de Liberação de Laudo  
Especialização Interrompido(a) em Residência Multiprofissional em Saúde.  
Hospital Universitário de Canoas, HUC, Brasil  
Bolsista do(a): Ministério da Saúde  
Ano de interrupção: 2018
- 2011 - 2016** Graduação em Biomedicina.  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil  
com período sanduíche em Flinders University of South Australia (Orientador: -)  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**Formação complementar**

- 2016 - 2016** Extensão universitária em Língua e Cultura Espanhola I. (Carga horária: 45h).  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Workshop - Estratégias de prevenção de dificuldades e reabilitação da memór. (Carga horária: 7h).  
Instituto de Neurociências Integradas, INI, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em III Jornada do serviço de Genética Clínica da UFCSA. (Carga horária: 8h).  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
- 2013 - 2014** English for Academic Preparation Proficiency Level 6. (Carga horária: 500h).  
University of Adelaide, UADELAIDE, Adelaide, Austrália  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Introdução a modelagem de neurônios. (Carga horária: 4h).  
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Museu de Anatomia Humana. (Carga horária: 15h).  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Oficina de Dissecção. (Carga horária: 30h).  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Extensão universitária em Feira de Saúde UFCSA. (Carga horária: 4h).  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Módulo de Primeiros Socorros da Liga do Trauma da UFCSA. (Carga horária: 8h).  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Curso de Ciências Forenses. (Carga horária: 8h).  
Renova Cursos e Eventos, RENOVA, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Curso de Células Tronco e Terapia Celular. (Carga horária: 4h).  
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil

**Atuação profissional**

1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSA

30/08/2022 14:53

Currículo Lattes

**Vínculo institucional**

- 2016 - 2016** Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Monitor da disciplina de Fisiologia, curso de Toxicologia Analítica
- 2016 - 2016** Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Monitor da disciplina de Biologia Molecular, curso de Biomedicina
- 2016 - 2016** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor PID , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Bolsista do Programa de Iniciação a Docência(PID), atuando no projeto "A docência em saúde: elaboração e avaliação de estratégias metodológicas e materiais didáticos", junto a disciplina de Metodologia do Ensino do curso de Biomedicina
- 2015 - 2015** Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Monitor da disciplina de Bioquímica II, curso de Biomedicina
- 2012 - 2012** Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Monitor da disciplina de Biofísica Celular para o curso de Biomedicina
- 2012 - 2012** Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Monitor da disciplina de Anatomia dos Sistemas
- 2012 - 2012** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Membro do Centro Acadêmico Camillo Golgi , Carga horária: 5, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Cargo de Secretário de Finanças
- 2012 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Segundo período de bolsa na Modalidade PIBIC/CNPq (Renovação). Atuou no projeto "Avaliação neuropsicológica de funções executivas de pacientes com transtorno de estresse pós-traumático"
- 2012 - 2012** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Modalidade PIBIC/CNPq. Atuou no projeto "Avaliação neuropsicológica de funções executivas de pacientes com transtorno de estresse pós-traumático"

2. Hospital Universitário de Canoas - HUC

**Vínculo institucional**

- 2018 - 2022** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista Clínico Pleno , Carga horária: 36, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Analista Clínico Pleno atuando no setor de Microbiologia
- 2017 - 2018** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Residente em Biomedicina , Carga horária: 60, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
Residência em Saúde do Adulto e do Idoso junto à Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)

**Produção**

Produção bibliográfica

**Artigos completos publicados em periódicos**

- doi:10.1111/da.12111** DA CUNHA, RICK SHANDLER RODRIGUES; CARNIEL, ELIANA; NARVAEZ, GABRIEL AZAMBUJA; DIAS, CICERO GOMES; PEREZ, LEANDRO REUS RODRIGUES  
Impact of the blue-carba rapid test for carbapenemase detection on turnaround time for an early therapy against Pseudomonas aeruginosa. AMERICAN JOURNAL OF INFECTION CONTROL. **43**(5), v.49, p.352 - 354, 2021.
- doi:10.1111/ejcn.12111** ZANCAN, MARIANA; DA CUNHA, RICK SHANDLER R.; SCHROEDER, FRANCIELLE; XAVIER, LEDER L.; RASIA-FILHO, ALBERTO A.  
Remodeling of the number and structure of dendritic spines in the medial amygdala: from prepubertal sexual dimorphism to puberty and effect of sexual experience in male rats. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE. **40**(7), v.07, p.1 - 20, 2018.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 30/08/2022 às 14:52:32.