INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* do impacto do silenciamento do gene NF- κ B1
no ciclo celular, capacidade proliferativa e na radiosensibilidade do
adenocarcinoma renal**

AMANDA IKEGAMI

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Maria
Helena Bellini**

São Paulo

2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* do impacto do silenciamento do gene NF- κ B1
no ciclo celular, capacidade proliferativa e na radiosensibilidade do
adenocarcinoma renal**

AMANDA IKEGAMI

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Maria
Helena Bellini**

São Paulo

2019

Fonte de Financiamento: FAPESP Processo: 2014/19265-7 / CNEN Processo: 95/SEFESP 01/2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

IKEGAMI, A. ***Avaliação in vitro e in vivo do impacto do silenciamento do gene NF-kB1 no ciclo celular, capacidade proliferativa e na radiosensibilidade do adenocarcinoma renal.*** 2019. 86 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ikegami, Amanda

Avaliação in vitro e in vivo do impacto do silenciamento do gene NF-kB1 no ciclo celular, capacidade proliferativa e na radiosensibilidade do adenocarcinoma renal / Amanda Ikegami; orientadora Maria Helena Bellini. -- São Paulo, 2019.

86 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Adenocarcinoma renal. 2. Técnica short hairpin RNA. 3. Gene NF-kB1. 4. Proliferação. 5. Radiosensibilidade. I. Bellini, Maria Helena, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria Helena Bellini Marumo pela oportunidade concedida, orientação e contribuição para meu desenvolvimento intelectual, profissional e pessoal.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por colocar à disposição o espaço necessário ao desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que forneceu apoio financeiro ao projeto (processo n.2014/19265-7).

À Comissão Nacional de Energia Nuclear pela concessão da bolsa de mestrado (memorando n. 95/SEFESP edital 01/2016).

A todos os envolvidos, professores e colegas de pesquisa, que contribuíram para a realização e finalização deste projeto.

RESUMO

IKEGAMI, Amanda. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do impacto do silenciamento do gene NF- κ B1 no ciclo celular, capacidade proliferativa e na radiosensibilidade do adenocarcinoma renal.** 2019. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

O carcinoma de células renais (CCR) é responsável por, aproximadamente, 1 a 3% das neoplasias malignas humanas e, dentre os tumores urológicos, é o mais agressivo. A heterogeneidade biológica, a resistência aos fármacos e os efeitos colaterais à quimioterapia são os maiores obstáculos ao tratamento eficaz do CCR. Várias moléculas vêm sendo correlacionadas com o fenótipo agressivo deste tumor, sendo uma delas o fator de transcrição NF- κ B. Estudos demonstraram a ativação de NF- κ B no CCR e muitos apontaram NF- κ B1 (p50) como uma molécula importante na progressão tumoral e metástase. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de silenciamento gênico de interferência por RNA - *Short hairpin RNA* (shRNA) - para diminuir a expressão de NF- κ B1 em células murinas de carcinoma de células renais (Renca). Verificou-se que, *in vitro*, a diminuição da expressão do gene NF- κ B1 reduz a capacidade proliferativa das células Renca e aumenta a taxa de apoptose tardia/necrose e a quantidade de células na fase G2/M do ciclo celular. Além disso, as análises de Western blot revelaram aumento significativo da expressão proteica de Ciclina B1 e Bax. A regulação negativa da p50 também alterou a capacidade clonogênica das células que, conjugada à irradiação ionizante, levou à diminuição significativa da fração de sobrevivência das células Renca e diminuiu a viabilidade celular verificada através do ensaio de MTS. Os ensaios *in vivo* mostraram que as células com baixa expressão de NF- κ B1 (Renca-shRNA-NF- κ B1) apresentam tumorigenicidade significativamente menor que as células controle e as análises de imunohistoquímica mostraram aumento significativo das áreas necróticas dos tumores Renca-shRNA-NF- κ B1, além da

diminuição da marcação de Ki-67, um marcador de proliferação celular. Os resultados indicam que a diminuição da expressão de NF- κ B1 pode suprimir a tumorigênese do CCR, induzindo apoptose tardia/necrose, podendo ser um potencial alvo terapêutico para este carcinoma.

Palavras-chave: carcinoma de células renais, NF- κ B1, proliferação, shRNA.

ABSTRACT

IKEGAMI, Amanda. **In vitro and in vivo evaluation of the impact of silence of the gene NF- κ B1 in cell cycle, proliferative capability and radiosensitivity of renal adenocarcinoma**. 2019. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Renal cell carcinoma (RCC) is responsible for approximately 1 to 3% of human malignancies and, among urological tumors, is the most aggressive. Biological heterogeneity, drug resistance, and side effects to chemotherapy are major obstacles to effective RCC treatment. Several molecules have been correlated with the aggressive phenotype of this tumor, one of them being the transcription factor NF- κ B. Studies have demonstrated the activation of NF- κ B in the RCC and many have pointed to NF- κ B1 (p50) as an important molecule in tumor progression and metastasis. In this study, the gene silencing technique of RNA Short hairpin RNA (shRNA) interference was used to decrease the expression of NF- κ B1 in murine cells of renal cell carcinoma (Renca). It has been found that, in vitro, the decrease in NF- κ B1 gene expression reduces the proliferative capacity of Renca cells and increases the rate of late apoptosis/necrosis and the number of cells in G2/M phase of the cell cycle. In addition, Western blotting analyzes revealed a significant increase in the protein expression of Cyclin B1 and Bax. Knockdown of p50 also altered clonogenic ability of cells and, together with ionizing irradiation, significantly increased renal cell fraction and decreased cell viability through the MTS assay. In vivo assays showed that cells with low expression of NF- κ B1 (Renca-shRNA-NF- κ B1) showed significantly less tumorigenicity than control cells and immunohistochemical analyzes showed a significant increase in necrotic areas of the Renca-shRNA-NF κ B1. Moreover, decreased the Ki-67 labeling, a cell proliferation biomarker. The results indicate that the decrease in NF- κ B1 expression may suppress RCC tumorigenesis, inducing late apoptosis/necrosis, and may be a potential therapeutic target for this carcinoma.

Key words: renal cell carcinoma, NF- κ B1, proliferation, shRNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Carcinoma de células renais	10
1.2 CCR e radioterapia	15
1.3 Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB)	16
1.4 RNA de interferência	21
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Silenciamento do gene NF-κB1.....	24
3.1.1 Cultura celular.....	24
3.1.2 RNA de interferência	25
3.1.3 Curva de resistência à puomicina.....	25
3.1.4 Transformação bacteriana por choque térmico	26
3.1.5 Cultura bacteriana	27
3.1.6 Extração de DNA plasmidial	27
3.1.7 Transfecção	28
3.1.8 Transdução das células Renca.....	28
3.2 Ensaio funcionais <i>in vitro</i>	30
3.2.1 Extração de RNA	30
3.2.2 Síntese de cDNA	31
3.2.3 PCR em tempo real	31
3.2.4 Extração de proteínas.....	32
3.2.5 Western blot (WB)	32
3.2.6 Imunofluorescência.....	34
3.2.7 Análise do tempo de dobramento celular	34
3.2.8 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	35
3.2.9 Análise de morte celular por citometria de fluxo	36
3.2.10 Irradiação das células.....	36
3.2.11 Ensaio de sobrevivência clonogênica	36
3.2.12 Detecção da viabilidade celular após irradiação.....	37

3.3 Ensaio funcionais <i>in vivo</i>	37
3.3.1 Crescimento tumoral.....	37
3.3.2 Determinação da área de necrose tumoral.....	38
3.3.3 Imunohistoquímica.....	38
3.3.4 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 <i>Knockdown</i> do gene NF- κ B1.....	39
4.1.1 Curva de resistência à puromicina.....	39
4.1.2 Rendimento e pureza do DNA plasmidial	41
4.1.3 Transfecção das células HEK293T.....	41
4.1.4 Transdução das células Renca.....	42
4.1.5 Seleção por puromicina	43
4.2 Ensaio funcionais <i>in vitro</i>	43
4.2.1 Rendimento da extração de RNA	43
4.2.2 Avaliação dos níveis de expressão gênica	43
4.2.3 Avaliação dos níveis de expressão proteica por Western blot.....	44
4.2.4 Avaliação por Imunofluorescência	46
4.2.5 Tempo de dobramento celular	47
4.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	48
4.2.7 Análise de morte celular por citometria de fluxo	50
4.2.8 A baixa regulação de NF- κ B1 aumenta a radiosensibilidade das células Renca	51
4.2.9 Efeitos da irradiação na viabilidade celular.....	53
4.2.10 Mecanismo molecular do impacto do silenciamento do gene NF- κ B1 nas células Renca	53
4.3 Ensaio funcionais <i>in vivo</i>	55
4.3.1 A baixa regulação de NF- κ B1 inibiu carcinoma renal de células claras em camundongos Balb/c	55
4.3.2 Quantificação de necrose tumoral	57
4.3.3 Determinação da proliferação através de marcação com Ki-67	59
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS.....	67

ANEXO I Aprovação do comitê de ética CEUA-IPEN	74
ANEXO II Publicação do artigo	75

LISTA DE SIGLAS

CCR	Carcinoma de Células Renais
CCRcc	Carcinoma de Células Renais de células claras
VHL	von Hippel-Lindau
HIF	Fator Induzível por Hipóxia
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial e Vascular
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos
ASMase	Esfingomielinase Ácida
TNF	Fator de Necrose Tumoral
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
TAD	Domínio de Transativação
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
IKK	IκB quinase
IκB	Inibidor de <i>kappa</i> B
NIK	Quinase indutora de NF-κB
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
DICER	Enzima endoribonuclease Dicer
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA

1. Introdução

1.1 Carcinoma de células renais

Carcinoma de células renais (CCR) é o termo que se refere às neoplasias do epitélio do parênquima renal, representando de 1 a 3% de todas as neoplasias malignas viscerais, o sétimo tipo de tumor mais comum dentre os homens e o nono dentre as mulheres (1). Existem vários subtipos histológicos do CCR que descrevem categorias baseadas em análises patológicas e genéticas, sendo os três mais frequentes: células claras (75%), papilífero (10-15%) e cromóforo (4-5%), conforme apresentado na Tabela 1 (2).

Tabela 1. Classificação histológica do Carcinoma de células renais.

Subtipo	Incidência	Origem
Células claras	75%	Néfron proximal, epitélio tubular
Papilífero	10%	Néfron distal, epitélio tubular
Cromóforo	5%	Néfron distal
Dutos coletores (Bellini)	1%	Túbulos coletores
Medular	1%	Néfron distal
Translocação Xp11	Raro	Néfron distal ou proximal
Tubulomucinoso e de células fusiformes	Raro	Néfron distal, células tubulares
Associado a neuroblastoma	Raro	Epitélio tubular proximal
Não classificado	4-6%	Variável

A Figura 1 apresenta os subtipos histológicos mais frequentes do CCR.

Figura 1. Subtipos histológicos do CCR. a) Células claras, b) papilífero tipo I, c) papilífero tipo II, d) cromóforo.

Fonte: Lopez-Beltran A et al. (2009) (2).

A classificação histológica do CCR juntamente com o estadiamento é importante, pois implicam em diferentes prognósticos e terapias. A taxa de sobrevivência de pacientes com CCR está correlacionada ao estágio tumoral em que se encontram no momento do diagnóstico. O estágio I é aquele em que o tumor encontra-se restrito ao rim; II apresenta invasão de cápsula e gordura peri-renal; III é o acúmulo dos estágios I e II somados à invasão da veia renal ou cava ou metástase linfonodal retroperitoneal e o estágio IV apresenta metástase (3). A Figura 2 representa o estadiamento do carcinoma de células renais.

Figura 2. Representação do estadiamento do CCR.

Fonte: Modificado de Scher H & Motzer R (2006) (4).

O CCRcc (Carcinoma de Células Renais de células claras) tende a ser uma doença assintomática; a falta de sinais de alerta precoce somada à ausência de tratamentos eficazes para a doença avançada, torna-a uma das dez principais causas de morte por câncer nos países desenvolvidos (5) e estima-se que 20 a 30% dos pacientes apresentam-se com metástase durante o diagnóstico inicial devido à tendência do CCRcc de ter caráter altamente invasivo, sendo resistente ao tratamento quimio e radioterápico (6). Nestes casos, as taxas de sobrevida dos pacientes caem para 50% quando diagnosticados no estadio III e <10% quando o tumor encontra-se no estadio IV (7).

Para pacientes que possuem a doença localizada, a intervenção cirúrgica é realizada removendo total ou parcialmente o rim. No entanto, 20 a 30% dos pacientes que se submetem à nefrectomia total ou parcial têm

recorrência de doença metastática no prazo de cinco anos do diagnóstico inicial (8).

Com os avanços nas áreas da biologia celular e molecular do CCR, drogas foram desenvolvidas com a capacidade de bloquear vias específicas de sinalização celular (Terapia Alvo) para o tratamento do CCR metastático. Existem tratamentos em curso que têm sido aprovados pelo *Food Drug Administration-USA* (FDA-EUA) e as drogas utilizadas podem atuar de maneiras distintas, como demonstradas na Tabela 2 (9).

Tabela 2. Tratamentos utilizados para o Carcinoma de células renais.

Tratamento	Medicamentos/Drogas	Modo de atuação
Terapia imune	Interleucina 2 ou interferon-alfa	Citocinas que estimulam o sistema imunológico do organismo.
Terapia anti-angiogênica	Sunitinib, Axitinib, Sorafenib ou Pazopanib	Bloqueia vias de sinalização do VEGF e PDGF, interrompendo a irrigação sanguínea do tumor.
Terapia alvo-molecular	Temsirolimus ou Everolimus	Inibidores de mTOR, proteína que normalmente promove o crescimento e divisão celular.

A resistência ao tratamento para terapia alvo ocorre rapidamente, sendo necessário um tratamento a longo prazo, muitas vezes com combinação com outros agentes ou aplicado sequencialmente, requerendo um maior controle da toxicidade nos pacientes (10).

O CCRcc é caracterizado por mutação do gene supressor tumoral von Hippel-Lindau (VHL). Na ausência da proteína VHL, o fator induzido por hipóxia

HIF (1 α e 2 α) (do inglês, *Hypoxia-Inducible Factor*) é estabilizado e, como consequência, modula a transcrição de vários genes relacionados ao HIF, como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*), fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) que conferem resistência à radiação de células endoteliais, bem como aumenta a proliferação e o crescimento do tumor dos vasos sanguíneos (Figura 3) (11).

Figura 3. Interferência da proteína VHL na modulação do fator induzido por hipóxia HIF.

Fonte: Robinson Claire M & Ohh M (2014) (12).

1.2 CCR e radioterapia

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes são obtidos quando um elétron é eliminado de um dos átomos de uma molécula do organismo por uma energia ionizante e esse mecanismo pode ser direto - quando a radiação interage com moléculas como o DNA, causando mutação ou morte celular - ou indireto - quando a radiação interage com moléculas de água, formando radicais livres que, por sua vez, interagem com outras moléculas do corpo (13).

O carcinoma de células renais é considerado radorresistente, portanto o uso da radioterapia é aplicado como tratamento paliativo para metástases e/ou para controlar o crescimento do tumor local. No entanto, a resistência à radioterapia depende do método escolhido para a entrega da radiação às células (14).

Um dos fatores determinantes para a radiosensibilidade de diversos tumores malignos é a apoptose de células endoteliais, inclusive para o CCR – o que pode ser explicado devido a sua intensa vasculatura (15). A radiação fracionada convencional envolve diariamente frações de 1.8 – 3.0 Gy, causando morte celular programada ou apoptose mediada pelo gene supressor tumoral p53 (16). Após cada fração de radiação ocorrem ondas de hipóxia seguidas de reoxigenação, fazendo com que espécies reativas de oxigênio surjam, formando células hipóxicas. Sob condição de hipóxia, o VHL não se liga ao HIF1 que, por sua vez, não sofre mais ubiquitinação e degradação proteossomal, acumulando-se. Além disso, células hipóxicas podem causar tradução de transcritos de mRNA de HIF1 α que são armazenados em grânulos de estresse citossólico. Com doses fracionadas convencionalmente a morte

celular é mediada, principalmente, por meio de danos ao DNA (quebras de fita dupla, rupturas não reparadas ou mal reparadas) das células tumorais (17-19).

Na radioterapia de alta fração de dose única (por exemplo, 15 a 20 Gy) ocorre uma rápida onda de apoptose endotelial com morte das células tumorais após 2 a 3 dias (20). Estudos demonstraram que após alguns segundos de radiação e sem danos ao DNA, na condição de radiação de alta fração e dose única, enzimas como a esfingomielinase ácida (ASMase) ou outros fatores ativam mensageiros pró-apoptóticos que coordenam a sinalização transmembrana do fator de necrose tumoral (TNF), mediador de apoptose, e outros complexos de sinalização indutores de morte (21).

1.3 Fator de transcrição kB (NF-kB)

Estudos sobre o carcinoma de células renais vêm apresentando moléculas responsáveis por seu fenótipo agressivo, sendo uma delas o fator de transcrição NF-kB (22). O fator nuclear kB (NF-kB) foi descoberto em 1986, por Sen e Baltimore e descrito como sendo um fator nuclear que se ligava a elementos promotores da cadeia leve da imunoglobulina ativada de células B (23). NF-kB regula a transcrição de diversos genes relacionados à resposta imune, adesão celular, proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose (24), desempenhando um papel essencial na progressão tumoral.

A família NF-kB é composta por p50 (NF-kB1), p52 (NF-kB2), derivados dos precursores p105 e p100, respectivamente, que não possuem domínio de transativação (TAD) - necessário para realizar atividade transcricional - e

p65 (RelA), c-Rel (Rel) e RelB, que possuem o TAD; sendo que a principal forma de NF- κ B é o heterodímero de p50 e p65/RelA (25) (Figura 4).

Figura 4. Membros da família NF- κ B mostrando o Domínio de Homologia Rel (em vermelho), onde ocorre a ligação ao DNA e dimerização.

Fonte: Modificado de Ini-Isabée Witzel et al. (2011) (26).

A formação de dímeros é necessária para que ocorra a ligação ao DNA; a região N-terminal é responsável pelo contato específico ao DNA e a região C-terminal geralmente é altamente conservada e responsável pela dimerização e contato inespecífico do fosfato do DNA. Os homodímeros de p50 e p65 atuam como repressores transcricionais ou, em alguns casos, como indutores de expressão gênica quando em parceria com ativadores transcricionais (27). Sem estímulo, o NF- κ B permanece no citoplasma da maioria das células, em sua forma inativa, ligado a uma proteína inibitória da família kappa B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B δ (p100) e Bcl-3 (28).

Para que ocorra a ativação do NF- κ B molecular é necessário que as células separem as moléculas de NF- κ B dos seus inibidores. Existem vias de sinalização que conduzem à dissociação do inibidor I κ B do dímero de NF- κ B, permitindo a translocação deste do citoplasma para o núcleo. A via clássica ou canônica é a mais comum e ocorre a partir do receptor da superfície celular de citocinas pró-inflamatórias e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Genes relacionados à resposta imunológica inata, sobrevivência celular, inflamação e anti-apoptose são expressos através da ativação desta via (29). Ao receber os estímulos, os receptores transferem o sinal através da membrana celular, provocando a ativação do complexo I κ B quinase (IKK) que catalisa a fosforilação das proteínas inibitórias I κ Bs e degradação subsequente pelo proteassoma 26S. O dímero mais comumente translocado para o núcleo por essa via é o p50-RelA (30).

Outra via de ativação do NF- κ B é chamada de alternativa (não canônica) e está associada à expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (30). Esta via é ativada através da transferência de sinalização no citoplasma por receptores membros da família do TNF, em que ocorre a fosforilação da proteína NIK e subsequente fosforilação dos homodímeros IKK. O alvo nesta via é a p100 associada à RelB, que resulta na translocação nuclear dos dímeros p52-RelB (30). A Figura 5 esquematiza as vias de ativação do NF- κ B.

Figura 5. Vias de transdução de sinais do NF- κ B.

Fonte: Modificado de Gilmore T D (2006) (31).

O papel oncogênico do NF- κ B no CCR vem sendo estudado por diversos pesquisadores, conforme apresentado na Tabela 3. Oya et al. foram os primeiros a identificar a ativação de NF- κ B em linhagens celulares de adenocarcinoma renal (2001). Neste trabalho, experimentos com gel supershift mostraram que p50 é a subunidade envolvida na tumorigênese e ainda que linhagens celulares suscetíveis à apoptose mediada pela via TRAIL apresentam baixos níveis de NF- κ B ativado, enquanto linhagens resistentes a apoptose apresentam altos níveis (18). Em outro estudo, o mesmo grupo correlacionou o aumento da atividade de NF- κ B com o aumento na expressão das subunidades p65 e p50 e a consequente diminuição da expressão da I κ B α (19). Em 2008, os grupos Meteoglu et al. e Djordjevic et al. analisaram

amostras de pacientes com CCR metastático e observaram correlação entre o aumento da atividade da p50 com o aumento de marcadores angiogênicos e apoptose (EGFR, VEGF, Bcl-2 e p53) (20,35).

Tabela 3. Trabalhos relacionando CCR e NF-κB.

Estudo	Subunidade	Referência
Pacientes com CCR primário em remissão.	↑NFKB1 (polimorfismo)	Riemann et al. (2006) (32)
Linhagens: ACNH, SN12K1	↑p50, p52, p65, c-Rel, RelB	Morais et al. (2006) (33)
Linhagens: não expressa VHL: 786-0, UOK-126, UOK-128 e A498. Expressa VHL: ACHN, Caki-1 e Caki-2. Biopsia de pacientes com CCR primário	↑p65	Soubrier (2007) (34)
Pacientes com CCR primário	↑ p50	Meteoglu et al. (2008) (20)
Pacientes com CCR primário	↑p65	Djordjevic et al. (2008) (35)
Linhagens: ACHN e SN12K1	↑ p50 , p52, p65, c-Rel, RelB	Morais et al. (2009) (36)
Linhagem: SN12K1	↑ p50 , p52, p65, c-Rel, RelB	Morais et al. (2010) (37)
Pacientes com CCR primário	↑p65	<u>Matušan-Ilijaš</u> (2011) (38)
Revisão – NF-κβ CCR		Morais et al. (2011) (39)
Modelo ortotópico metastático – linhagem celular Renca	↑ p50	Braga SM et al. (2014) (40)

Os efeitos do bloqueio de NF-κB na indução de apoptose em duas linhagens celulares de CCR (R11 e 444CCR) foram avaliados por An et al, mostrando que a inibição de NF-κB não foi o suficiente para induzir apoptose,

sendo necessária a utilização da droga Bortezomib (41). Moraes et al. também avaliaram o impacto da inibição de NF- κ B no adenocarcinoma renal. Ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que quando linhagens celulares de CCR foram tratadas com ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) a expressão de NF- κ B foi inibida e, conseqüentemente, a viabilidade celular e a proliferação diminuíram (36).

As células tumorais expressam altos níveis de atividade constitutiva de NF- κ B, levando ao aumento de sobrevivência via antagonismo das vias apoptóticas. Este fator de transcrição está relacionado na resistência celular à radiação e à quimioterapia (39), seu sinal ativado produz vários genes associados a proteínas anti-apoptóticas e modulação da regulação do ciclo celular. Um estudo verificou que em linhagens celulares de câncer de próstata (DU145, PC3 e LNCaP) a exposição à radiação conduz a um aumento na atividade de NF- κ B (40) e outro, posteriormente, mostrou que a inibição de NF- κ B por um mutante I κ B dominante aumentou a apoptose em células DU145, sugerindo que o NF- κ B desempenha papel fundamental na resistência adaptativa à radiação ionizante (41).

1.4 RNA de interferência (shRNA)

Na oncologia, a estratégia da técnica de RNA de interferência (RNAi) vem sendo empregada para entendimento do envolvimento de genes em vias de sinalização celular importantes na carcinogênese. O RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico pós-traducional, presente na maioria dos eucariotos, no qual uma fita dupla de RNA (dsRNA) é o fator inicial do silenciamento pós-

transcricional (36,42). *In vitro*, o bloqueio da expressão pós-transcricional de um gene pode ser realizado com o uso de pequenos siRNAs sintetizados quimicamente (siRNA – *small interfering RNA*) ou através de clonagem dessas sequências em vetores plasmidiais (shRNA – *short hairpin RNA*). Os vetores de interferência shRNA têm sido desenvolvidos usando-se os promotores da RNA polimerase III tais como o U6 e o H1 para coordenar a expressão de pequenos grampos de RNA que regulam de maneira estável a expressão em células de mamíferos via RNAi (43,44). Os vetores plasmidiais quando transfectados ou transduzidos (utilização de partículas virais) em células alvo, promovem a expressão de RNA de fita dupla na forma de grampos (shRNA) que são processados pela enzima DICER, ativando o complexo RISC com subsequente degradação do RNA alvo (Figura 6).

Figura 6. Mecanismo do RNAi. RNAs dupla-fita são processados pela enzima Dicer e os siRNAs incorporados ao complexo RISC e abertos. A fita antisense do duplex guia o complexo até o mRNA alvo, degradando-o

Fonte: Hammond, S M et al. (2001) (45).

Em estudo recente, Braga e colaboradores demonstraram que o tratamento com endostatina resultou em uma redução significativa da expressão de p50. A análise de imunoprecipitação confirmou a presença do complexo p50/Bcl-3 em extratos nucleares de células de câncer de pulmão metastático, sugerindo um papel importante de dímeros de p50 na regulação transcricional de genes em CCRcc (40). No presente trabalho, foi avaliado o efeito da baixa regulação de NF- κ B1 na proliferação, radiosensibilidade e crescimento tumoral em células de CCR.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da regulação negativa do gene NF- κ B1 na tumorigênese de células de adenocarcinoma renal murinas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da regulação negativa do gene NF- κ B1 na atividade proliferativa, *in vitro* e *in vivo* da linhagem celular Renca.
- Avaliar o impacto da regulação negativa do gene NF- κ B1 na radiosensibilidade da linhagem celular Renca.

3 Materiais e Métodos

Para a execução deste trabalho, primeiramente foram feitas as técnicas para a obtenção das células com baixa expressão do gene NF- κ B1 e, após isso, foram feitos diversos ensaios funcionais para verificar o efeito desta baixa regulação nas células Renca.

3.1 Silenciamento do gene NF- κ B1

3.1.1 Cultura celular

A linhagem celular Renca (carcinoma renal espontâneo de camundongos Balb/c) foi obtida através da American Type Culture Collection (ATCC) (catálogo nº CRL-2947™, Manassas, VA, USA). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (catálogo nº 31800-014, Gibco® Invitrogen, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (catálogo nº 12657-029, Gibco® Invitrogen, NY, USA), 2 mM de glutamina (Life Technologies, NY, EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco® Life Technologies, NY, EUA), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco® Life Technologies, NY, EUA), 100 mg/mL de penicilina/streptomicina (catálogo nº 12140-122, Gibco® Invitrogen, NY, EUA) e tamponado com 44 mM de bicarbonato de sódio (Synth, SP, Brasil) em estufa úmida a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

A linhagem HEK293T, células epiteliais humanas de origem renal foi doada gentilmente pelo Dr. Bryan Strauss do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Estas células foram cultivadas em meio DMEM-High Glucose (Life Technologies, NY, EUA), suplementado com 10% de SFB (Life Technologies, NY, EUA), 4 mM de L-glutamina (Life Technologies, NY, EUA), 100 mg/mL de

penicilina/streptomicina (Gibco® Life Technologies, NY, EUA) e 44 mM de bicarbonato de sódio (Synth, SP, Brasil) em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

3.1.2 RNA de interferência

Vetores lentivirais shRNA para o *knockdown* do gene NF-κB1 (Tabela 4) e o vetor controle pLKO.1 foram adquiridos através do sistema Mission® shRNA lentiviral plasmids (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

Tabela 4. Sequências “antisense” dos vetores plasmidiais para o gene NF-κB1

Clones	Sequência
(sh1)TRCN0000	5´-
009510	CCGGGCAGGGTCACTCGATTTCATTCTCGAGAATGAAATCGA GTGACCCTGCTTTTT-3´
(sh2)TRCN0000	5´-
009511	CCGGGCAGGTATTTGACATACTAACTCGAGTTTAGTATGTCA AATACCTGCTTTTT-3´
(sh3)TRCN0000	5´-
009512	CCGGCCCACTGCTATCTCTGAACAACTCGAGTTGTTTCAGAGAT AGCAGTGGGTTTT-3´
(sh4)TRCN0000	5´-
009513	CCGGGCACCATAAACACCAAATTTACTCGAGTAAATTTGGTGT TTATGGTGCTTTTT-3´

3.1.3 Curva de resistência à puromicina

Para determinar a concentração ideal do antibiótico puromicina (catálogo nº A1113803, Invitrogen, NY, EUA) utilizado na seleção das células

transduzidas com as partículas virais, 5×10^4 células Renca foram semeadas em placa de 6 poços e após 3 dias adicionado antibiótico nas seguintes concentrações: 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, ficando por 5 dias em contato com as células.

3.1.4 Transformação bacteriana por choque térmico

Bactérias DH5-α quimicamente competentes (catálogo nº 18265-017, Invitrogen, NY, EUA) foram utilizadas para amplificação dos plasmídeos pLKO.1 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), pSPAX2 (ψ PSI)-Addgene plasmid (catálogo nº #12260, Cambridge, MA, UK) e pCMV-VsVg-Lawrence Berkeley Laboratory (catálogo nº #8454, Cambridge, MA, USA). O pLKO.1 (vetor vazio) foi utilizado como controle negativo e os plasmídeos pSPAX2 e pCMV-VsVg na produção das partículas lentivirais como sinal de empacotamento e codificador do envelope lentiviral, respectivamente. Estes últimos foram gentilmente doados pelo Dr. Bryan Strauss, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Para a transformação bacteriana foram adicionados DNA plasmidial em uma solução de células bacterianas na concentração de 2 ng/ µL. Essa solução foi mantida por 30 minutos a 4°C e após essa incubação realizou-se o choque térmico: 20 segundos em banho-maria a 42°C e 2 minutos em gelo.

Para finalizar, foram adicionados 950 µl de meio Luria Bertani-LB líquido (catálogo nº 10855-001 Gibco® Life Technologies, NY, EUA) e as bactérias foram mantidas em incubadora por 1 hora a 37°C com agitação de 225 rpm.

3.1.5 Cultura bacteriana

A partir da suspensão bacteriana foi realizado o plaqueamento em LB Agar (catálogo nº 22700-025 Gibco® Life Technologies, NY, EUA) com 50 µg/mL de ampicilina e incubou-se por 16 horas a 37°C em estufa microbiológica.

A partir de uma colônia de bactérias foi feito um pré-inóculo em 2 mL de meio LB líquido com 50 µg/mL de ampicilina, deixando em incubadora por 8 horas a 37°C e agitação de 200 rpm. Posteriormente, o volume foi completado para 100 mL de meio LB líquido com antibiótico na mesma concentração e ficou incubando por mais 16 horas nas mesmas condições.

3.1.6 Extração de DNA plasmidial

A extração foi realizada com o kit NucleoBond® Xtra Mid (catálogo nº 740410.50 Macherey-Nagel, Mountain View, CA), seguindo as instruções do fabricante. O pellet bacteriano foi ressuspendido em Buffer RES+RNase A e a lise feita com o LYS. Para a separação de debris celulares foi feita a neutralização com o Buffer NEU e transferido para a coluna já equilibrada. A coluna foi lavada com o Buffer EQU, coletando-se o precipitado. O filtro foi lavado com o Buffer WASH e a eluição feita em 5 mL do Buffer ELU. A precipitação foi feita adicionando-se isopropanol seguido de uma centrifugação de 15000 g por 30 minutos a 4°C. Lavou-se com álcool 70% e centrifugou-se novamente. Por fim, o pellet foi diluído em água depec e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

3.1.7 Transfecção

Células HEK293T foram semeadas em placa de 6 poços (3×10^5 células) e mantidas em condições de crescimento por 24 horas. Foi preparada uma solução contendo 5 µg do DNA plasmidial, 3,25 µg do vetor pSPAX2, 2,5 µg do pCMV-VsVg e meio DMEM puro totalizando 250 µL. Como reagente de transfecção foi utilizado Lipofectamina® 2000 (catálogo nº 11668027, Invitrogen, NY, EUA) diluída 1:25 em meio DMEM puro em volume final de 250 µL e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente e adicionada à primeira solução, incubando por 20 minutos em temperatura ambiente. A solução final foi adicionada aos poços da placa contendo as células HEK293T. Ficou em contato por 4 horas, agitando-se suavemente a cada 30 minutos. Após esse período, 1,5 mL de meio DMEM 10% SFB foi acrescentado em cada poço. Após 48 horas de transfecção, o meio foi coletado e armazenado a -80°C .

3.1.8 Transdução das células Renca

Células Renca em primeira passagem foram semeadas (5×10^4 células) em placa de 6 poços e mantidas por 24 horas. Após esse período, o meio foi substituído por um mix contendo 28% de meio RPMI com 10% SFB, 71% de meio contendo as partículas virais coletadas e 1% de polibreno – Hexadimethrine Bromide (107689-10G Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), em um volume final de 700 µL. As células ficaram incubando em estufa por 6 horas e o mix foi substituído por RPMI 10% SFB. Após 48 horas deu-se início à seleção das células Renca transduzidas por puromicina (3 µg/mL). A partir de então, as células foram divididas em 6 grupos: Renca-Selvagem (não foi transduzida com as partículas lentivirais), Renca-Mock (foi transduzida com o vetor vazio

pLKO.1), Renca-sh1, Renca-sh2, Renca-sh3 e Renca-sh4 (transduzidas com lentivirus com sequências diferentes de shRNA para NF- κ B1). A Figura 7 esquematiza as etapas iniciais do silenciamento gênico.

Figura 7: Delineamento experimental *in vitro* até a seleção por puromicina das células Renca transduzidas com os vetores plasmidiais para *knockdown* de NF- κ B1.

A Figura 8 representa as próximas etapas realizadas para avaliar os efeitos do silenciamento gênico.

Figura 8: Delineamento experimental *in vitro* e *in vivo* dos ensaios funcionais para avaliar o efeito do *knockdown* de NF- κ B1 nas células Renca.

3.2 Ensaios funcionais *in vitro*

3.2.1 Extração de RNA

Células cultivadas em placa de Petri de 100 mm com, aproximadamente, 90% de confluência foram lavadas com PBS e adicionou-se 1 ml de TRIzol® Reagent (catálogo nº 15596-018 Life Technologies, NY, EUA). Em seguida, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio e centrifugou a 13500 g por 15 minutos. Foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico à fase aquosa e ficou incubando por 10 minutos em temperatura ambiente seguido de centrifugação.

O sobrenadante foi removido e 500 µL de álcool 75% estéril gelado foi adicionado ao pellet, homogeneizando. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e deixou secando para evaporação do álcool. O pellet contendo RNA foi ressuspensionado com 35 µL de água depec e armazenado a -80°C.

3.2.2 Síntese de cDNA

Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit QuantiTect® Reverse Transcription (catálogo nº 205314 Qiagen, Hilden, Alemanha), iniciando com 2 µg de RNA obtido da extração. Primeiramente, conforme instruções do fabricante, a amostra foi tratada para eliminação do DNA genômico com um mix contendo RNA, o buffer de eliminação e água depec. Ficou incubando em termociclador por 2 min a 42°C e depois no gelo. Preparou-se o segundo mix com o buffer da transcriptase reversa, a enzima e o RT primer, juntamente com o mix de eliminação e ficou por 15 min a 42°C seguido de 3 min a 95°C. O cDNA foi armazenado a -20°C até a corrida do PCR em tempo real.

3.2.3 PCR em tempo real

O gene murino NF-κB1 foi desenhado, fitas forward 5'-GGATGACAGAGGCGTGTATTAGG-3' e reverse 3'-GTAGATAGGCAAGGTCAGAATGCA-5' por meio do site da Applied Biosystems. O programa Primer Express 3.0 foi utilizado para confirmação das sequências no BLAST.

A reação foi realizada com o kit Absolute SYBR Green qPCR Mix® (catálogo nº Invitrogen, NY, EUA). Foi preparado um mix com 3 µL de água depec, 5 µL de SYBR, 1 µL de cDNA, 0,5 µL de cada primer forward e reverse, totalizando 10 µL por reação. Utilizou-se para a amplificação o StepOne Plus®

(Applied Biosystems Company, Carlsbad, CA, EUA) ABI-Prism 7000 e o método de corrida seguiu a seguinte ordem: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C; duas repetições de 15 segundos a 95°C e 1 hora a 60°C (completando 40 ciclos), finalizando com 15 segundos a 95°C.

Após a reação foram coletados os valores do tempo de ciclagem e o gene endógeno tubulina foi utilizado como controle. A determinação do nível de expressão gênica foi realizada através do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (22).

3.2.4 Extração de proteínas

Para a realização da extração, células foram semeadas em placas de 100 mm e permaneceram em cultura até 80% de confluência. Foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se 1 mL de CelLytic™ M (catálogo nº C2978 Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), incubando por 15 minutos em *shaker*. As células foram removidas e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e adicionou-se coquetel inibidor de protease (catálogo nº P2714 Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A quantificação proteica foi determinada através de BSA (catálogo nº #500-0007 Bio-Rad Laboratories, CA, USA), utilizando o kit Bio-Rad. As amostras foram armazenadas a -80°C.

3.2.5 Western blot (WB)

Foi feita eletroforese com gel de resolução de poliacrilamida a 12% e gel de empilhamento a 3%. Utilizou-se 50 µg de proteínas totais para a corrida preparadas com tampão de amostra Laemmli (catálogo nº #161-0737 Bio-Rad, CA, USA) e DTT 1 M na concentração de 1:20. As amostras foram aquecidas

em banho seco por 5 min a 95°C e colocadas no gelo. Para a corrida, foi utilizada uma corrente de 200 v, constante, por aproximadamente 1 hora até que todas as amostras, incluindo o marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards-Kaleidoscope™ (catálogo nº #161-0375 BioRad® Laboratories, San Diego, EUA), corressem todo o gel. Terminada a corrida, foi realizada a transferência úmida com membrana de PVDF Hybond-ECL (Amersham Bioscience®, Pittsborough, EUA) previamente ativada com metanol. A transferência ocorreu por 2h30min a 200 mA (constante) e 300v no gelo. A membrana foi lavada três vezes com TBS 1X e deixada em agitação constante por 1 hora em leite desnatado 5% para bloqueio de reações inespecíficas. Após lavagens, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-NF- κ B1 p105/p50 (ab32360 rabbit monoclonal anti-mouse) e anti- β -actin (ab123020 mouse monoclonal anti-mouse) ambos da marca Abcam (Cambridge, UK) em diluição de 1:500 *overnight* (12-16 horas) a 4°C com agitação, diluídos em leite desnatado a 5%. Após a incubação com anticorpo primário a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X e incubada com anticorpo secundário goat anti-rabbit (sc2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e goat anti-mouse (62-6420, Invitrogen, CA, USA) conjugados com HRP, de acordo com o primário, diluído em leite desnatado a 5% em 1:1000. Ficou incubando por 2 horas em temperatura ambiente sob leve agitação.

Para a revelação utilizou-se o kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, EUA). A fotodocumentação foi realizada utilizando-se o equipamento Alliance 4,7 Uvitec Cambridge do

Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional, ICB III, Universidade de São Paulo ou Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, ICB II.

3.2.6 Imunofluorescência

Para a realização deste ensaio foram semeadas $2,0 \times 10^3$ células por poço em *chambers slides* de 4 poços. As células foram deixadas por 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e fixadas durante 10 minutos com 400 µL de metanol gelado. Após a fixação, foram feitas 3 lavagens com PBS e incubou por 30 minutos em solução de bloqueio de reações inespecíficas e permeabilização em leite a 5% diluído em PBS com 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Após lavagens, as células foram incubadas *overnight* com 200 µL do anticorpo primário em diluição de 1:100 em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com 200 µL do anticorpo secundário diluído 1:100 em câmara úmida escura em temperatura ambiente durante 2 horas. Após a incubação, foram feitas 3 lavagens com PBS e adicionou-se meio de montagem ProLong® Gold com DAPI (catálogo nº P36931 ThermoFisher Scientific), selando as lâminas com lamínulas de vidro. As lâminas foram observadas em microscópio confocal Leica TCS SP8 CARS do Laboratório Multiusuário, Universidade de São Paulo (UNIFESP-SP).

3.2.7 Análise do tempo de dobramento celular

Para a determinação da curva de crescimento celular a partir do tempo de dobramento, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 24 poços e, após 24 horas, foram sincronizadas na fase G0 do ciclo celular por meio da privação

de soro fetal bovino durante 24 horas. Após esse período o meio foi trocado para RPMI 10% SFB, sendo este o ponto 0.

As células foram lavadas com 500 µL de PBS, tripsinizadas com o mesmo volume de tripsina 0,25% EDTA (catálogo nº25200072 Life Technologies, MD, EUA) e deixadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 10 minutos. Foram adicionados 500 µL de meio RPMI 10% SFB e as células foram contadas a partir da exclusão das células mortas por coloração com azul de Trypan (catálogo nº 15250061 Invitrogen, NY, EUA) em câmara de Neubauer.

Os pontos de tempo analisados foram 24, 48, 72 e 96 horas e o tempo de dobramento das células foi obtido através da fórmula (para $\Delta T=1/K$): $K=3.32 \times [(\log_{vf} - \log_{vi})/Tf - Ti]$.

3.2.8 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Células Renca foram tripsinizadas e contadas (utilizou-se 1×10^6 células), lavadas duas vezes com PBS, fixadas em solução de etanol gelado a 75% e mantidas a 4°C durante 24 horas. Após esse período, foram lavadas novamente com PBS e centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente por 2 vezes. Adicionou-se uma solução contendo 50 µg/mL de corante intercalante de DNA iodeto de propídeo (PI) e RNase A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 0,3 mg/mL em volume final de 700 µL. As células foram incubadas por 20 min no escuro em temperatura ambiente e a distribuição do ciclo celular foi analisada no citômetro Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, CA, EUA) do Instituto Butantan CAT-Cepid, LECC - Laboratório Especial de Ciclo Celular, São Paulo, SP. A análise dos dados foi feita a partir do software FlowJo v.10. A média e desvio padrão

das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular foram adquiridos a partir de três experimentos independentes.

3.2.9 Análise de morte celular por citometria de fluxo

Células apoptóticas e necróticas foram determinadas através da marcação com Anexina V-FITC e PI e analisadas por citometria de fluxo. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do kit (catálogo nº: V13242, Life Technologies, CA, USA).

3.2.10 Irradiação das células

Para realizar a irradiação das células Renca, após 24 horas de crescimento normal em cultura celular, as células foram irradiadas com doses de 0 a 15 Gy para determinar a dose subletal para essa linhagem celular. A irradiação foi realizada em temperatura ambiente com fonte ^{60}Co administrada com taxa de dose de 1,47 Gy/min com atenuador de 90% no GammaCell 220 – Atomic Energy of Canada Limited – Commercial Products Irradiation Unit of Canadian – Atomic Energy Commission Ltd. (CTR-IPEN). As células do grupo controle foram cultivadas nas mesmas condições, mas não foram submetidas à irradiação.

3.2.11 Ensaio de sobrevivência clonogênica

Para mensurar a radiorresistência das células Renca foi feito ensaio de clonogenicidade após exposição das células à irradiação. Primeiramente, as células foram semeadas em placas de Petri de 60 mm (triplicata) e permaneceram em cultura por 10 a 14 dias. As colônias foram coradas com Rodamina B 2% + Formaldeído 4% durante 30 minutos, lavadas em água

corrente e o número de colônias sobreviventes foi contado (foram consideradas colônias quando mais de 50 células). A eficiência de plaqueamento (EP) foi calculada considerando-se a seguinte fórmula: $EP = (\text{média de colônias contadas} / \text{número de células semeadas}) \times 100$; a fração de sobrevivência foi: $FS = [EP(\text{amostra}) / EP(\text{controle})] \times 100$. As variáveis de sobrevivência α e β foram definidas de acordo com a equação linear quadrática ($FS = \exp[-\alpha D - \beta D^2]$); D =dose de irradiação e o valor de P foi determinado pelo teste F .

3.2.12 Detecção da viabilidade celular após irradiação

As células Renca em todos os grupos foram irradiadas com dose de 10 Gy e cultivadas a 37°C em 5% de CO₂. Após 24 horas, 10,000 células (100µl) foram semeadas em placa de 96 poços e permaneceram até aderirem à placa. Foram adicionados 20 µl de composto de tetrazólio - CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA) em cada poço e as células foram incubadas por mais 4 horas.

3.3 Ensaios funcionais *in vivo*

3.3.1 Crescimento tumoral

Foram injetadas 5×10^5 células viáveis no subcutâneo dos flancos laterais de camundongos fêmeas Balb/c de 8 a 10 semanas de vida, formando 5 animais de cada grupo. O tumor primário foi medido todos os dias durante o ensaio e o cálculo do volume tumoral foi feito através da fórmula: $\text{medida maior} \times (\text{medida menor})^2 \times 0,5$. Após 17 dias da inoculação os animais foram sacrificados de acordo com o protocolo local (IPEN-CNEN/USP) e os tumores foram pesados e fixados em Methacarn durante 4 horas e deixados em álcool

95% até o momento do emblocamento em parafina. Todos os procedimentos foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAIPEN) sob o número de processo: 162/15.

3.3.2 Determinação da área de necrose tumoral

As análises histológicas foram realizadas em cortes de 4 µm corados com hematoxilina e eosina pela empresa Histotech (São Paulo, SP). Para a determinação da área de necrose tumoral foram tiradas 15 fotomicrografias em microscópio das lâminas coradas com hematoxilina/eosina de cada grupo analisado. Para a quantificação foi utilizado o programa ImageJ.

3.3.3 Imunohistoquímica

Foi feita marcação de imunohistoquímica para o anticorpo Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology). Primeiramente, os tecidos previamente emblocados em parafina foram desparafinizados com banhos de xilol e álcool e imersos em solução citrato (pH 6.0). Os tecidos foram incubados em metanol e peróxido de hidrogênio (3%) 1:1 e, em seguida, com anticorpo primário diluído 1:1000 a 4°C *overnight* e anticorpo secundário biotinilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) a 37°C por 30 min. Após lavagem, solução de 3.3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) foi utilizada para visualizar a marcação. As lâminas marcadas foram avaliadas através de microscópio Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japão.

3.3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados do

presente estudo apresentam média $\pm$ desvio padrão. As diferenças significativas estatisticamente entre os grupos foram obtidas através da análise de variância *One-way ANOVA* seguida do teste de Bonferroni. O critério para significância estatística foi fixado em * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4 Resultados

4.1 Knockdown do gene NF- κ B1

4.1.1 Curva de resistência à puromicina

Para a seleção das células Renca transduzidas com as partículas virais shRNA NF- κ B1 foi feita, primeiramente, uma curva de resistência para determinar a concentração de antibiótico adequada. Foi definida a concentração de 3 μ g/mL de puromicina para a seleção das células Renca, visto que provocou a morte de todas as células em 5 dias, de forma gradativa, sem causar toxicidade (Figura 9).

Figura 9: Células Renca com puromicina. I- 2º dia com antibiótico. II- 5º dia com antibiótico. Concentrações: (A) controle negativo, (B) 1µg/mL, (C) 2µg/mL, (D) 3µg/mL, (E) 4µg/mL, (F) 5µg/mL. Fotos tiradas em microscópio invertido com aumento de 100x

4.1.2 Rendimento e pureza do DNA plasmidial

A concentração do DNA plasmidial de pSPAX2, pCMV-VsVg, Renca-Mock e Rencas-sh1, 2, 3 e 4 foi determinada através do espectrofotômetro Nanodrop ND-2000. O rendimento das extrações variou de 268 ng a 1527,6 ng e a pureza de 1,89 a 1,94 (Tabela 5).

Tabela 5. Rendimento e pureza do DNA plasmidial obtido com o Kit Plasmid DNA purification (740410.50 Macherey-Nagel).

Plasmídeo	Rendimento (ng/μL)	Pureza (260/280)
pSPAX2	1,528	1,92
pCMV-VsVg	0,356	1,89
pLKO.1	1,479	1,92
sh1	0,349	1,94
sh2	0,338	1,92
sh3	0,268	1,89
sh4	0,326	1,92

4.1.3 Transfecção das células HEK293T

Após a incubação das células HEK293T com o mix contendo DNA plasmidial, os vetores pSPAX2 e pCMV-VsVg e meio DMEM puro com o reagente de transfecção lipofectamina, as células foram observadas durante 48 horas quando então foi coletado o meio contendo as partículas virais para ser utilizado na transdução das células Renca. A morfologia das células foi

observada após a transfecção e notou-se que não houve mudança característica em seu fenótipo (Figura 10).

Figura 10: Células HEK 293T após transfecção. (A) controle negativo, (B) pLKO.1, (C) NF- κ B1 sh1, (D) NF- κ B1 sh2, (E) NF- κ B1 sh3, (F) NF- κ B1 sh4. Aumento de 100x.

4.1.4 Transdução das células Renca

A transdução das células Renca foi feita com as partículas lentivirais pLKO.1, sh1, sh2, sh3 e sh4 a partir do meio de cultura das células HEK293T (contendo as partículas) 48 horas após a transfecção juntamente com meio RPMI e polibreno. Após a incubação com esse mix as células ficaram em cultura por 48 horas quando se deu início à seleção por puromicina.

4.1.5 Seleção por puromicina

A seleção das células Renca transduzidas foi feita por puromicina em concentração de 3 µg/mL e teve duração de 5 dias. Após a seleção, as células foram tripsinizadas e amplificadas para os ensaios posteriores.

4.2 Ensaios Funcionais *in vitro*

4.2.1 Rendimento da extração de RNA

A extração de RNA realizada com TRIzol® Reagent teve rendimento que variou de 603 µg a 1936,8 µg, conforme a tabela a seguir (Tabela 6):

Tabela 6. Rendimento e qualidade dos RNAs extraídos com TRIzol® Reagent.

Amostra	Rendimento (µg/µL)	Pureza (260/280)
Renca-Selvagem	1553,8	2,02
Renca-Mock	1553,8	2,02
Renca-sh1	1936,8	2,00
Renca-sh2	1047,7	2,02
Renca-sh3	1139,1	2,06
Renca-sh4	603,0	1,96

4.2.2 Avaliação dos níveis de expressão gênica

A produção de RNAm da p50 foi avaliada através da técnica de RT-PCR. Todos os grupos apresentaram diminuição significativa da expressão do RNAm em relação ao controle Renca-Mock (Figura 11). A Renca-sh1 apresentou 65,00 ± 0,07% de redução da expressão da p50; o grupo Renca-sh2 teve 71,18 ± 0,05% de redução; Renca-sh3 56,44 ± 0,11% e a Renca-sh4

apresentou 76,40% de redução. Todos comparados com Renca-Mock (**P<0.001).

Para os ensaios posteriores, foram selecionados apenas os grupos Renca-sh2 e Renca-sh4. Não houve diferença estatisticamente significativa na redução da expressão de RNAm da p50 entre estes dois grupos.

Figura 11: Quantificação relativa do gene NF- κ B1 normalizado pelo gene endógeno tubulina. A técnica de RNA de interferência possibilitou significativa redução do RNAm da p50 dos grupos analisados (**P<0.001). Análise de variância One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni; programa GraphPad Prism 6.0.

4.2.3 Avaliação dos níveis de expressão proteica por Western blot

A expressão da proteína p50 foi verificada em extratos proteicos totais das células Renca-Selvagem, Renca-Mock, Renca-sh2 e Renca-sh4. Os resultados mostraram que houve redução significativa dos níveis proteicos: Renca-sh2 de $2,09 \pm 0,17$ vezes (*P<0.05 vs Renca-Mock) e Renca-sh4 de $6,90 \pm 0,06$ vezes (**P<0.01 vs Renca-Mock). As bandas de proteínas (Figura

12A) foram analisadas por densitometria e os valores estão representados na Figura 12B.

Figura 12. Western blot da p50 normalizado por β -actina dos grupos controle e Renca shRNA NF- κ B1. (A) Observa-se diminuição da expressão proteica de p50 em Renca-sh2 e Renca-sh4 em relação à Renca-Mock. (B) A análise estatística dos dados comprovou a significância dessa redução: Renca-sh2 (* P <0.05 vs Renca-Mock) e Renca-sh4 (** P <0.01 vs Renca-Mock).

De acordo com estes resultados, a técnica de RNA de interferência *short hairpin RNA* causou baixa regulação do gene NF- κ B1, resultando na diminuição da expressão da proteína p50 quando comparada com a expressão do grupo controle transduzido com vetor vazio (Renca-Mock).

4.2.4 Análise por Imunofluorescência

A expressão da proteína p50 também foi avaliada por imunofluorescência, validando os resultados obtidos por Western blot. Foi observada marcação positiva em todos os grupos analisados, no entanto, intensidade de sinal menor nos grupos *knockdown* para p50 em relação aos controles Renca-Mock e Renca-Selvagem (Figura 13). A localização em todos os grupos foi, em grande parte, citoplasmática.

Figura 13: Representação de p50 por imunofluorescência das células Renca-Selvagem, Renca-Mock e Rencas sh2 e sh4. As imagens foram submetidas aos filtros de excitação para luz azul (DAPI) e luz vermelha (ficoeritrina) seguido de sobreposição.

4.2.5 Tempo de dobramento celular

Para verificar se a baixa regulação de NF- κ B1 afetou o crescimento das células Renca, a proliferação celular foi avaliada em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Os resultados mostraram diminuição significativa da proliferação das células com baixa expressão da p50 em 48, 72 e 96 horas comparado com as células Renca-Mock. Os tempos de dobramento celular foram: Renca-Selvagem 21,40 horas, Renca-Mock 21,85 horas, Renca-sh2 28,70 horas (**P<0.01 vs Renca-Mock) e Renca-sh4 27,01 horas (**P<0.01 vs Renca-Mock). A Figura 14 mostra o perfil de crescimento dos grupos analisados, podendo observar a diferença entre eles. Na análise em cada ponto também foi observada diferença significativa (**P<0,01) entre Renca-sh2 e Renca-sh4 em relação à Renca-Mock.

Figura 14. A baixa regulação da p50 provocou atraso no tempo de dobramento das células Renca. Os resultados representam o número médio de células $\pm$ erro padrão (**P<0.01 vs Renca-Mock; Mann-Whitney U-test).

4.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A distribuição das células pelas fases do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo. O perfil de dispersão das células, avaliando granulosidade (SSC-A) por tamanho (FSC-A), foi observado para determinar o *gate* considerado nas análises (Figura 15A). A marcação por iodeto de propídeo (PI) foi analisada pelo filtro BL3-A, determinando a distribuição das fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular (Figura 15).

Figura 15. Efeito da baixa regulação do gene NF- κ B1 na distribuição do ciclo celular em células Renca. Esta condição provocou redução significativa da porcentagem de células na fase S ($***P<0.001$) e consequente aumento em G2/M ($**P<0.01$) do clone Renca-sh4 em relação ao controle Renca-Mock. (A) População analisada, (B) Renca-Mock, (C) Renca-Selvagem, (D) Renca-sh2, (E) Renca-sh4.

Através da análise feita pelo software FlowJo, verificou-se redução da porcentagem de células na fase S do grupo Renca-sh4. A Renca-Selvagem apresentou $17,70 \pm 0,33\%$ das suas células em S; a Renca-Mock apresentou $16,33 \pm 1,23\%$ e a Renca-sh4 $12,91 \pm 0,91\%$ ($***P < 0.001$ vs Renca-Mock). Não houve diferença entre a fase mencionada e o clone Renca-sh2 (Tabela 7).

Observou-se também aumento do número de células na fase G2/M, com diferença significativa no grupo Renca-sh4 comparado com Renca-Mock. A Renca-Selvagem apresentou $17,70 \pm 0,76\%$ de suas células em G2/M, a Renca-Mock $18,81 \pm 4,39\%$ e a Renca-sh4 $27,53 \pm 2,51\%$ ($**P < 0.01$ vs Renca-Mock).

Tabela 7 - Médias das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular com desvio padrão e valor de P vs Renca-Mock.

	G1 (%)	P	S (%)	P	G2/M (%)	P
Renca-Selvagem						
Renca-Mock	$64,59 \pm 0,42$	0,938	$17,70 \pm 0,33$	0,111	$17,70 \pm 0,76$	0,685
Renca-sh2	$64,85 \pm 5,23$	-	$16,33 \pm 1,23$	-	$18,81 \pm 4,39$	-
Renca-sh4	$59,65 \pm 1,46$	0,093	$16,78 \pm 2,85$	0,736	$23,90 \pm 3,08$	0,057
	$59,55 \pm 1,88$	0,061	$12,91 \pm 0,91$	0,001	$27,53 \pm 2,51$	0,003

4.2.7 Análise de morte celular por citometria de fluxo

As células Renca foram tripsinizadas e analisadas para apoptose e necrose utilizando o ensaio de citometria de fluxo com marcação de Anexina V/PI. Como mostra a Figura 16, a porcentagem de apoptose/necrose tardia nas células Renca-Selvagem e Renca-Mock foi de $6,17 \pm 0,72\%$ e $5,44 \pm 0,63\%$, respectivamente, o que foi significativamente menor quando comparada à Renca-sh4 ($8,96 \pm 3,07\%$, $P < 0,05$), indicando que o *knockdown* do gene NF- κ B1 leva ao aumento significativo nos níveis de apoptose basal de células Renca.

Figura 16. *Knockdown* de NF- κ B1 promove apoptose/necrose tardia em linhagem celular Renca. (A) Diagrama da citometria de fluxo das células Renca após marcação com Anexina-V-FITC (AnexV) e Iodeto de Propídeo (PI) mostrando: Q1: células mortas; Q2: apoptose tardia; Q3: apoptose precoce; Q4: células normais. (B) Análise de citometria de fluxo das células Renca. Dados representam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado com os grupos controles. Análise estatística utilizada foi one-way ANOVA seguida de teste Bonferroni.

4.2.8 A baixa regulação de NF- κ B1 aumenta a radiosensibilidade das células Renca

Para verificar o perfil da radiosensibilidade dos grupos Renca-Selvagem, Renca-Mock e Renca-shRNA-NF- κ B1 as células foram submetidas a diversas doses de radiação (2-10 Gy) e avaliadas por ensaio de sobrevivência clonogênica. Conforme ilustrado na Figura 17, o número de colônias sobreviventes dos grupos controle foi maior que o grupo Renca-sh4.

Figura 17. Representação da sobrevivência clonogênica dependente da dose de radiação de 0 a 10 Gy dos grupos controle Renca-Selvagem e Renca-Mock em comparação com o grupo que recebeu o vetor *knockdown* para NF- κ B1.

As células Renca *knockdown* para NF- κ B1 se apresentaram mais radiosensíveis em comparação com os grupos controles ($P < 0,001$ vs Renca-Mock). A razão α/β foi maior em Renca-shRNA-NF- κ B1 (sh4): -0.177 ± 0.677 comparada com 7.368 ± 1.833 e 11.960 ± 5.240 da Renca-Selvagem e Renca-Mock, respectivamente entre os grupos Renca-Selvagem e Renca-Mock. A dose letal 50% (LD50) da Renca-Selvagem foi 3.33 Gy e Renca-Mock foi 3.288 Gy, enquanto para o grupo Renca-shRNA-NF- κ B1 foi de 2.08 Gy (Figura 18).

Figura 18. Frações de sobrevivência das células Renca medidas pelo ensaio de formação de colônias e analisadas pela curva de regressão não-linear.

4.2.9 Efeitos da irradiação na viabilidade celular

A viabilidade celular do grupo Renca-shRNA-NF- κ B1 foi significativamente menor comparada com os grupos controle, com redução de $16.75 \pm 0.06\%$ vs Renca-Mock ($P < 0.001$) (Figura 19).

Figura 19. A viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTS após 24 horas de irradiação gama a 10 Gy. São mostrados os grupos controle e *knockdown* para NF- κ B1. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (Teste Bonferroni; $***P \leq 0.001$ comparado com Renca-Mock).

4.2.10 Mecanismo molecular do impacto do gene NF- κ B1 nas células Renca

Para elucidar o mecanismo molecular por meio do qual NF- κ B1 regula a proliferação das células CCR, a expressão de p21, Ciclina B1, Bax e Bcl-2 que estão envolvidas na progressão do ciclo celular e morte celular, foi avaliada.

Análise de Western blot revelou que o *knockdown* de NF-κB1 leva ao aumento da expressão de p21, Ciclina B1 e Bax comparado com o grupo controle, enquanto a expressão de Bcl-2 diminui (Figura 20). A razão Bax/Bcl-2 aumentou em Renca-shRNA-NF-κB1 5.64 ± 0.33 vezes comparada com o grupo controle Renca-Mock ($P < 0.05$), indicando que tanto Bax quanto Bcl-2 são ativos na resposta das células Renca à apoptose e que o *knockdown* de NF-κB1 desregula a razão entre essas proteínas.

Figura 20. Efeito do *knockdown* de NF-κB1 na expressão de reguladores do ciclo celular. (A) Níveis de expressão das proteínas p21, Cyclin B1, Bax e Bcl-2 foram detectados por western blot. (B) Análise quantitativa dos níveis de proteína utilizando o programa ImageJ 1.6.0_24 e normalizado com GAPDH. (C) Aumento na razão Bax/Bcl-2 dos níveis de proteína para as células Renca com menor expressão de NF-κB1. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Renca-Mock.

4.3 Ensaios funcionais *in vivo*

4.3.1 A baixa regulação de NF-κB1 inibiu carcinoma renal de células claras em camundongos Balb/c

O ensaio tumorigênico *in vivo* revelou que o crescimento tumoral foi significativamente reduzido nos camundongos Balb/c inoculados com células Renca-sh2 e Renca-sh4 comparado com os grupos controle (Figura 21).

Figura 21. Efeito do *knockdown* de NF-κB1 em camundongos Balb/c inoculados no subcutâneo com células Renca selvagens ou transduzidas com shRNA para NF-κB1 ou com vetor vazio. (A) Renca-Selvagem, (B) Renca-Mock, (C) Renca-sh2 e (D) Renca-sh4. A imagem representa a formação do tumor primário.

No dia do sacrifício, o grupo Renca-sh4 apresentou média do volume tumoral de $367,51 \pm 40,57 \text{ mm}^3$, enquanto a Renca-Selvagem apresentou

979,29 $\pm$ 235,47 mm³ e Renca-Mock 718,19 $\pm$ 89,37 mm³. Ao longo do experimento, foi encontrada diferença significativa no volume tumoral nos dias 11, 13 e 16 ($P < 0.05$ vs Renca-Mock), conforme apresentado na Figura 22.

Figura 22. Curvas de crescimento do volume tumoral, mostrando diferença significativa entre Renca-sh2 e Renca-sh4 com o controle Renca-Mock (* $P < 0.05$) nos dias 11, 13 e 16.

As médias dos pesos dos tumores primários extraídos estão mostradas na Figura 23. O grupo Renca-sh4 apresentou peso significativamente menor comparado ao controle Renca-Mock (* $P < 0.05$).

Figura 23: Gráfico dos pesos dos tumorais primários extraídos de camundongos Balb/c inoculados com células Renca tratadas e não tratadas. O grupo Renca-sh4 apresentou um peso tumoral significativamente menor ($*P<0.05$) que o grupo controle Renca-Mock.

4.3.2 Quantificação de necrose tumoral

Fragmentos dos tumores subcutâneos foram corados com HE e analisados quanto à área de necrose tumoral. Houve diferença significativa entre o grupo controle Renca-Mock e os grupos Renca-sh2 ($*P<0,05$) e Renca-sh4 ($**P<0,01$) (Figura 24).

Figura 24: Fotomicrografias dos tecidos dos tumores primários corados com hematoxilina/eosina mostrando as áreas necróticas. (A) Renca-Selvagem (B) Renca-Mock (C) Renca-sh2 (D) Renca-sh4. Aumento de 100x.

Na Figura 25 estão representados os valores médios das porcentagens de áreas necróticas para cada grupo com seu respectivo desvio padrão.

Figura 25: As áreas de necrose tumoral dos grupos submetidos ao *knockdown* do NF- κ B1 foram significativamente maiores que o controle. O gráfico ilustra a diferença entre as áreas dos grupos controle e Rencas shRNA e a tabela apresenta os valores das médias $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes.

4.3.3 Determinação da proliferação através de marcação com Ki-67

A análise de imuno-histoquímica foi feita para confirmar o efeito do *knockdown* do gene NF- κ B1 na proliferação das células Renca. Os resultados mostraram que a marcação do Ki-67 foi significativamente reduzida no grupo Renca-shRNA-NF- κ B1 quando comparada com os outros dois grupos controle ($P<0.05$) (Figura 26).

Figura 26: Seções de tumor primário foram marcadas com Ki-67, verificando que a expressão do anticorpo Ki-67 foi reduzida no grupo com menor expressão de NF- κ B1.

O gráfico mostra a quantificação da marcação com o anticorpo Ki-67, identificando que o tratamento causando a diminuição da expressão de NF- κ B1 reduz a proliferação celular em células Renca (Figura 27).

Figura 27: Análise quantitativa da marcação com Ki-67. O grupo Renca-shRNA-NF- κ B1 teve marcação reduzida comparado com o controle Renca-Mock (* $P < 0.05$). A análise estatística foi feita usando one-way ANOVA seguido do teste Bonferroni.

5 Discussão

O carcinoma de células renais vem sendo correlacionado com a ativação do NF- κ B, uma família que compreende um conjunto de fatores de transcrição gênica que estão relacionados com aspectos oncogênicos como proliferação, ciclo celular e controle de apoptose (46), interferindo no CCR no que diz respeito à angiogênese, proliferação celular, resistência à quimioterapia e apoptose, conferindo-lhe fenótipo agressivo (19,32,38).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do *knockdown* mediado por lentivírus do gene NF-κB1 na proliferação celular *in vitro* e no crescimento tumoral *in vivo*. NF-κB1 é amplamente interligado em processos de desenvolvimento e progressão tumoral por inibição de apoptose, progressão do ciclo celular, promover metástase e angiogênese (47). O presente estudo mostrou evidências a respeito do papel do gene NF-κB1 como potencializador de crescimento tumoral em linhagem celular de adenocarcinoma renal murino e *in vivo* em camundongos Balb/c através da alteração do microambiente tumoral.

. A técnica de RNA de interferência para *knockdown* da p50 ocasionou uma atenuação na taxa de proliferação celular, impactando o ciclo celular da linhagem Renca, mostrando que NF-κB1 pode ser um alvo terapêutico para o tratamento do CCR.

RNAi é uma técnica promissora para o desenvolvimento de terapias com silenciamento gênico. Os vetores lentivirais são eficientes na entrega e estabilização do gene de interesse (48). As duas sequências shRNA para NF-κB1 (Renca-sh2 e Renca-sh4) resultaram na diminuição dos níveis de RNA mensageiro de p50 de maneira semelhante.

Na análise de Western blot para verificar a efetividade da técnica de silenciamento (regulação negativa da p50), foi observada uma redução da expressão da proteína p50 em, aproximadamente, 76.5% para o grupo Renca-sh4 (vs Renca-Mock) e 47% para Renca-sh2 (vs Renca-Mock). Essas porcentagens corroboram com os dados de Qin e Cheng (49), em que obtiveram entre 55 a 77% de *knockdown* do gene através da mesma técnica.

Já para Li et al. (50), esta técnica apresentou resultados mais significativos (entre 87 e 94%) com o *knockdown* do gene Notch2.

Nossos resultados mostram que a técnica shRNA foi eficaz para o *knockdown* estável de NF- κ B1 em Renca, mantendo o fenótipo ao longo dos ensaios funcionais.

Ensaio funcionais para verificação do impacto que o *knockdown* de NF- κ B1 teve nas células Renca foram realizados, e verificou-se que este tratamento resultou na inibição da proliferação celular de maneira dependente do tempo. Chen e colaboradores demonstraram que o polimorfismo do gene NFKB1 (rs4648068) está associado com proliferação celular e motilidade em câncer de intestino. Eles demonstraram que o genótipo GG leva ao aumento dos níveis de p105/p50 e aumenta a proliferação celular e motilidade quando comparado com o genótipo AA (51).

O componente principal na regulação do ciclo celular é o controle da indução e repressão de reguladores em cada estágio (G0/G1, S ou G2/M). A ligação entre NF- κ B e ciclo celular foi primeiramente descrita em 1991 quando foi verificado aumento da expressão do gene durante a transição de G0/G1 em fibroblastos murinos (52). NF- κ B também já foi indicado por induzir parada no ciclo celular por Joyce D (53).

Para verificar a relação causal entre os baixos níveis de NF- κ B1 e a inibição da proliferação celular, foi feito ensaio da distribuição do ciclo celular e pôde-se observar uma parada significativa na fase G2/M, a qual é controlada por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas. Esse aumento do número de células em G2/M foi acompanhado pela diminuição do número de células nas

fases S e G0/G1. De acordo com Fuster et al. (54) o supressor tumoral p53 e outros genes que fazem parte da via p21waf1 podem inibir ciclina-CDK e induzir parada no ciclo celular.

Além disso, estas células foram analisadas para marcação de Anexina V/PI por citometria de fluxo e foi verificado aumento de células em apoptose/necrose. Estes dados corroboram com os achados de Yonghui Yu e colaboradores que descreveram participação de dímeros de p50 na proliferação celular e vias de sinalização anti-apoptóticas (55). Naugler e Karin (56) identificaram ativação de NF- κ B como fator de transcrição pró-sobrevivência por desencadear evasão de apoptose pelas células.

Para explorar o mecanismo molecular que ocasionou apoptose/necrose tardias em células Renca mediadas pela regulação negativa de NF- κ B1, foi feita análise de Western blot e verificado aumento significativo de Ciclina B1 e Bax, enquanto a expressão de p21 foi levemente alterada para níveis maiores. Estudos anteriores reportaram acúmulo de Ciclina B1 na fase G2/M com aumento de apoptose, como demonstraram Zaffaroni e colaboradores que esta inabilidade das células Renca de progredir com o ciclo celular, saindo da fase G2/M pode ser explicada admitindo que o complexo Ciclina B1- cdc2 é confinado no compartimento citoplasmático quando NF- κ B1 é suprimido (57). A Ciclina B1 possui sítio de ligação de NF- κ B em seu promotor e sua expressão já foi correlacionada com NF- κ B (58,59).

A regulação negativa da p50 alterou a capacidade clonogênica das células Renca quando submetidas à irradiação ionizante, mostrando efeito sinérgico entre a técnica de silenciamento com a radioterapia. Além disso,

esses tratamentos conjugados interferiram no metabolismo das células, especificamente na respiração mitocondrial, avaliada pelo ensaio de MTS. Estes resultados corroboram com Huang e colaboradores (60) que também observaram eficiência no tratamento conjugado com radioterapia para linhagem celular de carcinoma renal. Neste estudo, verificaram que o tratamento de camundongos Balb/c com células dendríticas juntamente com a radioterapia levou à regressão tumoral, além do aumento de apoptose das células Renca.

Sandur et. al. mostraram que a ativação de NF- κ B causa resposta pró-adaptativa após radiação em células de câncer retal, sendo responsável pelo desenvolvimento da radiorresistência (44).

Para avaliar o papel de NF- κ B1 no crescimento tumoral, células shRNA para NF- κ B1 foram injetadas em camundongos Balb/c. As células Renca-Mock apresentaram um padrão de crescimento tumoral, enquanto as tratadas apresentaram supressão do crescimento, o que foi indicado tanto através da curva de crescimento feita pelo cálculo do volume tumoral quanto pelo peso do tumor primário. Ogushi et al. (61) obtiveram resultados semelhantes com o silenciamento do gene EBAG9 em células Renca.

Existem fatores considerados como marcadores prognósticos para o CCR, como sintomas do paciente, estadió e tamanho do tumor. Também há relatos de estudos que demonstram a necrose tumoral como um importante marcador de prognóstico, mesmo não sendo totalmente elucidado o seu papel na progressão do câncer. A marcação de hematoxilina e eosina nos cortes tumorais de Renca-shRNA-NF- κ B1 revelou extensas áreas necróticas comparadas com os grupos controle. Quando inoculadas em camundongos,

pôde-se detectar que estas apresentaram 2,5 vezes de aumento de necrose em relação às células Renca Mock. Para Sengupta et al. (62), o aspecto necrose tumoral deveria ser usado na avaliação clínica e constantemente relatado. Neste estudo, o grupo avaliou pacientes que haviam sido submetidos à cirurgia para CCR e verificou que a taxa de risco de morte em pacientes com necrose teve uma significância de $P < 0,001$. O aumento significativo de áreas necróticas nos extratos tumorais de Renca com baixa expressão de NF- κ B1 também pode indicar o papel deste gene na angiogênese através de fatores de crescimento ou citocinas. VEGF é um dos fatores relacionados à progressão tumoral do CCR e mutações no gene supressor tumoral VHL, que são frequentemente observadas no CCR hereditário e CCRcc esporádico, resulta na superprodução de VEGF por um mecanismo que envolve o fator HIF α (A, B).

Estes dados são consistentes com os resultados do ensaio de Anexina V/PI assim como com os níveis aumentados de Bax, pois este regula a necrose celular primária mediante mecanismo independente de apoptose (63). A marcação imunohistoquímica das células Renca para Ki-67, um marcador de proliferação celular para diversas malignidades, incluindo o CCRcc, corrobora com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* (64).

O NF- κ B1 já foi enfatizado como um potencial alvo para terapia do câncer, pois apresenta correlação em vias de apoptose (o NF- κ B modula a expressão de genes influenciando nas vias de sinalização envolvendo inibição de apoptose) e também nas vias de proliferação celular (65), o que mostra a importância de cada vez mais estudos envolvendo NF- κ B1 e a progressão do câncer.

6 Conclusões

A técnica de silenciamento gênico pós-traducional RNA interferente possibilitou uma baixa regulação do gene NF- κ B1, constatada na diminuição do RNA mensageiro pelo PCR real time e consequente diminuição da proteína p50 verificada pelo Western Blot.

O *knockdown* da p50 resultou em alteração do ciclo celular das células Renca, causando uma parada na fase G2/M, indicando que a p50 tem participação no controle desta fase do ciclo celular. Além disso, a terapia gênica levou ao aumento do tempo de dobramento celular. Este resultado corroborou com o ensaio *in vivo*, em que se pôde observar um crescimento tumoral mais lento nos grupos *knockdown* para p50. Além disso, houve um aumento da área de necrose tumoral, indicando que a baixa regulação da p50 nas células Renca leva a uma ativação de via de morte celular causada por necrose.

Estudos prévios mostraram que vários compostos podem melhorar a resposta à radiação das células de mamíferos, aumentando a letalidade da radiação. A combinação de tratamentos podem melhorar as taxas de sobrevida global em muitos tipos de tumor. A regulação negativa da p50 alterou a viabilidade basal das células Renca que, quando submetidas à irradiação ionizante, apresentaram pouca capacidade de formação de colônias e baixa atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio de MTS, sugerindo que NF- κ B1

pode ser um alvo de terapia conjugada com radioterapia e/ou um potencial biomarcador patológico para o carcinoma de células renais.

7 Referências bibliográficas

1. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.
2. Lopez-Beltran, A., Carrasco, J. C., Cheng, L., Scarpelli, M., Kirkali, Z., & Montironi, R. (2009). 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *International Journal of Urology*, 16(5), 432-443.
3. Nardi, A. C., Zequi, S. D. C., Clark, O. A., Almeida, J. C., & Glina, S. (2010). Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. *International braz j urol*, 36(2), 151-158.
4. Scher, H. & Motzer R. Carcinoma de vejiga y de células renales. *Harrison, Principios de Medicina Interna*. 16ª ed. Mc Graw Hill. México. 2006. Pp 604-609.
5. Weikert, S., & Ljungberg, B. (2010). Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World journal of urology*, 28(3), 247-252.
6. Chow, W. H., Dong, L. M., & Devesa, S. S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nature Reviews Urology*, 7(5), 245.
7. Lukamowicz-Rajska, M., Mittmann, C., Prummer, M., Zhong, Q., Bedke, J., Hennenlotter, J., ... & Vogl, U. (2016). MiR-99b-5p expression and response to tyrosine kinase inhibitor treatment in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget*, 7(48), 78433.
8. Lipworth, L., Tarone, R. E., & McLaughlin, J. K. (2006). The epidemiology of renal cell carcinoma. *The Journal of urology*, 176(6), 2353-2358.
9. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(1), 5-29.
10. Cohen, H. T., & McGovern, F. J. (2005). Renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 353(23), 2477-2490.

11. DeCastro, G. J., & McKiernan, J. M. (2008). Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. *Urologic Clinics of North America*, 35(4), 581-592.
12. Robinson, C. M., & Ohh, M. (2014). The multifaceted von Hippel–Lindau tumour suppressor protein. *FEBS letters*, 588(16), 2704-2711.
13. Nouailhetas, Y. Radiações ionizantes. Disponível em <<http://www.cnen.gov.br/images/cnen/documentos/educativo/radiacoes-ionizantes.pdf>>.
14. Xiao, W. (2004). Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol*, 1(6), 425-435.
15. Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25(6), 280-288.
16. Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L. C., Rennert, P. D., Hynes, R. O., & Baltimore, D. (2002). Requirement for the NF-κB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *Journal of Experimental Medicine*, 195(2), 233-244.
17. Chen, J., & Chen, Z. J. (2013). Regulation of NF-κB by ubiquitination. *Current opinion in immunology*, 25(1), 4-12.
18. Oya, M., Ohtsubo, M., Takayanagi, A., Tachibana, M., Shimizu, N., & Murai, M. (2001). Constitutive activation of nuclear factor-κB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene*, 20(29), 3888.
19. Oya, M., Takayanagi, A., Horiguchi, A., Mizuno, R., Ohtsubo, M., Marumo, K., ... & Murai, M. (2003). Increased nuclear factor-κB activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 24(3), 377-384.
20. Meteoglu, I., Erdogan, I. H., Meydan, N., Erkus, M., & Barutca, S. (2008). NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 27(1), 53.
21. Kolesnick, R., & Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*, 22(37), 5897.
22. Stinauer, M. A., Kavanagh, B. D., Schefter, T. E., Gonzalez, R., Flaig, T., Lewis, K., ... & Raben, D. (2011). Stereotactic body radiation therapy for melanoma and renal cell carcinoma: impact of single fraction equivalent dose on local control. *Radiation Oncology*, 6(1), 34.
23. Sathishkumar, S., Boyanovski, B., Karakashian, A., Rozenova, K. A., Giltiay, N. V., Kudrimoti, M., ... & Nikolova-Karakashian, M. (2005). Elevated

- sphingomyelinase activity and ceramide concentration in serum of patients undergoing high dose spatially fractionated radiation treatment: implications for endothelial apoptosis. *Cancer biology & therapy*, 4(9), 979-986.
24. Garzotto, M., Haimovitz-Friedman, A., Liao, W. C., White-Jones, M., Huryk, R., Heston, W. D., ... & Fuks, Z. (1999). Reversal of radiation resistance in LNCaP cells by targeting apoptosis through ceramide synthase. *Cancer research*, 59(20), 5194-5201.
 25. Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., ... & Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 300(5622), 1155-1159.
 26. Johnson, R. F., Witzel, I. I., & Perkins, N. D. (2011). p53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF- κ B. *Cancer research*, 71(16), 5588-5597.
 27. Gulbins, E. (2003). Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacological Research*, 47(5), 393-399.
 28. Xiao, W. (2004). Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol*, 1(6), 425-435.
 29. Chen, J., & Chen, Z. J. (2013). Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Current opinion in immunology*, 25(1), 4-12.
 30. Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L. C., Rennert, P. D., Hynes, R. O., & Baltimore, D. (2002). Requirement for the NF- κ B family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *Journal of Experimental Medicine*, 195(2), 233-244.
 31. Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680.
 32. Riemann, K., Becker, L., Struwe, H., Nückel, H., Dührsen, U., Alakus, H., ... & Wohlschlaeger, J. (2006). No association of the NFKB1 insertion/deletion promoter polymorphism with survival in colorectal and renal cell carcinoma as well as disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*, 16(11), 783-788.
 33. Morais, C., Pat, B., Gobe, G., Johnson, D. W., & Healy, H. (2006). Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(12), 3377-3388.
 34. Sourbier, C., Danilin, S., Lindner, V., Steger, J., Rothhut, S., Meyer, N., ... & Massfelder, T. (2007). Targeting the nuclear factor- κ B rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer research*, 67(24), 11668-11676.

35. Đorđević, G., Matušan-Ilijaš, K., Sinožić, E., Damante, G., Fabbro, D., Grahovac, B., ... & Jonjić, N. (2008). Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor- κ B in renal cell tumors. *Croatian medical journal*, 49(5), 608-617.
36. Morais, C., Healy, H., Johnson, D. W., & Gobe, G. (2009). Inhibition of nuclear factor kappa B attenuates tumour progression in an animal model of renal cell carcinoma. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(5), 1462-1474.
37. Morais, C., Gobe, G., Johnson, D. W., & Healy, H. (2010). Inhibition of nuclear factor kappa B transcription activity drives a synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin for treatment of renal cell carcinoma. *Apoptosis*, 15(4), 412-425.
38. Matušan-Ilijaš, K., Damante, G., Fabbro, D., Đorđević, G., Hadžisejdić, I., Grahovac, M., ... & Lučin, K. (2013). EGFR expression is linked to osteopontin and Nf- κ B signaling in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical and Translational Oncology*, 15(1), 65-71.
39. Morais, C., Gobe, G., Johnson, D. W., & Healy, H. (2011). The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(11), 1537-1549.
40. de Souza Braga, M., da Silva Paiva, K. B., Foguer, K., Chaves, K. C. B., de Sá Lima, L., Scavone, C., & Bellini, M. H. (2014). Involvement of the NF- κ B/p50/Bcl-3 complex in response to antiangiogenic therapy in a mouse model of metastatic renal cell carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(7), 873-879.
41. An, J., Sun, Y., Fisher, M., & Rettig, M. B. (2004). Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor- κ B dependent. *Molecular cancer therapeutics*, 3(6), 727-736.
42. Sun, Y., Clair, D. K. S., Fang, F., Warren, G. W., Rangnekar, V. M., Crooks, P. A., & Clair, W. H. S. (2007). The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor- κ B inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Molecular cancer therapeutics*, 6(9), 2477-2486.
43. Flynn, V., Ramanitharan, A., Moparty, K., Davis, R., Sikka, S., Agrawal, K. C., & Abdel-Mageed, A. B. (2003). Adenovirus-mediated inhibition of NF- κ B confers chemo-sensitization and apoptosis in prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 23(2), 317-323.
44. Sandur, S. K., Deorukhkar, A., Pandey, M. K., Pabón, A. M., Shentu, S., Guha, S., ... & Krishnan, S. (2009). Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF- κ B

- activity. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 75(2), 534-542.
45. Hammond, S. M., Caudy, A. A., & Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(2), 110.
 46. Pereira, S. G., & Oakley, F. (2008). Nuclear factor- κ B1: regulation and function. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(8), 1425-1430.
 47. Ren, K., Li, Z., Li, Y., Zhang, W., & Han, X. (2017). Sulforaphene enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma through suppression of the NF- κ B pathway. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(8), e21917.
 48. Habib, R., Akhtar, J., Taqi, M., Yu, C., & Zhang, C. (2015). Lentiviral vector-mediated survivin shRNA delivery in gastric cancer cell lines significantly inhibits cell proliferation and tumor growth. *Oncology reports*, 34(2), 859-867.
 49. Qin, B., & Cheng, K. (2010). Silencing of the IKK ϵ gene by siRNA inhibits invasiveness and growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 12(5), R74.
 50. Li, X., He, X., Tian, W., & Wang, J. (2014). Short hairpin RNA targeting Notch2 inhibits U87 human glioma cell proliferation by inducing cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo. *Molecular medicine reports*, 10(6), 2843-2850.
 51. Chen, Y., Lu, R., Zheng, H., Xiao, R., Feng, J., Wang, H., ... & Guo, L. (2015). The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. *BMC gastroenterology*, 15(1), 21.
 52. Baldwin, A. S., Azizkhan, J. C., Jensen, D. E., Beg, A. A., & Coodly, L. R. (1991). Induction of NF-kappa B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10), 4943-4951.
 53. Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B., & Pestell, R. G. (2001). NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine & growth factor reviews*, 12(1), 73-90.

54. Fuster, J. J., Sanz-González, S. M., Moll, U. M., & Andrés, V. (2007). Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends in molecular medicine*, 13(5), 192-199.
55. Yu, Y., Wan, Y., & Huang, C. (2009). The Biological Functions of NF- κ B (p. *Current cancer drug targets*, 9(4), 566-571.
56. Naugler, W. E., & Karin, M. (2008). NF- κ B and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current opinion in genetics & development*, 18(1), 19-26.
57. Zaffaroni, N., De Marco, C., Villa, R., Riboldi, S., Daidone, M. G., & Double, J. A. (2001). Cell growth inhibition, G2M cell cycle arrest and apoptosis induced by the imidazoacridinone C1311 in human tumour cell lines. *European Journal of Cancer*, 37(15), 1953-1962.
58. Cude, K., Wang, Y., Choi, H. J., Hsuan, S. L., Zhang, H., Wang, C. Y., & Xia, Z. (2007). Regulation of the G2–M cell cycle progression by the ERK5–NF κ B signaling pathway. *The Journal of cell biology*, 177(2), 253-264.
59. Ozeki, M., Tamae, D., HOU, D. X., WANG, T., LEBON, T., SPITZ, D. R., & LI, J. J. (2004). Response of Cyclin B1 to Ionizing Radiation: Regulation by NF- κ B and Mitochondrial Antioxidant Enzyme MnSOD. *Anticancer research*, 24(5A), 2657-2664.
60. Huang, J., Wang, Y., Guo, J., Lu, H., Lin, X., Ma, L., ... & Li, Q. (2007). Radiation-induced apoptosis along with local and systemic cytokine elaboration is associated with DC plus radiotherapy-mediated renal cell tumor regression. *Clinical immunology*, 123(3), 298-310.
61. Ogushi, T., Takahashi, S., Takeuchi, T., Urano, T., Horie-Inoue, K., Kumagai, J., ... & Inoue, S. (2005). Estrogen Receptor–Binding Fragment–Associated Antigen 9 Is a Tumor-Promoting and Prognostic Factor for Renal Cell Carcinoma. *Cancer research*, 65(9), 3700-3706.
62. Sengupta, S., Lohse, C. M., Leibovich, B. C., Frank, I., Thompson, R. H., Webster, W. S., ... & Kwon, E. D. (2005). Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(3), 511-520.

63. Whelan, R. S., Konstantinidis, K., Wei, A. C., Chen, Y., Reyna, D. E., Jha, S., ... & Crow, M. T. (2012). Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6566-6571.
64. Tollefson, M. K., Thompson, R. H., Sheinin, Y., Lohse, C. M., Cheville, J. C., Leibovich, B. C., & Kwon, E. D. (2007). Ki-67 and coagulative tumor necrosis are independent predictors of poor outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma and not surrogates for each other. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 110(4), 783-790.
65. Yu, Y., Wan, Y., & Huang, C. (2009). The Biological Functions of NF- κ B1 (p. *Current cancer drug targets*, 9(4), 566-571.

ANEXO I – Aprovação do comitê de ética CEUA-IPEN

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO IMPACTO DO SILENCIAMENTO DO GENE NFKb-1 NO CICLO CELULAR E CAPACIDADE PROLIFERATIVA DO ADENOCARCINOME RENAL**” protocolo nº 162/15 sob a responsabilidade de **MARIA HELENA BELLINI MARUMO**– que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), em reunião de 23/09/2015 .

Vigência do Projeto	Setembro/2015 a Setembro/2017
Espécie/linhagem	Camundongo/Balb/c
Nº de animais	20 animais
Peso/Idade	Peso: 20 a 25 g e Idade: 8 a 10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério do IPEN – CNEN/SP

São Paulo, 05 de outubro de 2015.

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9696 - Fax (011) 3133-9709
E-mail: ceuaipen@ipen.br

ANEXO II – Publicação do artigo

Copyright © 2017 Cognizant Communication Corporation

DOI: 10.3727/096504017X15120379906339

US-1439 provisionally accepted 11/30/2017 for publication in *Oncology Research*

Knockdown of NF- κ B1 by shRNA inhibits the growth of renal cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*

AMANDA IKEGAMI,¹ LUIZ FELIPE S. TEIXEIRA,¹ MARINA S. BRAGA,² MATHEUS HENRIQUE DOS S. DIAS,³ EDUARDO C. LOPES,³ MARIA HELENA BELLINI¹.

¹Department of Biotechnology, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brazil

²Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

³Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

Corresponding Author: Maria Helena Bellini, Department of Biotechnology, IPEN-CNEN/SP, 2242 Av. Lineu Prestes, Cidade Universitária, Butantã 05508-000, São Paulo, Brazil, Tel: +55-011-31339706, Email: mbmarumo@ipen.br

Running Title: NF- κ B1 gene in renal cell carcinoma

Knockdown of NF- κ B1 by shRNA Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo

Amanda Ikegami,* Luiz Felipe S. Teixeira,* Marina S. Braga,† Matheus Henrique Dos S. Dias,‡
Eduardo C. Lopes,‡ and Maria Helena Bellini*

*Department of Biotechnology, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brazil

†Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

‡Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for approximately 2%–3% of human malignancies and is the most aggressive among urologic tumors. Biological heterogeneity, drug resistance, and chemotherapy side effects are the biggest obstacles to the effective treatment of RCC. The NF- κ B transcription factor is one of several molecules identified to be responsible for the aggressive phenotype of this tumor. In the past decade, several studies have demonstrated the activation of NF- κ B in RCC, and many have implicated NF- κ B1 (p50) as an important molecule in tumor progression and metastasis. In the present study, a lentivirus was used to deliver shRNA targeting NF- κ B1 into mouse RCC (Renca) cells. It was determined that the knockdown of the NF- κ B1 gene led to a reduction in cell proliferation and late apoptosis/necrosis in vitro. Flow cytometry analysis demonstrated G₂/M arrest in the cells. In addition, immunoblotting analysis revealed a significant increase in cyclin B1 and Bax. In vivo experiments showed that Renca-shRNA-NF- κ B1 cells have significantly diminished tumorigenicity. Moreover, immunohistochemical analysis revealed an increase in necrotic areas of Renca-shRNA-NF- κ B1 tumors. Thus, this study indicates that downregulation of NF- κ B1 can suppress RCC tumorigenesis by inducing late apoptosis/necrosis. Therefore, NF- κ B1 may be a potential therapeutic target for RCC.

Key words: Renal cell carcinoma (RCC); Proliferation; Short hairpin RNA (shRNA); Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells 1 (NF- κ B1)

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common and aggressive urological neoplasia. Among urological cancers, RCC has the second highest mortality rate and accounts for approximately 4% of human malignancies¹. Clear cell RCC (ccRCC) is the most frequent histological subtype and accounts for 80%–90% of all RCC cases². The biological heterogeneity, drug resistance, and side effects of chemotherapy are the biggest obstacles to the effective treatment of RCC. Several molecules have been identified as responsible for the aggressive phenotype of this tumor, one being the transcription factor nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)³. NF- κ B is the collective name for the transcription factors of the Rel family. In mammals, five members of this family are known: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50), and NF- κ B2 (p100/p52). The functional role of NF- κ B1

in RCC has been investigated in recent years but is far from being fully elucidated^{4–7}. The *Nf- κ B1* gene encodes the p105 protein, which undergoes cleavage to remove the carboxy-terminal portion by the 26S proteasome, generating the p50 protein that is capable of binding to DNA but lacks transcriptional activity. For this reason, the p50 homodimers are considered inhibitors of transcription. However, these dimers can recruit a coactivator, B-cell CLL/lymphoma 3 (Bcl-3), and thereby promote the activation of transcription^{8,9}. The NF- κ B1 and RelA (p50/p65) heterodimer, the first NF- κ B protein discovered, is more abundant and regulates the expression of more genes than other heterodimers and homodimers.

Oya et al. were the first to identify the activation of NF- κ B in renal adenocarcinoma cell lines in 2001. In this work, supershift gel experiments showed that p50 is the subunit involved in tumorigenesis. In addition, they demonstrated that cell lines susceptible to tumor necrosis

Address correspondence to Maria Helena Bellini, Department of Biotechnology, IPEN-CNEN/SP, 2242 Av. Lineu Prestes, Cidade Universitária, Butantã 05508-000, São Paulo, Brazil. Tel: +55-011-31339706; E-mail: mbmarumo@ipen.br

factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis showed low levels of NF- κ B activation, whereas apoptosis-resistant strains showed high activation¹⁰. In a later study, the same group investigated the expression of NF- κ B in 45 primary renal tumor samples. The highest levels of NF- κ B activation were found in the more advanced stage samples. Two independent groups, Meteoglu et al. and Djordjević et al., analyzed histological samples from patients with metastatic RCC and found that an increase in p50 activity was correlated with the expression of angiogenesis and apoptosis markers [epithelial growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), Bcl-2, and tumor protein p53 (p53)]^{6,7}. An and colleagues studied the effects of NF- κ B blockade on the induction of apoptosis in two RCC lines (R11 and 444RCC). The authors showed that inhibition of NF- κ B was not sufficient to induce apoptosis, but its blockade was necessary for the induction of apoptosis by the drug bortezomib⁵. The impact of NF- κ B inhibition on renal adenocarcinoma was also evaluated by Morais et al. In vitro and in vivo assays showed that when RCC cell lines were treated with the drug pyrrolidine dicarbamate (PDTC), NF- κ B expression was inhibited, and consequently, cellular viability and proliferation decreased¹¹.

In a recent work, we demonstrated that endostatin treatment resulted in a significant reduction of p50 expression. Immunoprecipitation analysis confirmed the presence of the p50/Bcl-3 complex in nuclear extracts from metastatic lung cancer cells, suggesting an important role of p50 dimers in the transcriptional regulation of genes in ccRCC¹². In this study, the effect of *Nf- κ B1* knockdown on the proliferation and tumor growth of RCC cells was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The mouse RCC cell line (Renca) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (all obtained from Gibco, Grand Island, NY, USA) in a humidified incubator supplemented with 5% CO₂ at 37°C.

Lentivirus Production

Short hairpin RNA (shRNA) targeting NF- κ B1 mRNA and the empty vector-transfected control cells (Renca-Mock) were obtained from Mission[®] shRNA Lentiviral Plasmids (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After transformation into *Escherichia coli* DH5 α (Subcloning Efficiency DH5- α Competent Cells; Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA), a two-plasmid system was used to pack the virus particles (pSPAX2- ψ PSI and pCMV-VsVg; Addgene, Cambridge, MA, USA) and the lentiviral particles were cotransfected into HEK 293T cells with constructed lentiviral interference vectors using Lipofectamine[®] 2000 (transfection reagent; Invitrogen). The concentrated virus supernatant was collected after 48 h.

Infection of Renca Cells With Lentivirus

Renca cells were seeded in six-well plates at 5×10^4 cells per plate in medium containing lentivirus with NF- κ B1-shRNA or scrambled-shRNA and polybrene (hexadimethrine bromide; Sigma-Aldrich). After 6 h, the medium with 10% FBS was refreshed, and after 48 h, puromycin (Invitrogen) was added to select the cells. The cells were divided into three groups: Renca-wild type (WT) (cells without viral transfection), Renca-Mock (empty vector-transfected control cells), and Renca-shRNA-NF- κ B1 (cells transfected with lentivirus NF- κ B1-shRNA).

RNA Extraction and Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Total cellular RNA was extracted with TRIzol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Next, cDNA was synthesized with QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol using 2 μ g of RNA, and the cDNA was stored at -20°C. Absolute SYBR Green qPCR Mix[®] (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions. The reactions were carried out in a 10- μ l volume reaction system. The PCR conditions consisted of 40 cycles, with a 15-s denaturation at 95°C, a 1-h annealing at 60°C, and a 1-min elongation step at 72°C. Target gene expression levels were normalized to tubulin mRNA levels. The primers used were as follows: NF- κ B1, 5'-GGC TACACCGAAGCAATTGAA-3' (forward) and 5'-CAG CGAGTGGGCGCTGAGA-3' (reverse); tubulin, 5'-CGCA TCTCGGAGCAGTTCA-3' (forward) and 5'-CGTGTA CCAGTGCAGGAAAGC-3' (reverse). Relative quantification of gene expression was performed with the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method¹³. The PCR was carried out using the ABI-Prism 7000 quantitative PCR instrument (Applied Biosystems Company, Foster City, CA, USA).

Protein Extraction and Western Blot Analysis

Protein was extracted from cells using CellLytic[™] M (Sigma-Aldrich). After centrifugation, the supernatant was collected, and a protease inhibitor cocktail powder (Sigma-Aldrich) was added. The protein concentration was determined using the BCA method, and the samples were stored at -80°C until use. Protein was loaded at 50 μ g per lane and separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),

transferred onto polyvinyl difluoride (PVDF) membranes GE Hybond-P, and blocked in 5% skim milk Tris-buffered saline at room temperature for 1 h. Membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies anti-NF- κ B1 p105/p50, anti- β -actin and anti-Bcl-2-associated X protein (Bax; Abcam, Milton, Cambridge, UK), anti-cyclin B1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21; Bioss), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Millipore, Boston, MA, USA), all diluted 1:500. Goat or mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, diluted 1:1,000, were added, and the membranes were incubated for 2 h at room temperature. The bands on the Western blot were detected with the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). Images were taken with the Uvitec Cambridge Alliance 4.7 equipment.

Proliferation Assay: Doubling Time Analysis

Renca cells were seeded (5×10^3 cells per well) in 24-well plates. After 24 h, the medium was replaced with serum-free medium for cell synchronization, and after 24 h the medium was replaced again with medium containing 10% FBS. During the 4 days of culture, one quadruplicate

was trypsinized and a cell count was performed. The number of viable cells was assessed using the trypan blue dye exclusion method. The experiment was carried out in triplicate. The doubling time was determined using the formula ($\Delta T = 1/K$): $K = 3.32 \times [(\log_{v_f} - \log_{v_i}) / (T_f - T_i)]$.

Cell Cycle Analysis

Renca cells were treated with trypsin, centrifuged at $700 \times g$ for 5 min, and fixed with prechilled 75% ethanol for 24 h at 4°C. The cells were stained with 50 μ g/ml propidium iodide (PI) and 0.3 mg/ml ribonuclease A (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature. The cell cycle distribution was then analyzed by flow cytometry with the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies). The proportion of cells at each stage was analyzed using the multicycle DNA content and FlowJo cell analysis software. Each experiment was performed in triplicate.

Apoptosis Analysis

Cells were analyzed for apoptosis and necrosis with the Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to detect the binding of annexin V-fluorescein and determine the exclusion or inclusion of PI.

Figure 1. Stable knockdown of nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B1) in mouse renal cell carcinoma cell line (Renca) cells. Renca cells were transfected with short hairpin (shRNA)-NF- κ B1. (A) mRNA expression was reduced by 70% (** $p < 0.01$). (B) Western blot analysis. (C) The optical density values of the corresponding bands were quantified using ImageJ software, with β -actin serving as an internal control. The results show a reduction in p105 (** $p < 0.01$) and p50 (** $p < 0.001$) at the protein level. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test.

In Vivo Tumorigenicity Assay

The BALB/c female mice were obtained from the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN, São Paulo, Brazil). Renca cells were injected subcutaneously into the flanks of 8- to 10-week-old BALB/c female mice ($n=5$ /group). The tumor volume was calculated using the formula $V = \text{largest measure} \times (\text{smaller measure})^2 \times 0.5$. The mice were euthanized 17 days after injection, and the tumors were collected, excised, fixed in methacarn, and routinely processed for paraffin embedding. All animals were cared for in accordance with the standards of the institute, under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (No. of Process: 162/15). Histological analysis was performed

on 4- μm sections stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemical labeling for Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology) was performed. Briefly, paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized with graduated xylene and alcohol and immersed in a citrate solution (pH 6.0). The tissues were incubated with methanol and hydrogen peroxide (3%) 1:1, followed by the primary antibody, diluted in 1:1,000, at 4°C overnight and the biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) at 37°C for 30 min. After washing, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution

Figure 2. NF- κ B knockdown significantly elongates the doubling time in Renca cells and leads to G₂/M arrest. (A) The proliferation of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells was markedly inhibited in a time-dependent manner (** $p < 0.01$). (B) Cell cycle distribution. (C) Cell cycle analysis showed a significant increase in the G₂/M population of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells (* $p < 0.05$ vs. Renca-Mock). The results represent the mean $\pm$ SD of three experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

was used to visualize the staining. The stained slides were evaluated by standard light microscopy (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistically significant differences between groups for each assay were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. A value of $p < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

RESULTS

In all experiments, Renca-WT and nontarget shRNA-transduced cells (Renca-Mock) were used as controls. *Nf- κ B1* mRNA production was evaluated by qRT-PCR, demonstrating lower expression levels in the Renca-shRNA-NF- κ B1 cells, with an mRNA level reduction of $70.0 \pm 0.12\%$ ($p < 0.01$) compared to the Renca-Mock cells (Fig. 1A). The protein expression of p105 and p50 in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells was reduced by $84.0 \pm 0.01\%$ ($p < 0.01$) and $77.0 \pm 0.08\%$ ($p < 0.001$), respectively, compared to the Renca-Mock cells (Fig. 1B and C).

To examine whether NF- κ B knockdown affected Renca cell growth, cellular proliferation was evaluated at different time points (24, 48, 72, and 96 h). The results demonstrated that cell growth significantly decreased in the *Nf- κ B1* knockdown Renca cells at 48, 72, and 96 h compared to the Renca-Mock cells (Fig. 2A). The doubling cell time, in hours, for the Renca-WT cells was 21.4 h, for the Renca-Mock cells was 21.8 h, and for the Renca-shRNA-NF- κ B1 cells was 27.0 h ($p < 0.01$ vs. Renca-Mock cells).

To further confirm the impact of NF- κ B1 knockdown on cell growth, the cell cycle distribution in the population was analyzed by flow cytometry. The results demonstrated that the number of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells in the G₂/M phase was significantly increased ($p < 0.05$ vs. Renca-Mock) (Fig. 2B and C).

Renca cells were harvested and analyzed for apoptosis and necrosis using the annexin V/PI flow cytometry assay. As shown in Figure 3, the percentage of late apoptotic/necrotic cells in the Renca-WT and Renca-Mock groups was $6.17 \pm 0.72\%$ and $5.44 \pm 0.63\%$, respectively, which was significantly lower compared to the Renca-shRNA-NF- κ B1 group ($8.96 \pm 3.07\%$, $p < 0.05$), indicating that the knockdown of the *Nf- κ B1* gene leads to a significant increase in the baseline apoptosis levels of Renca cells.

Figure 3. Knockdown of NF- κ B1 promotes late apoptosis/necrosis in the Renca cell line. (A) Diagrams of the flow cytometry of Renca cells after label with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) (AnexV) and propidium iodide (PI) showing the following: Q1, dead cells; Q2, late apoptosis; Q3, early apoptosis; and Q4, normal cells. (B) Flow cytometric analysis of Renca cells. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

To elucidate the molecular mechanism by which NF- κ B1 regulates the proliferation of RCC cells, the expression of p21, cyclin B1, Bax, and Bcl-2, which are involved in the progression of cell cycle and cell death, was evaluated. Western blot analysis revealed that knockdown of NF- κ B1 increased the expression of p21, cyclin B1, and Bax compared to the control group, while Bcl-2 expression decreased subtly (Fig. 4). The Bax/Bcl-2 ratio was increased in the Renca-shRNA-NF- κ B1 cells 5.64 $\pm$ 0.33-fold compared with the control group Renca-Mock ($p < 0.05$), indicating that both Bax and Bcl-2 are active in the response of Renca cells to apoptosis and that knockdown of NF- κ B1 deregulates the ratio between these proteins.

The *in vivo* tumorigenesis assay revealed that tumor growth was significantly slower in BALB/c mice inoculated with the Renca-shRNA-NF- κ B1 cells compared to the controls (Fig. 5A). The mean tumor volume for the Renca-shRNA-NF- κ B1 group was 367.51 $\pm$ 40.57 mm³, for the Renca-WT group was 979.29 $\pm$ 235.47 mm³, and for the Renca-Mock group was 718.19 $\pm$ 89.37 mm³. Throughout the experiment, a significant difference was found on days 11, 13, and 16 ($p < 0.05$ vs. Renca-Mock) (Fig. 5B). The mean tumor weight of the resected tumors is shown in Figure 5C. The tumor weight was significantly

reduced in the NF- κ B1 shRNA knockdown xenograft tumors ($p < 0.05$ vs. Renca-Mock).

Immunohistochemical analysis of the xenograft tissues was performed to confirm the effect of NF- κ B1 knockdown in Renca cells on proliferation (Fig. 6). The results showed that the necrotic area in the Renca-shRNA-NF- κ B1 samples was significantly increased compared to the Renca-Mock tumors ($p < 0.001$). Ki-67 labeling was significantly reduced in the Renca-shRNA-NF- κ B1 group compared to the other two groups ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In the past decade, several studies have correlated the activation of NF- κ B in RCC with angiogenesis, cell proliferation, resistance to chemotherapy, and resistance to apoptosis¹⁴⁻¹⁷. Here we showed that NF- κ B1 may constitute a therapeutic target for RCC. qRT-PCR and Western blot results indicate that NF- κ B1 expression at both the mRNA and protein levels was significantly decreased in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells. Knocking down the expression of NF- κ B1 results in a time-dependent inhibition of cell proliferation. Recently, Chen and collaborators demonstrated that the NF- κ B1 polymorphism (rs4648068) is associated with cell proliferation and motility in gastric

Figure 4. Effect of NF- κ B1 knockdown on the expression of cell cycle regulators. (A) The protein expression levels of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21), cyclin B1, B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) were detected by Western blot. (B) Quantitative analysis of the protein levels using ImageJ 1.6.0_24 software and normalized to glyceraldehyde 3-phosphate (GAPDH). (C) Increase in the Bax/Bcl-2 ratio of the protein levels in knockdown for NF- κ B1 cells. The values shown represent the mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus Renca-Mock. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 5. Effects of NF- κ B1 knockdown in Renca cells. (A) BALB/c mice were subcutaneously inoculated with Renca cells transfected with Renca-wild type (WT) (a) and Renca-Mock (b) or shRNA-NF- κ B1 (c). The image is representative of tumors formed. (B) Growth curves of tumor volumes. The graph is representative of tumor growth 17 days after inoculation. (C) Graph showing the mean tumor weight. All data are presented as the mean $\pm$ SD ($n=5$) and represent three independent experiments; * $p<0.05$ versus Renca-Mock. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

cancer. They found that the GG genotype leads to higher levels of p105/p50 and increased cell proliferation and motility compared to the AA genotype¹⁸.

To verify the causal relationship between low NF- κ B1 levels and the inhibition of cellular proliferation, the cell cycle distribution was analyzed. The Renca-shRNA-NF- κ B1 cell line exhibited an increased number of cells in the G₂/M phase, accompanied by a decreased number of cell number in the S and G₀/G₁ phases. Moreover, these cells were analyzed by the annexin V/PI flow cytometry method, and an increase in late apoptotic/necrotic cells was discovered. These data are in agreement with the previous findings of Yu and collaborators that described the participation of p50 dimers in cell proliferation-related and antiapoptotic signaling pathways¹⁹.

To explore the mechanism underlying late apoptosis/necrosis in Renca cells that is mediated by NF- κ B1 down-regulation, we employed Western blot analysis and demonstrated a significant increase in cyclin B1 and Bax, whereas the expression of p21 was slightly upregulated. The accumulation of cyclin B1 in the G₂/M phase with an increase in apoptosis has been previously reported²⁰. The

inability of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells to exit the G₂ stage may be explained by assuming that the active cyclin B1-cell division cycle 2 (cdc2) complexes are confined to the cytoplasmic compartment²¹.

A syngeneic animal model was used to assess the tumorigenicity of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells, and our data showed that NF- κ B1 silencing markedly inhibited tumor growth. H&E staining of Renca-shRNA-NF- κ B1 tumor sections uncovered large necrotic areas compared to the control groups. These data are consistent with the results of the annexin V/PI assay as well as with the increased levels of Bax, since Bax regulates primary cellular necrosis through an apoptosis-independent mechanism²².

Immunohistochemical staining of Renca cells for Ki-67, a cell proliferation marker of several malignancies, including ccRCC, was consistent with the in vitro findings²³.

In conclusion, knockdown of the NF- κ B1 gene efficiently reduced Renca cell growth by inducing G₂/M arrest and late apoptosis/necrosis. It may be useful as a pathological biomarker as well as a chemotherapy target in RCC.

Figure 6. Histological and morphometric analysis of paraffin-embedded tumor sections in different groups. (A) Tumor sections were subjected to hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemical staining for anti-Ki-67. (B) Quantitative analysis was achieved by morphometry. Tumor tissue in the Renca-shRNA-NF- κ B1 group showed a significant increase in the necrotic area (** $p < 0.001$). Moreover, Ki-67 expression was slightly but significantly reduced (* $p < 0.05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

ACKNOWLEDGMENTS: *We would like to thank Ms. Evelin Caroline da Silva for her valuable technical support on this project. This study was supported by FAPESP (Process No. 2014/19265-7). The authors declare no conflicts of interest.*

REFERENCES

1. Quan Z, He Y, Luo C, Xia Y, Zhao Y, Liu N, Wu X. Interleukin 6 induces cell proliferation of clear cell renal cell carcinoma by suppressing hepaCAM via the STAT3-dependent up-regulation of DNMT1 or DNMT3b. *Cell Signal*. 2017;32:48–58.
2. Zhang F, Ma X, Li H, Guo G, Li P, Li H, Gu L, Li X, Chen L, Zhang X. The predictive and prognostic values of serum amino acid levels for clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2017;35(6):392–400.
3. Morais C, Gobe G, Johnson DW, Healy H. The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *Int J Biochem Cell B* 2011;43:1537–49.
4. Steiner T, Junker U, Henzgen B, Nuske K, Durum SK, Schubert J. Interferon- α suppresses the antiapoptotic effect of NF- κ B and sensitizes renal cell carcinoma cells in vitro to chemotherapeutic drugs. *Eur Urol*. 2001;39:478–83.
5. An J, Sun Y, Fisher M, Rettig MB. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor- κ B dependent. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:727–36.
6. Meteoglu I, Erdogdu IH, Meydan N, Erkus M, Barutca S. NF- κ B expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008;27:53.
7. Djordjević G, Matusan-Ilijas K, Sinozić E, Damante G, Fabbro D, Grahovac B, Lucin K, Jonjić N. Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor- κ B in renal cell tumors. *Croat Med J*. 2008;49:608–17.
8. Karin M. NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *CSH Perspect Biol*. 2009;1:a000141.
9. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013;42:443–68.
10. Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M. Constitutive activation of nuclear factor- κ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 2001;20:3888.
11. Morais C, Healy H, Johnson DW, Gobe G. Inhibition of nuclear factor kappa B attenuates tumour progression in an animal model of renal cell carcinoma. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:1462–74.
12. de Souza Braga M, da Silva Paiva KB, Foguer K, Chaves KCB, de Sá Lima L, Scavone C, Bellini MH. Involvement of the NF- κ B/p50/Bcl-3 complex in response to antiangiogenic therapy in a mouse model of metastatic renal cell carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2014;68:873–9.
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8.
14. Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N, Murai M. Increased nuclear factor- κ B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:377–84.
15. Riemann K, Becker L, Struwe H, Nüchel H, Dührsen U, Alakus H, Winde G, Neuhäuser M, Rübber H, Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Schmid KW, Siffert W. No association of the NFKB1 insertion/deletion promoter polymorphism with survival in colorectal and renal cell carcinoma as well as disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pharmacogenet Genom*. 2006;16:783–8.
16. Matušan-Ilijaš K, Damante G, Fabbro D, Dordević G, Hadžisejdić I, Grahovac M, Avirović M, Grahovac B, Jonjić N, Lučin K. EGFR expression is linked to osteopontin and Nf- κ B signaling in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2013;15:65–71.
17. Sourbier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Targeting the nuclear factor- κ B rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res*. 2007;67:11668–76.
18. Chen Y, Lu R, Zheng H, Xiao R, Feng J, Wang H, Gao X, Guo L. The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:21.
19. Yu Y, Wan Y, Huang C. The biological functions of NF- κ B1 (p50) and its potential as an anti-cancer target. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:566–71.
20. Lindqvist A, van Zon W, Rosenthal CK, Wolthuis RM. Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol*. 2007;5:e123.
21. Zaffaroni N, De Marco C, Villa R, Riboldi S, Daidone MG, Double JA. Cell growth inhibition, G2M cell cycle arrest and apoptosis induced by the imidazoacridinone C1311 in human tumour cell lines. *Eur J Cancer* 2001;37:1953–62.
22. Whelan RS, Konstantinidis K, Wei AC, Chen Y, Reyna DE, Jha S, Yang Y, Calvert JW, Lindsten T, Thompson CB, Crow MT, Gavathiotis E, Dorn II GW, O'Rourke B, Kitsis RN. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:6566–71.
23. Tollefson MK, Thompson RH, Sheinin Y, Lohse CM, Cheville JC, Leibovich BC, Kwon ED. Ki-67 and coagulative tumor necrosis are independent predictors of poor outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma and not surrogates for each other. *Cancer* 2007;110:783–90.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**