INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação da capacidade angiogênica da linhagem celular de adenocarcinoma renal humano knockout para a proteína NF- κ B1

LUIZ FELIPE TEIXEIRA DA SILVA

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

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Helena Bellini

São Paulo
2021

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação da capacidade angiogênica da linhagem celular de adenocarcinoma
renal humano knockout para a proteína NF- κ B1**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

LUIZ FELIPE TEIXEIRA DA SILVA

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

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Helena Bellini**

**São Paulo
2021**

Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -
Processo: 169843/2018-1

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

Como citar:

TEIXEIRA DA SILVA, L. F. ***Avaliação da capacidade angiogênica da linhagem celular de adenocarcinoma renal humano knockout para a proteína NF-κB1***. 2021. 68 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

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

Teixeira da Silva, Luiz Felipe

Avaliação da capacidade angiogênica da linhagem celular de
adenocarcinoma renal humano knockout para a proteína NF-κB1 /
Luiz Felipe Teixeira da Silva; orientadora Maria Helena
Bellini. -- São Paulo, 2021.
68 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2021.

1. Adenocarcinoma renal. 2. Gene NF-κB1. 3. Técnica
CRISPR/Cas9. 4. Hipóxia. 5. Genes endógenos. I. Bellini, Maria
Helena, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Roselane e toda minha família pelo incentivo e apoio durante todo esse tempo e por me mostrarem a importância dos estudos.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Helena Bellini pela oportunidade concedida, orientação e todo o empenho e esforço durante esses anos para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo: 169843/2018-1).

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

RESUMO

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANGIOGÊNICA DA LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA RENAL HUMANO KNOCKOUT PARA A PROTEÍNA NF- κ B1

O carcinoma de células renais (CCR) é o câncer epitelial renal adulto mais comum, sendo responsável por mais de 90% de todas as neoplasias renais. O subtipo mais frequente de CCR é o de células claras (CCRcc). A maioria dos pacientes com CCRcc possui mutação no gene supressor tumoral de Von Hippel-Lindau (VHL). O gene VHL codifica uma proteína, a VHL, que é capaz de regular negativamente uma série de proteínas intracelulares, dentre elas o fator induzível por hipóxia (HIF). Muitas moléculas têm sido apontadas como responsáveis pelo fenótipo agressivo desse tumor, uma delas é o fator de transcrição NF- κ B, que é o nome coletivo para os fatores de transcrição da família Rel. Em mamíferos são conhecidos cinco membros desta família: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) e o NF- κ B2 (p100/p52). No CCR, o aumento da atividade do NF- κ B correlacionava-se com o aumento de marcadores de angiogênese tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e Interleucina 6 (IL-6). Nos últimos anos vários grupos têm demonstrado o papel funcional do NF- κ B1 na tumorigenicidade do CCR. Nesse projeto utilizamos a técnica CRISPR/Cas-9 para obtenção de uma linhagem celular de adenocarcinoma renal humano *knockout* para a proteína NF- κ B1. Foi realizada a verificação do gene endógeno mais estável para condições de normóxia e hipóxia. Foi feita a quantificação dos níveis de VEGF e IL-6 em condição de normóxia e hipóxia. A técnica CRISPR/Cas9 foi eficaz para obtenção de células 786-0 nocaute para NF- κ B1 (p105/p50). Dentre os oito genes endógenos analisados, o *TRFC* foi o mais estável e, consequentemente, o mais adequado para estudos com as células 786-0 em hipóxia. A supressão da expressão da p50 nos clones 786-0 sg1, 786-0 sg2 e 786-0 sg3 resultou na redução de VEGF e IL6 tanto em normóxia quanto em hipóxia. A redução do diferencial hipóxia/normóxia demonstra uma alteração na responsividade celular à hipóxia no que diz respeito à IL-6. A redução dos níveis de IL-6, pode justificar a redução da MMP-9 e migração celular observados por nosso grupo.

Palavras-chaves: carcinoma renal de células claras (CCR); NF- κ B1; hipóxia; gene endógeno; CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

**EVALUATION OF ANGIOGENIC CAPACITY OF HUMAN ADENOCARCINOMA
CELL LINE KNOCKOUT FOR NF- κ B1 PROTEIN**

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common adult renal epithelial cancer, accounting for more than 90% of all renal neoplasms. The most frequent subtype of RCC is clear cell (ccRCC). Most patients with ccRCC have a mutation in the Von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene. The VHL gene encodes a protein, the VHL, which can down-regulate a series of intracellular proteins, including the hypoxia-inducible factor (HIF). Many molecules have been identified as responsible for the aggressive phenotype of this tumor, one of them is the transcription factor NF- κ B, which 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). In RCC, the increase in NF- κ B activity was correlated with the increase in angiogenesis markers such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and Interleukin 6 (IL-6). In recent years, several groups have demonstrated the functional role of NF- κ B1 in RCC tumorigenicity. In this project, we used the CRISPR/Cas-9 technique to obtain a human renal adenocarcinoma cell line knockout for the NF- κ B1 protein. Verification of the most stable endogenous gene for conditions of normoxia and hypoxia was carried out. The quantification of VEGF and IL-6 levels was carried out under conditions of normoxia and hypoxia. The CRISPR/Cas9 technique was effective to obtain 786-0 knockout cells for NF- κ B1 (p105/p50). Among the eight endogenous genes analyzed, TRFC was the most stable and, consequently, the most suitable for studies with 786-0 cells in hypoxia. Suppression of p50 expression in clones 786-0 sg1, 786-0 sg2 and 786-0 sg3 resulted in reduction of VEGF and IL6 in both normoxia and hypoxia. The reduction in the hypoxia/normoxia differential demonstrates a change in cellular responsiveness to hypoxia with respect to IL-6.

Keywords: clear cell renal carcinoma (RCC); nf-kb1; hypoxia; housekeep gene; CRISPR/Cas9.

.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Carcinoma de células renais	8
1.2. Biomarcadores do CCR	9
1.3. Fator de transcrição nuclear (NF-κB)	10
1.4. Relação do NF-κB com o HIF	13
1.5. NF-κB e CCR	14
1.6. Tecnologia CRISPR cas 9	15
2. OBJETIVO	18
2.1. Objetivos Específicos	18
3. METODOLOGIA	19
3.1. Deliniamento Experimental	19
3.2. Cultura Celular	19
3.3. Knockout do gene NF-κB1	20
3.4. Produção das partículas lentivirais	23
3.4.1. Transformação bacteriana por choque térmico	23
3.4.2. Cultura bacteriana	23
3.4.3. Extração do DNA plasmidial	24
3.4.4. Transfecção para as células de empacotamento – HEK293T	24
3.5. Transdução estável das células 786-0	25
3.5.1. Curva de resistência a puomicina	25
3.5.2. Transdução das células 786-0	25
3.6. Cultura em Hipóxia	26
3.7. Extração de RNA	26
3.8. Síntese de DNA complementar (cDNA)	27
3.9. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	27
3.10. Ensaio de eficiência dos genes endógenos	28
3.11. Extração de proteínas e dosagem da concentração proteica	29
3.12. Western Blotting	29
3.13. Ensaio de imunoabsorção enzimática	30
3.14. Análise Estatística	30

3.15. Mapa de interação proteína-proteína.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Produção das células knockout.....	32
4.1.1. Curva de resistência à puomicina.....	32
4.1.2. Rendimento do DNA plasmidial	32
4.1.3. Transfecção das células HEK293T.....	33
4.1.4. Transdução das células 786-0.....	33
4.1.5. Avaliação do nível de acúmulo proteico de NF- κ B1 por Western Blotting.....	34
4.2. Rendimento da extração de RNA.....	34
4.3. Avaliação da eficiência dos genes endógenos.....	35
4.3.1. Especificidade dos primers	35
4.3.2. Estabilidade de expressão de genes de referência em condições normóxicas e hipóxicas.....	36
4.3.3. Determinação da estabilidade da expressão de genes de referência candidatos.....	37
4.4. Avaliação dos níveis proteicos de HIF- α	39
4.5. Avaliação dos níveis de RNAm do VEGF e da IL-6.....	40
4.6. Análise dos níveis proteicos de VEGF e IL-6	42
4.7. Mapa de interação entre proteínas.....	44
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS	51
8. ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma de células renais

O carcinoma de células renais (CCR) é o câncer epitelial renal adulto mais comum, sendo responsável por mais de 90% de todas as neoplasias renais (1). Segundo os dados da GLOBOCAN (Global Cancer Observatory – <http://gco.iarc.fr>) 431.288 novos casos de neoplasias renais foram diagnosticadas em 2020, constituindo 2,2% de todos os diagnósticos de câncer. Destes, cerca de 271.249 casos são diagnosticados em homens e 160.039 em mulheres, refletindo um risco relativo (RR) de cerca de 1,7 para homens em comparação com as mulheres. O risco global cumulativo de desenvolver a doença é de 0,70% entre os homens e 0,36% entre as mulheres. Os países com maior incidência (número de casos/100.000 habitantes) são Lituânia (14,5), República Tcheca (14,4), Estados Unidos da América (12,4), Uruguai (14,3) e Austrália (10,5).

No Brasil, a incidência do CCR é de 4,5 (número de casos/100.000 habitantes) e pesquisas regionais sugerem que o CCR representa, aproximadamente, 1,2% dos casos de câncer de todo o país (2).

O CCR ocorre mais frequentemente em pessoas entre 70-75 anos de idade, afetando principalmente indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino. Fatores como obesidade, tabagismo, hipertensão e alterações genéticas contribuem para o desenvolvimento da patologia (3;4).

O CCR é considerado uma doença clínico-patologicamente heterogênea que pode ser classificada em células claras, papilar, cromóforo, carcinoma do ducto coletor e tipos não classificados (1). O CCR de células claras é o mais comum, representando 70% de todos os casos (2). CCR papilar é responsável por 10% –15% dos casos, CCR cromóforo é responsável por 4% – 6% dos casos, CCR do ducto coletor é responsável por menos de 1% dos casos e lesões não classificadas são responsáveis por 4% –5% dos CCRs (1;2).

A maioria dos pacientes com CCRcc possui mutação no gene supressor tumoral de Von Hippel-Lindau (VHL). O gene VHL codifica uma proteína, a VHL, que é capaz de regular negativamente uma série de proteínas intracelulares, dentre elas o fator induzível por hipóxia (HIF). O HIF é o fator de transcrição heterodimérico (HIF α/β) que regula a expressão de genes que facilitam a adaptação de tecidos à baixa pressão

de oxigênio. Em condições de oxigenação normal, a proteína VHL está envolvida na degradação da subunidade HIF- α . A perda de função do gene VHL, mesmo em pressões de oxigênio normais, acarreta um aumento do HIF e, conseqüentemente, o aumento da transcrição de vários fatores angiogênicos tais como: fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (5;6). (Figura 1). A presença de fatores angiogênicos justifica a intensa vascularização do CCR e explica a alta prevalência de metástase (30-40%) no diagnóstico inicial da doença (7).

Figura 1 – Representação do HIF em condições de normóxia e hipóxia. Em normóxia o VHL consegue se ligar ao HIF e realizar sua degradação. Em hipóxia o VHL é impedido de se ligar ao HIF, impossibilitando sua degradação e assim gerando um acúmulo, o HIF livre migra para o núcleo, realizando a transcrição de genes de resposta à hipóxia. (Modificado de: BioRender (2021). (<https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5ffe0f2123ca6b00a7467b51-hif-signaling>)).

1.2. Biomarcadores do CCR

Como citado na sessão anterior o VEGF é regulado positivamente no CCR como resultado direto da inativação do gene VHL. Ele é, sem dúvida, o mais importante

mediador da angiogênese nesse tipo tumoral. Além disso, alguns trabalhos sugerem que o VEGF também desempenha um papel importante no sistema imunológico, atuando no microambiente tumoral, promovendo o acúmulo de células dendríticas imaturas, células T regulatórias e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (8).

Dada a relação entre VEGF e CCR, o valor prognóstico dos níveis circulantes de VEGF e a resposta à terapia direcionada a VEGF foram amplamente avaliados (9). Altos níveis séricos de VEGF tem sido associado à progressão e prognóstico reservado do CCR. (10). Além disso, foi relatado a correlação independente entre os níveis séricos de VEGF e a sobrevida dos pacientes com CCR metastático (11).

Além do VEGF, o valor preditivo de outros fatores solúveis são utilizados como prognóstico, tal como a interleucina 6 (IL-6). A IL-6 é uma citocina de ação inflamatória e angiogênica, ela atua como um fator de crescimento tumoral autócrino para induzir a resposta inflamatória transcricional, promovendo a progressão do tumor através da via JAK-STAT, além disso, ativa a angiogênese tumoral pela ativação das vias de sinalização Jak/STAT e PI3K/Akt (12). Qing Xu e *co/s* demonstraram que o Stat 3 é um regulador chave do gene VEGF pois, além de ser um ativador direto do promotor VEGF, é também necessário para a expressão de HIF-1 mediada por PI3K-Akt. O HIF-1 por sua vez, é um regulador chave do gene VEGF (13).

Clinicamente, o IL-6 circulante é um importante fator prognóstico independente em pacientes com CCR metastático (14).

1.3. Fator de transcrição nuclear (NF- κ B)

O NF- κ B foi descoberto em 1986 por Sen e Baltimore, e descrito como um fator nuclear que se ligava a elementos promotores da cadeia leve da imunoglobulina ativada de células B de onde surgiu a abreviação NF- κ B (15). Pesquisas posteriores confirmaram que este fator de transcrição é expresso em quase todos os tipos celulares regulando muitos genes com papeis relacionados a processos patológicos, como: inflamação e resposta imune, estresse oxidativo, carcinogênese, sobrevivência celular e apoptose (16).

O NF- κ B é um fator de transcrição pleiotrópico pertencente à família Rel/NF- κ B que participa da ativação de muitos genes, incluindo citocinas, metaloproteinases

(MMPs), VEGF, Bcl-2 e Bax. Em mamíferos são conhecidos cinco membros da família Rel: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B 1 p105/p50 e o NF- κ B 2 p100/p52. As proteínas NF- κ B podem ser classificadas em dois grandes grupos, o primeiro grupo inclui as subunidades p65, RelB e c-Rel que contêm no C-terminal um domínio de transativação (TAD) e são sintetizadas na sua forma madura, o segundo grupo é composto pelas proteínas NF- κ B1 p105/p50 e a NF- κ B2 p100/p52 que são moléculas precursoras e quando sofrem clivagem da região N-terminal no proteassoma (26S) geram proteínas maduras: p50 e p52 (17,18), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema das subunidades NF- κ B e combinações de dímeros. A. Os dímeros NF-B são formados a partir de cinco subunidades distintas: RelA (p65), RelB e c-Rel, NFB 1 (p105 / p50) e NF-B 2 (p100 / p52). B. Atualmente, 11 complexos diméricos de NF- κ B foram identificados em condições fisiológicas. O mais comumente estudado é o RelA: dímero p50 (circulado) por meio de sua estreita associação com a resposta inflamatória (Modificado de Cookson V. *et al* (19)).

Todas as subunidades possuem um domínio N-terminal de aproximadamente 300 aminoácidos denominado Domínio de Homologia Rel que medeia a ligação ao DNA e a dimerização da subunidade. RelA (p65), RelB e c-Rel, todos contêm domínios de transativação dentro de seus C terminais que, em geral, permitem que dímeros contendo essas subunidades induzam a expressão gênica. Este domínio também é o local de várias modificações regulatórias pós-tradução, incluindo fosforilação, acetilação e nitrosilação. Em contraste com isto, NF- κ B1 (p105 / p50) e NF- κ B2 (p100 / p52) que sofrem proteólise para produzir as isoformas de ligação de DNA, p50 e p52 não têm domínios de transativação. Consequentemente, esses homodímeros de p50

ou p52 são geralmente vistos como transcricionalmente inertes, uma vez que ainda têm capacidade de ligação ao DNA, mas não podem ativar a expressão gênica: há, é claro, exceções (19).

Existem duas vias de ativação do NF- κ B em que há a expressão de p50, sendo a via canônica e outra ainda não elucidada totalmente (20) (Figura 3). A via canônica, também conhecida como via clássica, é ativada por infecções virais e citocinas inflamatórias; quando esta via é ativada uma IKK fosforila uma I κ B que é ubiquitinizada e degradada pelo proteassoma. As subunidades livres (p65 e p50) do NF- κ B migram para o núcleo onde ativam a transcrição de genes específicos. A outra via citada, os homodímeros de p50 ou homodímeros de p52 migram para o núcleo, onde passam a ser ativadores da transcrição gênica pela interação com a Bcl-3, que possui o domínio de transativação. Essas subunidades se homo ou heterodimerizam para formar dímeros ativadores (p50/p65) e repressores (p50/p50 e p52/p52). Sem estímulo o NF- κ B permanece no citoplasma em sua forma inativa, ligado a um dos seus inibidores (IKBs) incluindo o I κ B- α , I κ B- β , I κ B γ , I κ B δ e o Bcl-3 (17,20).

Figura 3 – Esquematização da via canônica do NF- κ B (Modificado de Peng C. *et al* (21). Criado com BioRender).

1.4. Relação do NF- κ B com o HIF

A conexão entre as vias de sinalização do NF- κ B e HIF têm sido propostas por vários autores (22-25). Estudos mostraram que subunidades de NF- κ B estavam ligadas ao promotor HIF-1 α e a depleção delas resultava em níveis basais reduzidos de mRNA de HIF-1 α . Além disso, os autores comprovaram que a indução do NF- κ B pelo fator de necrose tumoral (TNF α) promove tanto o aumento da expressão, quanto sua atividade de HIF-1 α após hipóxia. Em resumo, a hipóxia promove a ativação do NF- κ B que, por sua vez, regula positivamente a transcrição de HIF- α . Finalmente, o HIF- α ativa a transcrição de genes que são responsáveis pela resposta adaptativa à hipóxia. (Figura 3) (22).

Figura 4 – Representação da conexão e ativação das vias intracelulares do HIF- α e NF- κ B. (Modificado de Gorlach e Bonello (22) Criado com BioRender).

1.5. NF- κ B e CCR

O papel oncogênico do NF- κ B está bem estudado na maioria dos cânceres, porém, no CCR há a necessidade de maiores estudos (26). O primeiro estudo correlacionando o NF- κ B e CCR humano foi realizado por Oya e *cols.* Esses pesquisadores demonstraram a correlação positiva entre a graduação histológica, a invasão e a metástase com a ativação do NF- κ B no CCR. Neste trabalho, o aumento da atividade do NF- κ B foi associado com o aumento da expressão das subunidades p65 e p50 e a concomitante diminuição da expressão da I κ B α (27). Em 2007, Sourbier e *cols.* estudaram o aumento da ativação da p65 e I κ B- α em biópsias de CCR humano comparado a tecidos normais, indicando uma ativação constitutiva de NF- κ B no CCR, além disso, demonstraram também o aumento de p65 no CCRcc em relação aos outros carcinomas renais (28).

Em 2008 dois grupos independentes Meteoglu e *cols.* e Djordjevic e *cols.* analisaram amostras histológicas de pacientes com CCR metastático e observaram que o aumento da atividade do NF- κ B (p50) correlacionava-se com o aumento de marcadores de angiogênese e de apoptose tais como o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), VEGF, bcl-2 e p53 (29,30).

Matušan-Ilijaš e *cols.* em 2011 demonstraram que no CCR primário a ativação do NF- κ B/p65 correlacionava-se com níveis elevados tanto do RNA mensageiro quanto proteicos do VEGF, sugerindo que essas duas moléculas poderiam ser alvos terapêuticos para o CCR (31). Braga e *cols.* avaliaram a ativação do NF- κ B no CCR metastático com e sem tratamento antiangiogênico com Endostatina (ES) (32). Os resultados mostraram que as células tumorais obtidas dos pulmões metastáticos apresentavam ativação do NF- κ B, e a terapia gênica com ES causou a redução da atividade de ligação do NF- κ B no DNA das células tumorais metastáticas. O gel supershift mostrou um claro deslocamento da banda de DNA-NF- κ B em amostras incubadas somente com a utilização do anticorpo p50, ou seja, a p50 foi o único membro da família, e a presença nuclear desta molécula foi confirmada pela análise imunohistoquímica de pulmões metastáticos. Em trabalho recente, Ikegami e *cols.* demonstraram que o *knockdown* do NF- κ B1 promoveu a inibição do crescimento de carcinoma de células renais *in vitro* e *in vivo* (33). Além disso, dados de Teixeira e *cols.* indicaram que a regulação negativa de NF- κ B1 suprime a tumorigenicidade de RCC

pela redução da expressão e a atividade de MMP-9 (34). A tabela 1 apresenta os trabalhos citados da revisão bibliográfica relacionando NF- κ B e CCR.

Tabela 1 – Levantamento bibliográfico de trabalhos relacionando NF- κ B e CCR.

Estudo	Subunidade	Referência
Pacientes com CCR primário em remissão.	$\uparrow$ NF- κ B1 (polimorfismo)	Riemann et al. (2006) (35)
Linhagens: ACHN, SN12K1	$\uparrow$ p50, p52, p65, c-Rel, RelB	Morais et al. (2006) (36)
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	$\uparrow$ p65	Soubier (2007) (28)
Pacientes com CCR primário	$\uparrow$ p50	Meteoglu et al. (2008) (29)
Pacientes com CCR primário	$\uparrow$ p65	Djordjevic et al. (2008) (30)
Linhagens: ACHN e SN12K1	$\uparrow$ p50, p52, p65, c-Rel, RelB	Morais et al. (2009) (37)
Linhagem: SN12K1	$\uparrow$ p50, p52, p65, c-Rel, RelB	Morais et al. (2010) (38)
Pacientes com CCR primário	$\uparrow$ p65	Matušan-Ilijaš (2011) (31)
Revisão – NF-κB CCR		Morais et al. (2011) (39)
Modelo ortotópico metastático – linhagem celular Renca	$\uparrow$ p50	Braga et al. (2014) (32)
Knockdown NF-κB1 - linhagem celular Renca $\downarrow$ proliferação	p50	Ikegami et al. (2018) (33)
Regulação negativa NF-κB1 - linhagem celular Renca $\downarrow$ MMP-9	p50	Teixeira et al. (2020) (34)

1.6. Tecnologia CRISPR/Cas9

No início de 1987, repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas (CRISPR) foram descobertas originalmente em *E. coli* e, posteriormente, em muitas outras espécies de bactérias (40). No início dos anos 2000, Mojica e cols observaram que tais sequências eram semelhantes às encontradas em bacteriófagos, vírus e plasmídeos. As bactérias que possuíam as sequências CRISPR eram “imunes” à infecções viróticas, concluindo que se tratava de um sistema imune adaptativo dos

procariotos (41). Ao longo dos anos seguintes, mais e mais características dos loci CRISPR foram desvendadas: a conexão sequências CRISPR com a enzima CRISPR Cas e RNAs CRISPR de transativação (*tracrRNA*) e CRISPR RNA (*crRNA*) (42-44). Em 2012, o sistema CRISPR/Cas9 passou a ser usado como uma ferramenta de edição genômica promovendo uma revolução nas áreas de biologia molecular e biotecnologia.

Atualmente o sistema mais utilizado é o CRISPR/Cas9 tipo II. Neste sistema, a proteína Cas9 reconhece a estrutura terciária do RNA guia (sgRNA), que é o complexo *crRNA-tracrRNA* produzido artificialmente. O gRNA contém uma sequência de 20 pares de bases para ligação no DNA alvo, uma sequência chamada *protospacer motif adjacente* (PAM) que, como o nome diz, está adjacente ao DNA alvo, e é reconhecida pelo complexo Cas9 gRNA, promovendo a clivagem do mesmo (45,46), como podemos observar na Figura 5.

Figura 5 – Representação do sistema CRISPR/Cas9. A endonuclease Cas9 (azul) é direcionada ao DNA por um RNA guia que pode ser fornecido como um sistema de duas partes consistindo de *crRNA* e *tracrRNA* ou como um único RNA guia, onde o *crRNA* e *tracrRNA* são conectados por um vínculo (linha pontilhada). O reconhecimento do alvo é facilitado pelo sítio PAM (*protospacer-adjacent motif*). A clivagem ocorre em ambos os lados (tesouras) 3 pares de base acima do sítio PAM (Criado com BioRender).

2. OBJETIVO

Avaliar o impacto do *Knockout* do gene NF- κ B1 na angiogênese de células de adenocarcinoma renal humano em condições de normóxia e hipóxia.

2.1. Objetivos específicos

- Realizar o *knockout* do gene NF- κ B1 células de adenocarcinoma renal humano.
- Definir o gene endógeno mais estável e eficiente para ensaios de comparação em condições de normóxia *versus* hipóxia.
- Avaliar a expressão dos genes VEGF e IL 6 na linhagem celular de adenocarcinoma renal humano *knockout* para o gene NF- κ B1 em condição de normóxia e hipóxia.

3. METODOLOGIA

3.1. Delineamento Experimental

Figura 6 – Representação das etapas seguidas no trabalho.

3.2. Cultura Celular

A linhagem celular 786-0 (adenocarcinoma renal humano de células claras humanas com a mutação do gene VHL) foi adquirida da ATCC (ATCC®CRL-1932). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies, MD, EUA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Life Technologies, MD, EUA), 300 μ g/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina (Life Technologies, MD, EUA).

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).

Ambas foram mantidas em câmara úmida a 37°C e em atmosfera com 5% de CO₂.

3.3. **Knockout do gene NF-κB1**

Para o *knockout* do gene *nf-kb1* foi utilizada a técnica de CRISPR-Cas9, primeiramente foram desenhadas três sequências de sgRNA utilizando a ferramenta de Design de sgRNA do *Broad Institute* (portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design). Uma sequência controle (Mock) também foi desenhada. As sequências utilizadas estão apresentadas na Figura 7 e na Tabela 2.

Foi utilizado o vetor *lentiCRISPR v2* (Figura 8), cedido gentilmente pelo Dr. Matheus Henrique Dos S. Dias, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), Centro de Toxinas, Resposta-imune e Sinalização Celular (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, Brazil (Addgene Plasmid #52961) para clonar as sequências de sgRNA seguindo o protocolo descrito por Sanjana e cols. (2014) (45,46).

Figura 7 – Gene NF- κ B1 (NM_003998.4) contendo as sequências sg-RNA selecionadas marcadas. Em azul a sequência sg1, em vermelho a sequência sg2 e em verde a sequência sg3 (Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_003998.4?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=KYRE8YHK013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_003998.4?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=KYRE8YHK013)).

```

1  gaagtgcacc agcgagccgg ggcaggaaga ggaggtttcg ccaccggagc ggcccggcga
61  cgcgctgaca gcttcccctg cccttcccgt cggctcgggc gccagccgcc gcagccctcg
121  gcttcgacgc agccaacggc cccgtcccgc gagcccagcg ccgcccaggc cgcagccgcc
181  cgcccagtaa ggcggcgccg ccgcccggcc accgcgcgcc ctgcgcttcc ctccgcccg
241  gctgcggcca tggcgcgccg ctgactggcc tggcccggcc ccgcccgcgt cccgctcgcc
301  ccgaccgcca ctcgggcccg ccgggctccc ggccctcgcc cgccctctcc tctccagcc
361  ggcagggccc cgccgcttag gagggagagc ccaccgcgc caggaggccg aacgcccact
421  cgccacccgg cttcagaatg gcagaagatg atccatattt gggaaggcct gaacaaatgt
481  ttcatttggg tccctctttg actcatacaa tatattaatc agaagtattt caaccacaga
541  tggcactgcc aacagcagat ggcccatacc ttcaaatatt agagcaaatc aaacagagag
601  gatttctgtt ccgttatgta tgtgaaggcc catcccattg tggactacct ggtgcctcta
661  gtgaaaagaa caagaagtct taccctcagg tcaaaatctg caactatgtg ggaccagcaa
721  aggttattgt tcagttggtc acaaatggaa aaaatatcca cctgcacgcc cacagcctgg
781  tgggaaaaca ctgtgaggat gggatctgca ctgtaactgc tggaccacca cagatctgtg
841  tcggcttcgc aaacctgggt atacttcatg tgacaaagaa aaaagtattt gaaacactgg
901  aagcaccgaat gacagaggcg tgtataaggg gctataatcc tggactcttg gtgcaccctg
961  accttgcccta tttgcaagca gaaggtggag gggaccggca gctgggagat cgggaaaag
1021  agctaattcc ccaagcagct ctgcagcaga ccaaggagat ggacctcagc gtgtgtcgcc
1081  tcattgtttac agcttttctt ccggatagca ctggcagctt cacaaggcgc ctggaaaccc
1141  tggatcaga cgccatctat gacagtaag ccccaatgca atccaacttg aaaattgtaa
1201  gaattggacg gacagctgga tgtgtgactg gaggggagga aatttatctt ctttgtgaca
1261  aagttcagaa agatgacatc cagattcgat tttatgaaga ggaagaaatc ggtggagtct
1321  ggggaaggatt tggagatttt tcccacacag atgttcatag acaatttgcc attgtcttca
1381  aaactccaaa gtataaagat attaatatta caaaaccagc ctctgtgttt gtccagcttc
1441  ggaggaaatc tgaactggaa actagtgaac caaaacctt cctctactat cctgaaatca
1501  agataaaga agaagtgcag aggaaacgta agaagctcat gcccattttt tcggtatggt
1561  tcggcgggtg tagtggtgct ggagctggag gcggaggcga gtttggtagt ggcggtggag
1621  gagggggcac tggaaagtaca ggtccagggt atagcttccc acactatgga tttcctactt
1681  atggtgggat tactttccat cctggaacta ctaaatctaa tgctgggatg aagcatggaa
1741  ccatggacac tgaatctaaa aaggacctg aaggttgtga caaaagtgat gacaaaaaca
1801  agctaaacct ctttgggaaa gttattgaaa ccacagagca agatcaggag cccagcgagg
1861  ccaccgttgg gaatggtgag gtcactctaa cgtatgcac aggaacaaaa gaagagagtg
1921  ctggagttca ggataacctc tttctagaga aggctaagca gcttgcaaa aggcattgca
1981  atgccccttt cgactacgag gtgacaggag acgtgaagat gctgctggcc gtccagcgcc
2041  atctcactgc tgtgcaggat gagaatgggg acagtgtctt acacttagca atctccacc
2101  ttcattctca acttgtgagg gatctactag aagtcaatc tggtttgatt tctgatgaca
2161  ttatcaacat gagaaatgat ctgtaccaga cgcctctgca cttggcagtg atcactaagc
2221  aggaagatgt ggtggaggat ttgctgaggg ctggggccga cctgagcctt ctggaccgct
2281  tgggtaacct tgttttgac ctactgcca ctactgcca tgataaagt tccagtactt
2341  tactcaagca caaaaaggca gcaactctc ttgaccaccc caacggggac ggtctgaatg
2401  ccattcatct agccatgatg agcaatagcc tgccatgttt gctgctgctg gtggccgctg
2461  gggctgacgt caatgctcag gacgagaagt ccggggcgac agcactgcac ctggctgtgg
2521  agcacgacaa catctcattg gcaggctgcc tgcctctgga ggggtgatgc catgtgaca
2581  gtactaccta cgatggaacc acacccctgc atatagcagc tgggagaggg tccaccaggc
2641  tggcagctct tctcaaagca gcaggagcag atcccctggt ggagaacttt gagcctctct
2701  atgacctgga tgaactcttg gaaaatgcag gagaggatga aggagttgtg cctggaaaca
2761  cgctctaga tatggccacc agctggcagg tatttgacat attaaatggg aaacatattg
2821  agccagagtt tacatctgat gatttactag cacaaggaga catgaaaag cttggctgaag
2881  atgtgaagct gcagctgtat aagttaactg aaattcctga tccagacaaa aactgggcta
2941  ctctggcgca gaaattaggt ctggggatag ttaataatgc cttccggctg agtctgtctc
3001  cttccaaaac acttatggac aactatgagg tctctggggg tacagtcaag gagctggtgg
3061  agggccctgag acaaaaggga tacaccgaag caattgaagt gatccaggca gcctccagcc
3121  cagtgaagac cacctctcag gcccaactgc tgccctctct gcctgcctcc acaaggcagc
3181  aaatagacga gctccgagac agtgacagtg tctgacagac cggcggtggg acatccttcc
3241  gcaaaactcag ctttaccgag tctctgacca gtggtgcctc actgctaact ctcaacaaa
3301  tggcccatga ttatgggcag gaaggacctc tagaaggcaa aatttagcct gctgacaatt
3361  tccacacccg tgtaaaccaa agccctaaaa ttccactgag ttgtccaaa gacagaagct
3421  gaagtgcac caaagggtgt cagagagccg gcccgctgta atcattctcg atttaactcg
3481  agaccttttc aacttggctt ccttctctgg cttcataatg aatttttagt tggttcactt
3541  acagatagta tctagcaatc acaacactgg ctgagcggat gcatctgggg atgaggttgc
3601  ttactaagct ttgccagctg ctgctggatc acagctgctt tctgtgtgca ttgctgtgt
3661  cctcttgcta cgttccattt gtcattaaag gtatcagcgt cgccacctgg cattccttct
3721  gaccacagca tcattttgca ttcaaattaa ggggttaagaa aagagatatt taaaaatgag
3781  agtcaactga tgtgccattt taaaaaaaaa ggcataattgc tttttctaat gtgggttatt
3841  ctctgatttg caaaaaaaa aaaaaaaa atactgttca atatttaaac atggttaca
3901  tcattgctga aaatggtatt tccccctttt tctgcatttt gctattgtaa atatgtttt
3961  tatataaat actttaagg aaaaaatgtt ggatttataa atgctatttt ttattttact
4021  tttataataa aaggaaaagg aaattgatga cttca

```

Tabela 2 – Sequências dos vetores plasmidiais (sgRNA)

Clones	Sequências
sgRNA NF-κB1 1 (sg1)	5' – ACTGGAAGCACGAATGACAG – 3'
sgRNA NF-κB1 2 (sg2)	5' – TTGTCTATGAACATCTGTGG – 3'
sgRNA NF-κB1 3 (sg3)	5' – AAGTAGGAAATCCATAGTGT – 3'
Vetor vazio (Mock)	5' – GACCCCTCCACCCCGCCTC – 3'

Figura 8 – Mapa do vetor lentiCRISPR v2. (A) Representação esquemática do vetor contendo a sequência de interesse (sg-RNA). (B) Representação esquemática do vetor vazio contendo a sequência *non-target*. (Adaptado de: <https://www.addgene.org/52961>)

Neste vetor o promotor U6 dirige a expressão do sgRNA. O gRNA *scaffold* ajuda a ribonuclease Cas9 a se ligar no DNA de interesse. NLS é o sinal de localização nuclear, possui os genes de resistência a ampicilina (AmpR) e puromicina (PuroR). Tem as regiões terminais repetidas (LTR) do HIV, que permitem a integração no genoma da célula hospedeira. O vetor vazio e o lentiCRISPR v2 possuem as mesmas

sequências, exceto que o vetor vazio não apresenta sequência complementar ao RNAm do nf-kb1.

3.4. Produção das partículas lentivirais

3.4.1. Transformação bacteriana por choque térmico

A transformação bacteriana (bactérias DH5- α) foi realizada para amplificação do plasmídeo lentiCRISPR v2 e dos plasmídeos utilizados na produção de partículas lentivirais: pSPAX2 (ψ PSI)-Addgene plasmid (catálogo nº #12260, Cambridge, MA, UK) que dá o sinal de empacotamento e pCMV-VsVg-Lawrence Berkeley Laboratory (catálogo nº #8454, Cambridge, MA, USA) que codifica o envelope viral.

A transformação das bactérias DH5- α , quimicamente competentes foi feita por choque térmico, seguindo as orientações do fabricante.

Foram adicionados 2 ng do pSPAX2, pCMV-VsVg e lentiCRISPR v2 em uma solução de células bacterianas (50 μ L). Essa solução foi mantida por 30 minutos a 4°C e logo 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 μ L de meio LB Broth em 50 μ L de bactérias e as bactérias foram mantidas em incubadora por 1 hora a 37°C com agitação de 225 rpm. Aproximadamente 100 μ L de suspensão bacteriana foi semeado em meio LB Agar com ampicilina (100 μ g/mL) e incubado a 37 °C por 16 horas. Foi realizado também um controle negativo para validação da concentração de antibiótico.

3.4.2. Cultura bacteriana

Para amplificação do vetor, foram utilizadas as bactérias quimicamente competentes DH5- α (catálogo nº 18265-017, Invitrogen, NY, EUA), cultivadas em meio Luria Bertani – LB Broth, Lennox (10855-001 – Gibico® Life Technologies, NY, EUA) para o cultivo em suspensão e Luria Bertani – LB Ágar, Lennox (22700-025 – Gibico® Life Technologies, NY, EUA) para o cultivo utilizando a técnica de

esgotamento. Todos os meios foram esterilizados e para garantir somente o crescimento das bactérias transformadas com o vetor, foi acrescentado o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/mL.

3.4.3. Extração de DNA plasmidial

A partir de cinco colônias isoladas de cada placa de bactéria sg1, sg2, sg3, pSPAX2, pCMV-VsVg e Mock crescidas em LB Agar foi preparado o inóculo em 100 mL de meio LB Broth com 100 µg/mL do antibiótico ampicilina e incubado a 37 °C por 16 horas com agitação de 200 rpm.

A extração foi realizada com o kit NucleoBond® Xtra Mid (catálogo nº 740410.50 Macherey-Nagel, Mountain View, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. O pellet bacteriano foi ressuspensionado 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 realizada adicionando-se isopropanol seguido de uma centrifugação de 15000 x 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).

3.4.4. Transfecção para as células de empacotamento – HEK293T

Para a transfecção, as 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 7,5 µg do DNA plasmidial de interesse de cada vetor (sg1, sg2, sg3 e Mock como controle), 5,5 µg do DNA do pSPAX2, 4 µg do DNA do pCMV-VsVg e meio DMEM puro totalizando 1,5 mL adicionando 35 µL do Reagente P3000. Como reagente de transfecção foi utilizado Lipofectamina® 3000 (catálogo nº 11668027, Invitrogen, NY, EUA) diluída 1:37 em meio DMEM puro em volume final de 1,5 mL 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. Após um período de contato de 4 horas, agitando-se suavemente a cada 30 minutos, então foi adicionado 1,5 mL de meio DMEM 10% SFB em cada poço. Após 48 horas de transfecção, o meio foi coletado, filtrado e armazenado a -80°C.

3.5. Transdução estável das células 786-0

3.5.1. Curva de resistência a puromicina

Para avaliar a melhor concentração de antibiótico a ser usada na seleção das células 786-0, foi realizada uma curva de resistência com o antibiótico puromicina (A1113803 – Invitrogen, NY, EUA) nas concentrações de 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL. As células 786-0 (2×10^5 /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e 24 horas depois a puromicina foi adicionada aos poços, nas concentrações citadas anteriormente. As células foram acompanhadas por 7 dias.

3.5.2. Transdução das células 786-0

Células 786-0 foram semeadas (5×10^4 células) em placa de 6 poços e mantidas por 24 horas. Após esse período, o meio foi substituído por meio RPMI sem SFB, meio contendo as partículas virais coletadas na proporção de 1:1 e 8 µg/ml de Polibreno – Hexadimethrine Bromide (107689-10G Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). As células foram incubadas a 37°C durante 6 horas e então a mistura foi substituída por RPMI 10% SFB. Após 48 horas deu-se início à seleção das células 786-0 transduzidas utilizando puromicina (2 µg/mL) durante 10 dias.

O uso de organismos geneticamente modificados (OGM) neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Biossegurança do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) sob o número 03/2018.

3.6. Cultura em Hipóxia

Para o ensaio de hipóxia foram semeadas aproximadamente 2×10^5 células no dia anterior à realização do ensaio em placas de petri de 60 mm, e então as células foram colocadas durante 6 horas em uma câmara úmida indutora de hipóxia (StemCell™ Technologies, USA), como mostra a Figura 9, com atmosfera de 1% de O_2 , 5% de CO_2 , 94% de N_2 e armazenadas em estufa a $37^\circ C$ (47). O detector de gás único O_2 Altair PRO (Cód.: 217597, MSA, Cranberry Township, Pennsylvania, USA) foi utilizado para medir a concentração de O_2 dentro da câmara.

Figura 9 – Câmara de Hipóxia. A. Câmara indutora de hipóxia StemCell™ Technologies. B. Manômetro de fluxo único StemCell™ Technologies. (<https://www.stemcell.com/hypoxia-incubator-chamber.html>).

3.7. Extração de RNA

Para a extração de RNA as células foram lavadas com PBS e em seguida foi realizada a extração utilizando o RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Ao final o RNA foi diluído em água RNase-free, e seguido da determinação da concentração do RNA (ng/ μL) e pureza (OD260/280), por espectrometria no Nanodrop® ND-100 (ThermoScientific). O RNA foi considerado puro se o OD260:OD280 estivesse ente 1.8 a 2.1.

3.8. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA obtido através da extração, utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Alemanha). Foi preparado um mix contendo o RNA, o buffer para eliminação do DNA genômico e H₂O, esse mix foi incubado a 42°C por 2 minutos e conservado em gelo. A esse primeiro mix foi adicionado o buffer da transcriptase reversa, a enzima e o RT primer e então foi incubado a 42°C por 15 minutos e 95°C por 3 minutos. Após o processo a amostra de cDNA foi armazenada em -20°C até as reações de RT-qPCR serem realizadas.

3.9. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Todas as reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green® (Applied Biosystems, NY, EUA). O volume final da reação foi de 10 µL (5 µL de SYBR Green e os 5 µL restantes continham o cDNA, os primers e a H₂O). A reação de amplificação foi realizada pelo sistema de PCR – tempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems, NY, EUA) seguindo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada pela quantificação relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para cada amostra foi detectado o valor de C_t (tempo de ciclagem), tanto para os genes alvo como para o normalizador (TFRC).

Para o desenho dos primers foi utilizado o programa Primer Express 3.0 (Life Technologies, MD, EUA) e as sequências foram confirmadas no BLAST. Todas as sequências utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequência de primers utilizados para avaliar a expressão gênica relativa.

Gene	Foward (5'-3')	Reverse (5'-3')
18S	CGGACCAGAGCGAAAGCAT	CCTCCGACTTTTCGTTCTTGATT
ACTB	CGTGGACATCCGCAAAGAC	GCATCCTGTCTGGCAATGC
GAPDH	CACATGGCCTCCAAGGAGTAA	TGAGGGTCTCTCTCTTCTCTTGT
HPRT1	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
PGK1	GCTGCTGGGTCTGTCATCCT	GCATCTTTTCCCTTCCCTTCTT
RPLP0	TGCTCAACATCTCCCCCTTCT	ATGCTGCCATTGTCTGAACAC
SDHA	TCTCTGCGATATGATACCAGCTATTT	GGCACTCCCCATTCTCCAT
TFRC	GGAGGACGCGCTAGTGTCT	TGCTGATCTAGCTTGATCCATCA
VEGF-α	CGAGGGCCTGGAGTGTGT	CCGCATAATCTGCATGGTGAT
IL-6	ATTCCTCCCCCGCATCA	CAGAGGGGCCTACCCTTAGC

3.10. Ensaio de eficiência dos genes endógenos

Este ensaio foi realizado com a colaboração do Dr. Rodrigo Giglioti do Instituto de Zootecnia do Governo do Estado de São Paulo.

Para este ensaio foram utilizadas apenas as células controle (786-0 WT) nas condições de normóxia e hipóxia. Foram utilizados 4 algoritmos para a determinação do gene endógeno mais estável em condições de normóxia e hipóxia: NormFinder (48), geNorm (49), BestKeeper (50) e o método Delta-Ct (Δ Ct) (51). O NormFinder calcula a estabilidade de genes de referência baseado em variabilidades intra- e intergrupos. O peso de medida desses parâmetros é expresso com o valor S e o gene de referência mais estável tem o menor valor S (48); O GeNorm calcula uma média de estabilidade da expressão (M-value). Quanto menor o M-value maior a estabilidade (49); O BestKeeper calcula uma correlação do coeficiente de Pearson para cada gene, valores de p próximos a 1,0 indicam a maior estabilidade (50); O método comparativo Δ Ct usa uma abordagem básica do Δ Ct para comparar a expressão relativa de pares de genes, criando uma classificação de estabilidade com base no Δ Ct e no desvio padrão médio, e os que apresentaram o menor desvio padrão médio (DP) e valores constantes de Δ Ct foram considerados como sendo os mais estáveis (51). Além disso, uma vez que todos os valores de estabilidade para todas as ferramentas foram

obtidos, a função BruteAggreg, uma ferramenta de agregação de classificação ponderada do pacote RankAggreg (52). Este, por sua vez, é um pacote R que usa um algoritmo de Monte Carlo para calcular a distância de Spearman para obter a classificação geral entre os genes e ferramentas avaliados (NormFinder, geNorm, BestKeeper e Delta-Ct (ΔCt)).

3.11. Extração de proteínas e dosagem da concentração proteica

A extração das proteínas foi realizada utilizando o reagente de lise CellLytic™ M (C2978, Sigma) seguindo as especificações do fabricante.

A dosagem da concentração proteica foi realizada com base no método de LOWRY, utilizando o Kit BCA protein (Bioagency, Brasil) seguindo as especificações do fabricante (Spectra Max 190, Molecular Devices).

3.12. Western Blotting

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12% e gel de empilhamento a 3%. Para a análise de proteínas totais foram utilizados 30 µg por amostra. Foi adicionado o tampão de amostra: Tris 50 mM, pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/mL e β -mercaptoetanol 1%. O padrão de peso molecular utilizado foi o marcador Prec Plus STD Kaleidoscope (BioRad, San Diego USA). Os géis foram submetidos a uma corrente de 200V por, aproximadamente uma hora, até a saída do corante de bromofenol do gel. Após a eletroforese foi realizada a transferência semisseca para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Hybond-ECL, Amersham Bioscience, USA) utilizando o sistema Power Blotter System (Life Technologies Biotechnology Co.) por 15 minutos a 2,5 Amps. Após o tempo decorrido a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X e deixada em agitação por 1 hora em leite desnatada 5% a fim de efetuar o bloqueio de reações inespecíficas. Após lavagens, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-NF- κ B1 p105/p50 (ab32360 rabbit monoclonal), EPAS-1/HIF-2 α (sc-46691 mouse monoclonal) e anti- β -actin (ab123020 mouse monoclonal) 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) ambos conjugados com HRP, em processo semelhante ao realizado com o primário diluído em leite desnatado a 5% em 1:1000 e ficou incubando por 2 horas em temperatura ambiente sob leve agitação.

A revelação foi realizada utilizando o kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific, EUA). A fotodocumentação foi realizada utilizando o equipamento Alliance 4,7 Uvitec Cambridge.

3.13. Ensaio de imunoabsorção enzimática

A quantificação de VEGF e IL-6 foi realizada utilizando o kit MILLIPLEX MAP Human Circulating Cancer Biomarker (Cat. #HCCBP1MAG-58K, Merk Millipore, USA) seguindo as orientações do fabricante.

O ensaio, leitura da placa e o processamento dos dados foi realizado no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) utilizando o equipamento Luminex® 200™ – Bio Plex®200.

3.14. Análise Estatística

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 *** $P < 0,001$.

3.15. Mapa de interação proteína-proteína

Um mapa de interação proteína-proteína foi gerado usando o site STRING v11.0 inserindo as seguintes proteínas: NF- κ B1, IL-6 e MMP-9. Os resultados foram configurados para exibir até 10 interações (78).

4. RESULTADOS

4.1. Produção das células *knockout*

4.1.1. Curva de resistência à puromicina

As células 786-0 foram cultivadas em placas de 6 poços e tratadas com concentrações crescentes de puromicina, de 1,0 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Um dia após o tratamento com a puromicina as células estavam aderidas e viáveis (Figura 10A-10E). Após 6 dias de seleção observou-se 100% de mortalidade celular em todas as concentrações utilizadas. (Figura 10A1-10E1).

Figura 10 – Células tratadas 786-0 com puromicina. (A–E) 1º dia em contato com o antibiótico. (A1–E1) 6º dia com antibiótico após o início do tratamento com puromicina. A e A1 controle do antibiótico, B e B1 1 $\mu\text{g/mL}$, C e C1 2 $\mu\text{g/mL}$, D e D1 5 $\mu\text{g/mL}$, E e E1 10 $\mu\text{g/mL}$. Fotos tiradas em microscópio invertido Nikon Eclipse NS100 com o aumento de 40X.

A concentração de trabalho escolhida foi a de 2 $\mu\text{g/mL}$, pois foi suficiente para eliminar 100% das células não resistentes à puromicina no tempo observado.

4.1.2. Rendimento do DNA plasmidial

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram amplificados em bactérias hospedeiras e após a extração foram analisados no espectrofotômetro Nanodrop ND-2000. O pSPAX2 apresentou o maior rendimento (152,76 $\mu\text{g/mL}$) e o pCMV-VSVg o

menor (35,65). Entretanto, Todas as extrações apresentaram alto grau de pureza (Tabela 4).

Tabela 4 – Rendimento do DNA plasmidial em µg/mL e a concentração de DNA total em µg, seguido da relação 260/280.

Plasmídeo	Concentração (µg/mL)	Total DNA (µg)	260/280
pSPAX2	1,527	152,76	1,91
pCMV-VsVg	0,356	35,65	1,98
Mock	0,381	38,14	1,95
sg1	1,097	109,70	1,92
sg2	0,841	84,10	1,90
sg3	1,116	111,60	1,98

4.1.3. Transfecção das células HEK293T

Após incubação das células HEK293T com a mistura contendo o DNA plasmidial (Mock, sg1, sg2, sg3), vetores pSPAX2 e pCMV-VsVg e meio DMEM puro com o reagente de transfecção, lipofectamina P3000, foi observada a morfologia celular, notando-se que as células mantiveram sua morfologia epitelial característica, em colônias afastadas umas das outras, com um número baixo de células por colônias. As células foram mantidas em cultura por 48 horas, e foram realizadas coletas das partículas virais.

4.1.4. Transdução das células 786-0

Foi realizada a transdução das células 786-0 com as partículas lentivirais: Mock, sg1, sg2 e sg3, obtidas anteriormente a partir do meio de cultura das células HEK293T 48 horas após a transfecção juntamente com meio RPMI e polibreno. As células foram incubadas com esse mix e ficaram em cultura durante 48 horas. Em seguida foi

iniciado o processo de seleção com puromicina, que persistiu durante 14 dias, trocando-se o meio durante todo esse período.

4.1.5. Avaliação do nível de acúmulo proteico de NF- κ B1 por Western Blotting

A expressão das proteínas p50 e p105 foi verificada em extratos proteicos totais das células 786-0 WT, 786-0 Mock, 786-0 sg1, 786-0 sg2 e 786-0 sg3. Os resultados mostram que o anticorpo utilizado anti-NF- κ B1 p105/p50 (ab32360 rabbit monoclonal) é mais específico para a porção p50 do NF- κ B1, sendo essa banda utilizada para análise da eficiência do silenciamento gênico.

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que a técnica de CRISPR/Cas9 causou o *knockout* do gene NF- κ B1, resultando no bloqueio da expressão das proteínas p50 e p105.

Figura 11 – Western Blotting da p50 e p105 normalizado por β -actina dos grupos controle e 786-0 sgRNA NF- κ B1

4.2. Rendimento da extração de RNA

A extração de RNA teve um rendimento que variou de 2080,15 a 3689,45 ng/ μ L e todas as amostras apresentaram alta pureza, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Rendimento (média $\pm$ desvio padrão) do RNA das células em ng/ μ L seguido da relação 260/280.

Linhagem celular	Normóxia		Hipóxia	
	Concentração (ng/ μ L)	260/280	Concentração (ng/ μ L)	260/280
786-0 WT	3616,80 $\pm$ 746,70	2,08 $\pm$ 0,01	3143,20 $\pm$ 76,93	2,08 $\pm$ 0,01
786-0 Mock	3072,65 $\pm$ 58,90	2,03 $\pm$ 0,01	2208,40 $\pm$ 398,38	2,06 $\pm$ 0,01
786-0 sg1	3064,45 $\pm$ 140,08	2,05 $\pm$ 0,02	2608,65 $\pm$ 700,81	2,08 $\pm$ 0,02
786-0 sg2	3346,00 $\pm$ 86,83	2,09 $\pm$ 0,01	2511,55 $\pm$ 172,46	2,09 $\pm$ 0,00
786-0 sg3	3689,45 $\pm$ 113,63	2,05 $\pm$ 0,01	2080,15 $\pm$ 19,30	2,06 $\pm$ 0,01

4.3. Avaliação da eficiência dos genes endógenos

Foram utilizados 4 algoritmos para determinar a estabilidade do melhor gene endógeno (GE) para células 786-0: NormFinder, geNorm, BestKeeper e método Delta-Ct (ΔC_T). Ao final foi utilizado o RankAgreg para comparar todos os algoritmos.

4.3.1. Especificidade dos primers

A especificidade dos primers concebidos para amplificação de GEs foi determinada por análise da curva de fusão. Para cada primer, um único pico de fluorescência foi detectado, indicando que apenas um fragmento foi amplificado durante a amplificação qPCR (Figura 12). A eficiência dos primers (E) variou de 1,98 a 2,02 e o coeficiente de correlação (R²) variou de 0,99 a 1,00.

Figura 12 – Análises da curva de dissociação dos 8 genes candidatos.

4.3.2. Estabilidade de expressão de genes de referência em condições normóxicas e hipóxicas

A estabilidade dos genes endógenos foi realizada como descrito anteriormente utilizando as células 786-0 WT nas condições de normóxia e hipóxia.

Ao comparar a ciclagem dos genes submetidos à análise (Figura 13), pode ser observado a distribuição do Ct. O gene que se manteve mais estável foi o TFRC.

Figura 13 – Distribuição do Ct dos genes endógenos Normóxia X Hipóxia. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

4.3.3. Determinação da estabilidade da expressão de genes de referência candidatos.

A estabilidade dos genes endógenos foi determinada pelo BestKeeper com base na extensão do desvio padrão ($DP \pm DP$) com maior valor de DP correspondendo à baixa estabilidade dos genes HK. De acordo com a classificação do BestKeeper, *TFRC* (0,38), foi o melhor candidato, seguido por *SDHA* (0,60) e *HPRT1* (0,63) (Tabela 5).

A análise GeNorm classificou os genes de referência de acordo com sua estabilidade de expressão média (valor M) usando o valor Ct de todas as amostras. As amostras com menor valor M foram consideradas as mais estáveis e vice-versa. O valor M dos genes HK variou de 0,65 a 1,55. *TFRC* e *RPLP0* apresentaram a maior estabilidade (0,65), seguido por *SDHA* (0,75) e *PGK1* (0,89) (Tabela 5).

Variações intra e intergrupos foram empregadas para estimar os valores de estabilidade na análise NormFinder. Seguindo esta abordagem, *TFRC* (valor S, 0,20) foi identificado como o gene mais estável, seguido por *SDHA* (valor S, 0,51) e *RPLP0* (valor S, 0,51) (Tabela 5).

Finalmente, a estabilidade dos genes foi determinada usando métodos ΔC_t comparativos com base no desvio padrão (SD). O valor de SD mais baixo está correlacionado à maior estabilidade dos genes de HK. O *TFRC* com valor SD de 1,15 foi considerado o gene HK mais estável, seguido por *SDHA* (1,20) e *RPLP0* (1,20) (Tabela 6).

Tabela 6 – Classificação da estabilidade da expressão T dos genes de referência candidatos de acordo com a análise BestKeeper, geNorm, NormFinder e a análise Delta CT.

Gene	BestKeeper (Power of the gene)	geNorm (M-value)	NormFinder (S-value)	ΔC_t	Ranking final
<i>TFRC</i>	0.38 (1)	0.65 (1)	0.20 (1)	1.15 (1)	1
<i>RPLP0</i>	0.70 (4)	0.65 (1)	0.51 (3)	1.24 (3)	2
<i>SDHA</i>	0.60 (2)	0.74 (2)	0.38 (2)	1.20 (2)	3
<i>PGK1</i>	0.74 (5)	0.89 (3)	0.74 (4)	1.65 (6)	4
<i>HPRT1</i>	0.63 (3)	0.97 (4)	0.81 (5)	1.46 (4)	5
<i>GAPDH</i>	1.18 (6)	1.09 (5)	1.06 (6)	1.48 (5)	6
<i>ACTB</i>	1.63 (8)	1.30 (6)	1.56 (7)	2.00 (7)	7
<i>X18S</i>	1.43 (7)	1.55 (7)	1.94 (8)	2.29 (8)	8

Os genes ordenados por classificação calculados pelos quatro algoritmos apresentados na Tabela 6 foram posteriormente analisados por RankAggreg (52) para obter uma lista de classificação de consenso de genes. A estabilidade dos genes de referência candidatos estava na ordem *TRFC* > *RPLP0* > *SDHA* > *PGK1* > *HPRT1* > *GAPDH* > *ACTB* > *X18S* (Figura 14).

Figura 14 – Agregação de classificação dos 8 genes de referência candidatos. O pacote RankAggreg foi carregado no software R. As classificações BestKeeper, NormFinder e geNorm e ΔCt são representadas como linhas cinzas. A linha preta representa a classificação média de cada gene de acordo com cada método. A linha vermelha indica o resultado do algoritmo de entropia cruzada.

4.4. Avaliação dos níveis proteicos de HIF- α

A expressão de HIF- α foi verificada por WB em extratos proteicos totais (Figura 15A) e as bandas do WB foram analisadas por densitometria e os valores numéricos estão representados na Figura 15B e 15C.

Os resultados mostraram que em normóxia os níveis foram baixos não havendo diferença entre os grupos (Figura 15B). Em hipóxia os níveis proteicos aumentaram em todos os grupos em especial nas células 786-0 WT e 786-0 Mock. A diminuição de HIF-1 em normóxia foi de $0,63 \pm 0,10$ vezes na 786-0 sg1; $0,64 \pm 0,09$ vezes na 786-0 sg2; $0,65 \pm 0,11$ vezes na 786-0 sg3, todas em relação a 786 0-Mock ($P < 0,05$). (Figura 15B) Em hipóxia foi de $0,50 \pm 0,05$ vezes na 786-0 sg1; $0,51 \pm 0,08$ vezes na 786-0 sg2; $0,53 \pm 0,08$ vezes na 786-0 sg3, todas em relação a 786-0 Mock ($P < 0,05$). (Figura 15C).

A análise comparativa do padrão de expressão de HIF- α em hipóxia e normóxia está apresentada na Figura 15D. Em relação à expressão de HIF- α apresentada em normóxia, as células 786-0 WT apresentaram um aumento de $2,02 \pm 0,13$ vezes

($P < 0,001$); 786-0 Mock um aumento de $2,19 \pm 0,34$ vezes ($P < 0,001$); 786 sg1 um aumento de $1,07 \pm 0,01$ vezes ($P < 0,05$); 786 sg2 um aumento de $1,40 \pm 0,18$ vezes ($P < 0,05$) e 786 sg3 um aumento de $1,62 \pm 0,12$ vezes ($P < 0,05$).

Figura 15 – Níveis de acúmulo proteico de HIF-2 α . (A) Representação gráfica dos níveis de acúmulo da proteína nas células nocauteadas e controles, detectados por Western Blotting. Análise quantitativa dos níveis de proteína foi realizada utilizando o programa ImageJ 1.6.0_24 e normalizado com beta-actina. (B) Níveis da proteína em normóxia. (C) Níveis da proteína em hipóxia. (D) Comparação entre normóxia e hipóxia. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. (B e C) Análise de variância One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni, (D) Teste t com correção de Welch programa GraphPad Prism 6.

4.5. Avaliação dos níveis de RNAm do VEGF e da IL-6

A produção de RNAm de VEGF- α e IL-6 nas células transduzidas, em condição de normóxia e hipóxia, foi analisada por RT-qPCR. Para ambas as moléculas estudadas, a produção de RNAm do clone 786-0 WT foi semelhante à apresentada pelo clone 786-0 Mock.

O perfil de produção de RNAm do VEG-F e da IL6 nos clones foi reduzida em relação às células 786-0-Mock. Sendo assim, em normóxia as reduções de VEGF verificadas foram: $99,68 \pm 0,09$ % para 786-0 sg1, $78,55 \pm 0,85$ % para 786-0 sg2 e

91,70 $\pm$ 0,87 % para 786-0 sg3. Em hipóxia as reduções de VEGF verificadas foram: 98,30 $\pm$ 1,49 % para 786-0 sg1, 75,21 $\pm$ 4,14 % para 786-0 sg2 e 98,44 $\pm$ 0,18 % para 786-0 sg3. (Figura 16A e 16A1).

A expressão do gene IL6 nos clones silenciados foi significativamente inferior à apresentada pelas células 786-0 Mock tanto em normóxia (786-0 sg1-49,03 $\pm$ 0,80 %, 786-0 sg2 - 76,59 $\pm$ 12,43 %, 786-0 sg3 - 66,98 $\pm$ 10,89 %) quanto em hipóxia (786-0 sg1 - 95,85 $\pm$ 0,36 %, 786-0 sg2 - 96,45 $\pm$ 0,49 %, 786-0 sg3 - 91,08 $\pm$ 1,42 %). (Figura 16B e 16B1).

Figura 16 – Quantificação relativa da expressão de mRNA das amostras em condição de normóxia e hipóxia normalizado pelo gene endógeno *TRFC*. (A) VEGF- α em condição de normóxia, (A1) VEGF- α em condição de hipóxia, (B) IL-6 em condição de normóxia.. (B1) IL-6 em condição de hipóxia. Análise de variância One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni; programa GraphPad Prism 6.0. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Também foi feita uma análise da expressão relativa de RNAm das moléculas, comparando a condição de Hipóxia em relação a condição de normóxia, observamos que houve um aumento de expressão de ambas as moléculas em todas as células,

mas as células 786-0 WT e 786-0 Mock apresentaram um aumento claramente maior que as células transduzidas.

As análises do gene VEGF mostraram que houve um aumento de expressão em hipóxia de $1791,97 \pm 87,96$ % nas células 786-0 WT, $1758,64 \pm 93,57$ % nas células 786-0 Mock, $307,27 \pm 67,56$ % nas células 786-0 sg1, $195,36 \pm 11,35$ % nas células 786-0 sg2, $150,42 \pm 28,93$ % nas células 786-0 sg3 em relação a normóxia.

As análises do gene IL-6 mostraram que houve um aumento de expressão em hipóxia de $594,67 \pm 108,29$ % nas células 786-0 WT, $420,74 \pm 69,78$ % nas células 786-0 Mock, $168,30 \pm 39,09$ % nas células 786-0 sg1, $213,90 \pm 42,77$ % nas células 786-0 sg2, $132,45 \pm 36,89$ % nas células 786-0 sg3 em relação a normóxia. (Figura 17).

Figura 17 – Quantificação relativa da expressão de mRNA das amostras em condição de hipóxia em relação a normóxia, normalizado pelo gene endógeno *TRFC*. (A-E) VEGF- α , A – Células 786-0 WT, B – Células 786-0 Mock, C – Células 786-0 sg1, D – Células 786-0 sg2, E – Células 786-0 sg3. (F-J) IL-6, F – Células 786-0 WT, G – Células 786-0 Mock, H – Células 786-0 sg1, I – Células 786-0 sg2, J – Células 786-0 sg3. Análise de variância Teste t com correção de Welch; programa GraphPad Prism 6.0. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

4.6. Análise dos níveis proteicos de VEGF e IL-6

Os níveis de VEGF e IL-6 no meio de cultura foram avaliados utilizando o kit MILLIPLEX MAP Human Circulating Cancer Biomarker (Merk Millipore, USA), comparando as amostras nas condições de normóxia e hipóxia. A hipóxia promoveu

um aumento da expressão tanto do VEGF como da IL6. Os resultados mostram que houve uma redução significativa tanto do VEGF quanto da IL6 no meio de cultura das células nocauteadas em normóxia e hipóxia (Figura 18). Em normóxia, o clone 786-0 sg1 apresentou níveis mais elevados de VEGF em relação ao clone 786-0 sg2 ($P<0,01$) e o clone 786-0 sg3 ($P<0,001$) (Figura 18A). Em relação à IL6 o clone 786-0 sg1 apresentou expressão superior ao clone 786-0 sg2 ($P<0,05$). Em hipóxia os níveis de VEGF expressos pelos clones foram semelhantes. Entretanto, os níveis de IL6 do 786-0 sg3 foi significativamente inferior em relação aos outros clones ($P<0,001$).

Figura 18 – Nível de expressão de VEGF e IL-6 (pg/mL) em condições de normóxia e hipóxia. (A) Expressão de VEGF em normóxia. (B) Expressão de IL-6 em normóxia. (A1) Expressão de VEGF em hipóxia. (B1) Expressão de IL-6 em hipóxia. Análise de variância One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni; programa GraphPad Prism 6.0. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Os mesmos dados avaliados na figura anterior foram utilizados para o cálculo da expressão diferencial hipóxia/normóxia. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo Teste do Chi-Quadrado. Em relação ao VEGF o único grupo que apresentou diferença de expressão hipóxia/normóxia em relação à apresentada pelo grupo controle 786-0 Mock, foi o 786 sg2 ($p < 0,001$). (Tabela 7). Por outro lado, os

resultados da IL6 foram mais consistentes. Verificou-se que os três grupos nocauteados apresentaram diferença de produção da IL 6 nas duas condições experimentais significativamente inferiores às apresentadas pelo grupo controle. (786 sg1 vs 786-0 Mock - $p < 0,05$; 786 sg2 vs 786-0 Mock - $p < 0,05$, 786 sg3 vs 786-0 Mock - $p < 0,001$). (Tabela 8)

Tabela 7 – Níveis de expressão de VEGF em condição de normóxia e hipóxia. Valores representam média $\pm$ desvio padrão em pg/mL e a diferença é medida em vezes.

Célula	Normóxia (pg/mL)	Hipóxia (pg/mL)	Diferença de expressão (vezes)	Valor de p
786-0 WT	262,12 $\pm$ 17,15	1992,00 $\pm$ 25,28	7,62 $\pm$ 0,41	0,6317
786-0 Mock	273,46 $\pm$ 7,62	1986,46 $\pm$ 87,71	7,27 $\pm$ 0,53	-
786-0 sg1	156,00 $\pm$ 11,14	701,65 $\pm$ 1,61	4,51 $\pm$ 0,34	0,001
786-0 sg2	106,38 $\pm$ 1,06	717,58 $\pm$ 8,30	6,75 $\pm$ 0,03	0,5522
786-0 sg3	95,86 $\pm$ 1,65	620,17 $\pm$ 2,54	6,47 $\pm$ 0,11	0,3494

Tabela 8 – Níveis de expressão de IL-6 em condição de normóxia e hipóxia. Valores representam média $\pm$ desvio padrão em pg/mL e a diferença é medida em vezes.

Célula	Normóxia (pg/mL)	Hipóxia (pg/mL)	Diferença de expressão (vezes)	Valor de p
786-0 WT	121,62 $\pm$ 6,89	761,67 $\pm$ 29,61	6,28 $\pm$ 0,47	0,6633
786-0 Mock	119,31 $\pm$ 8,76	795,62 $\pm$ 14,65	6,69 $\pm$ 0,36	-
786-0 sg1	82,13 $\pm$ 11,94	365,16 $\pm$ 4,74	4,50 $\pm$ 0,59	<0,05
786-0 sg2	59,80 $\pm$ 5,78	316,74 $\pm$ 20,56	4,91 $\pm$ 0,19	<0,05
786-0 sg3	78,55 $\pm$ 0,97	183,40 $\pm$ 1,66	2,34 $\pm$ 0,01	<0,001

4.7. Mapa de interação entre proteínas

O banco de dados STRING é um dos vários recursos online dedicados a redes de associação de proteínas dentro de um organismo. Esse banco de dados visa colocar seu foco na cobertura (aplicando-se a milhares de organismos sequenciados pelo genoma), na integridade das fontes de evidências (por exemplo, incluindo mineração de texto automatizada) e nos recursos de usabilidade (como

personalização, detecção de enriquecimento e acesso programático). Ele oferece visualizadores online para facilitar a inspeção das evidências subjacentes que apoiam cada associação proteína-proteína (78).

Foi criado um mapa de interação entre as proteínas utilizando a rede STRING (Figura 19), demonstrando evidência da interação entre as moléculas NF- κ B1, IL-6 e MMP-9.

Figura 19 – Mapa de interação entre as proteínas criado na rede STRING mostrando interação entre NF- κ B1, IL-6 e MMP-9.

5. DISCUSSÃO

A hipóxia está presente em várias áreas de tumores malignos resultando na resposta adaptativa celular. Tal resposta implica na regulação da expressão de genes que irão impactar na sobrevivência das células tumorais e, consequentemente na progressão do tumor (53). A hipóxia pode rapidamente ativar a via de transdução de sinais NF- κ B, aumentando sua atividade de ligação à regiões promotoras no DNA. Genes ativados pela via NF- κ B permite a sobrevivência das células em ambiente com baixa pressão de oxigênio. Nesse estudo, o NF- κ B1 um dos componentes do dímero mais frequente de NF- κ B foi suprimido na linhagem de adenocarcinoma de células claras, 786-0. Para tanto, empregou-se a tecnologia CRISPR / Cas9.

Na primeira etapa desse trabalho, realizou-se o ensaio de resistência à puromicina, a amplificação e purificação dos vetores empregados no processo do nocaute gênico. No ensaio de resistência à puromicina observou-se que todas as concentrações utilizadas foram efetivas. A concentração de 2 μ g/mL foi utilizada nos ensaios subseqüentes. Essa concentração também foi utilizada por Gao e cols (2016) para seleção de células 786-0 em um estudo de resistência à terapia com Sunitinib (54). O rendimento de extração plasmidial variou de 35,65 a 152,76 μ g/mL entretanto, todas as preparações apresentaram alta pureza, A260nm/A280nm variou de 1,90 a 1,98. Tais valores foram superiores ao mínimo aceitável (1,8) para transfecção de células de mamíferos (55).

Em seguida, as células 786-0 foram transduzidas com lentivírus, usando o envelope VSVG, codificando os candidatos de sgRNA (gRNA1 ou gRNA2 ou gRNA3) o cassete de resistência à puromicina. Os clones obtidos, após a seleção com a puromicina, foram denominados 786-0 sg1, 786-0 sg2 e 786-0 sg3. A confirmação da eficácia do nocaute gênico foi realizada por imunodeteção. Esses resultados demonstram que a técnica CRISPR / Cas9 foi altamente eficaz na edição na linhagem tumoral renal de células claras. Resultados igualmente satisfatórios foram obtidos por Bin Liu e cols (2020) onde linhagens de células renais tumorais nocaute para gene do receptor do fator de crescimento epidérmico foram observadas (56).

Na segunda etapa do trabalho foi realizada a identificação de genes de endógenos apropriados para estudos de expressão gênica, mediante a técnica de PCR-qRT, de células 786-0 em normóxia e em hipóxia. A seleção de genes de referência adequados

para análises de expressão gênica foi recentemente destacada em vários estudos (57-61). A hipóxia está presente em cerca de 80% dos CCR e modula o perfil de expressão gênica resultando em um fenótipo agressivo desse tumor (62). Apesar da grande importância da hipóxia na fisiopatologia do CCR, estudos sobre genes de housekeeping mais adequados são escassos. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo sobre o gene HK apropriado sob condição de hipóxia em células CCRcc. Para este propósito, 8 genes de referência putativos (*RRN18S*, *ACTB*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PGK1*, *RPLP0*, *SDHA* e *TFRC*) em linhagem de células CCRcc em condições de normóxia e hipóxia foram avaliados de acordo com sua estabilidade de expressão e consistência com quatro ferramentas específicas diferentes: método geNorm, NormFinder, BestKeeper e ΔCt . Além disso, o RankAggreg foi usado para gerar uma classificação de consenso. De maneira geral, foi possível observar uma concordância parcial dos três melhores genes normalizadores (*TFRC*, *SDHA* e *RPLP0*) escolhidos entre as quatro metodologias (Tabela 5). Enquanto *X18S* e *ACTB* foram considerados os genes menos estáveis. De acordo com os quatro algoritmos, o gene de referência *TFRC* foi apontado como o gene mais estável, seguido pelos genes *SDHA* e *RPLP0*. *RPLP0* foi o gene que apresentou grande discrepância entre os quatro algoritmos, variando de 1 ° pelo geNorm a 4 ° pelo BestKeeper. (Tabela 5. Fig. 11). Esta discordância é possivelmente devido aos diferentes princípios entre os algoritmos (63).

Para uma análise integrada integrada os quatro programas diferentes, o RankAggreg, um algoritmo de entropia cruzada de Monte Carlo, foi empregado para chegar a um consenso entre os dados obtidos pelo outros quatro algoritmos (64,65).

A alta estabilidade do *TFRC* foi demonstrada no câncer de mama (66) e no câncer pancreático (67). Além disso, descobriu-se que o *TFRC* é o gene de referência mais adequado para células HUVEC submetidas a condições experimentais de hipóxia (68). *RPLP0* foi encontrado para ser um gene de referência ideal para análise de expressão usando tumores renais fixados em formalina e embebidos em parafina (69). *RPLP0* também foi um gene de referência adequado para normalizar o nível de expressão gênica em experimentos de qRT-PCR em culturas HUVEC hipóxicas e / ou hiperglicêmicas (70). Finalmente, o gene de referência *SDHA* ficou em 3º lugar no RankAgreeg. Este gene foi usado como referência para a avaliação da expressão gênica em amostras de tecido renal por Jennifer Hansson e cols. 2016 (71). O *TFRC*, *RPLP0* e *SDHA* foram considerados o gene mais estável entre os 8 genes avaliados

nas ferramentas analisadas, e podem ser recomendados para normalização de dados de expressão gênica em qPCR em estudos de impacto da hipóxia em células tumorais renais.

A última etapa desse trabalho foi a verificação do impacto do nocaute da proteína gene NF- κ B1 (p105/p50), utilizando a técnica CRISPR-Cas9, nos níveis de HIF-2 α , VEGF e IL6 nas células 786-0. A ativação de muitos genes regulados pela pressão de oxigênio (pO₂) é mediada pelo fator indutível por hipóxia, o HIF, um heterodímero composto pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β . Embora o HIF-1 α seja a isoforma mais conhecida e amplamente descrita, estudos recentes sugerem que o HIF-2 α , é um regulador crítico da angiogênese fisiológica e fisiopatológica e, pelo menos, o similarmente importante como o HIF-1 α . Na verdade, foi demonstrado que o HIF-2 α regula vários aspectos da angiogênese, incluindo proliferação celular, migração, maturação de vasos sanguíneos e metástase (72). Em normóxia a subunidade HIF-2 α é instável o que justifica os níveis intracelulares baixos encontrados nesse trabalho e também por Albadari e cols (2019) (73). Apesar desses níveis basais foi possível verificar que nas células nocaute- NF- κ B1 apresentaram redução significativa dessa proteína. Atribuímos essa modulação ao fato de que, nas células 786-0, a via de sinalização NF- κ B esta constitutivamente ativada. Tal fato promove um desbalanço do metabolismo oxidativo o que, por sua vez, é um estímulo à produção de HIF-2 α (74). O microambiente hipóxico exacerbou o estresse oxidativo celular e, consequentemente, houve um aumento de HIF-2 α .

A variação dos níveis de mRNA e proteína VEGF e IL-6 seguiu a mesma modulação do HIF-2 α ou seja, mesmo em microambiente hipóxico que sabidamente regula positivamente essas duas moléculas, reduções significativas foram observadas. Entretanto, os resultados do VEGF não foram consistentes. Apesar da redução de mRNA e proteína observada nas células insultadas com a hipóxia, dois dos três clones nocauteados apresentaram níveis de incremento de VEGF semelhantes ao observado nas células 786-0 Mock. Não encontramos dados na literatura para que nos auxiliasse no entendimento desses resultados. Por isso, futuramente, realizaremos novos ensaios para confirmação.

Em relação à IL-6, nas células nocauteadas os níveis de redução de mRNA e da expressão proteica foram significativamente reduzidos. Além disso, houve diminuição do diferencial de expressão hipóxia/normóxia entre os grupos celulares nocauteados

e o grupo controle. Portanto, houve uma alteração na responsividade celular à hipóxia no que diz respeito à essa citocina inflamatória.

Os resultados da IL-6 são bastante promissores visto que, a IL-6 é um marcador prognóstico do CCR tanto que altos níveis plasmáticos estão correlacionados com resistência terapêutica e redução da sobrevida de pacientes (75,76). Esses dados correlacionam-se e são corroborados pelos dados anteriormente publicados por nosso grupo onde Teixeira e *cols* (2020) demonstraram que níveis reduzidos de expressão de p50 em CCRcc murino acarretaram a redução da metaloproteinase da matriz 9 (MMP9), diminuindo a capacidade migratória dessas células (36). O efeito da IL-6 na migração e invasão celular, mediados pela regulação da expressão de MMP-2 e MMP-9, também foi verificado por Wei Sun e colaboradores em carcinoma nasofaríngeo (2014) (77).

Com os dados obtidos nesse trabalho e nos citados no parágrafo anterior, nós propomos uma via de sinalização envolvida na migração celular: hipóxia – aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs)- IL-6 – MMP-9. (Figura 20).

Figura 20 – Diagrama esquemático que ilustra a via de sinalização proposto envolvendo na migração celular : EROs / NF- κ B / IL-6/MMP-9 (Arquivo pessoal).

6. CONCLUSÃO

A técnica CRISPR/Cas9 foi eficaz para obtenção de células 786-0 nocaute para NF- κ B1 (p105/p50).

Dentre os oito genes endógenos analisados, o *TRFC* foi o mais estável e, consequentemente, o mais adequado para estudos com as células 786-0 em hipóxia.

A supressão da expressão da p50 nos clones 786-0 sg1, 786-0 sg2 e 786-0 sg3 resultou na redução de VEGF e IL6 tanto em normóxia quanto em hipóxia.

A redução do diferencial hipóxia/normóxia demonstra uma alteração na responsividade celular à hipóxia no que diz respeito à IL-6.

A redução dos níveis de IL-6, pode justificar a redução da MMP-9 e migração celular observados por nosso grupo.

7. REFERÊNCIAS

1. HSIEH JJ. *et al.* Renal cell carcinoma. **Nature Reviews Primer**. 3. 17009. 2017.
2. NARDI AC. *et al.* Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **Int Braz J Urol**. 36:151-7. 2010.
3. WEIKERT S. LJUNGBERG, B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. **World J Urol**. 28:247-52. 2010.
4. CHOW WH. *et al.* Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol**. 7:245-57. 2010.
5. RINI BI. ATKINS, M.B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. **Lancet Oncol**. 10:992-1000. 2009.
6. YUEN JSP. Molecular targeted therapy in advanced renal cell carcinoma: A review of its recent past and a glimpse into the near future. **Indian J Urol**. 25(4): 427–436. 2009.
7. HARRIS AL. Hypoxia — A Key Regulatory Factor In Tumour Growth. **Nature Reviews Macmillan Magazines**. 2. 2012.
8. VORON T, MARCHETEAU E, PERNOT S *et al.* Control of the immune response by pro-angiogenic factors. **Front Oncol**. 4:70. 2014.
9. WINER AG, MOTZER RJ, HAKIMI AA. Prognostic Biomarkers for Response to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma. **Urol Clin North Am**. 43(1):95-104. 2016.
10. JACOBSEN J, RASMUSON T, GRANKVIST K *et al.* Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. **J Urol**. 163(1):343-7. 2000.
11. NEGRIER S, CHABAUD S, ESCUDIER B *et al.* Serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) as an independent prognostic factor in metastatic renal cell carcinoma (MRCC). **J Clin Oncol**. 25(18):5044. 2007.
12. WOLF J, ROSE-JOHN S, GARBERS C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. **Cytokine**. 70(1):11–20. 2014.
13. XU Q, BRIGGS J, PARK S *et al.* Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. **Oncogene** 24, 5552–5560. 2005.

14. NEGRIER S, PEROL D, MENETRIER-CAUX C *et al.* Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6. **J Clin Oncol.** 15;22(12):2371-8. 2004.
15. SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancerbinding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell.** 47.6:921-8. 1986.
16. GHOSH S *et al.* NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol.** 16:225-60. 1998.
17. GILMORE TD. Introduction to NF-kB: players, pathways, perspectives. **Oncogene.** 25:6680–6684. 2006.
18. XIAO G, JING F. NF-KB and cancer: a paradigm of Yin-Yang. **Am J Cancer Res.** (2):192-221. 2011.
19. COOKSON VJ, CHAPMAN NR. NF-kappaB function in the human myometrium during pregnancy and parturition. **Histol Histopathol.** 25(7):945-56. 2010.
20. JOHANNA N, HAO W. Molecular Basis of NF-κB Signaling. **Annu Rev Biophys.** 42:443–468. 2013.
21. PENG C, OUYANG Y, LU N, LI N. The NF-κB Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: **Recent Advances. Front Immunol.** 11:1387. 2020.
22. GORLACH A, BONELLO S. The cross-talk between NF-κB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. **Biochem. J.** 412, e17–e19. 9. 2008.
23. VOLKER HH. The VHL Tumor Suppressor: Master Regulator of HIF. **Curr Pharm Des.** 15(33):3895–3903. 2009.
24. JEONG H *et al.* Hypoxia-induced IL-6 production is associated with activation of MAP kinase, HIF-1, and NF-κB on HEI-OC1 cells. **Hearing Research.** 207. 59–67. 2005.
25. HUANG D *et al.* Interleukin-8 Mediates Resistance to Antiangiogenic Agent Sunitinib in Renal Cell Carcinoma. **Cancer Res.** 70(3):1063–1071. 2010.
26. KARIN M. NF-κB as a Critical Link between Inflammation and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 11:5. 2009.
27. OYA M. *et al.* Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. **Oncogene.** 20(29):3888-96. 2001.
28. SOURBIER C *et al.* Targeting the Nuclear Factor-kB Rescue Pathway Has Promising Future in Human Renal Cell Carcinoma Therapy. **Cancer Res.** 67:11668-11676. 2007.

29. METEOGLU I *et al.* NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. **J Exp Clin Cancer Res.** 27:53. 2008.
30. DJORDJEVI G *et al.* Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor-kappaB in renal cell tumors. **Croat Med J.** 49(5):608-17. 2008.
31. MATUSAN-ILLIJAS K *et al.* EGFR expression is linked to osteopontin and Nf-κB signaling in clear cell renal cell carcinoma. **Clin Transl Oncol.** 5(1):65-71. 2013.
32. BRAGA MS, FOGUER K, CHAVES KCB *et al.* Involvement of the NF-κB/p50/Bcl-3 complex in response to antiangiogenic therapy in a mouse model of metastatic renal cell carcinoma. **Biomed. Pharmacother.** 2014.
33. IKEGAMI A, TEIXEIRA LFS, BRAGA MS *et al.* Knockdown of NF-κB1 by shRNA inhibits the growth of renal cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Oncol Res.** 2018.
34. TEIXEIRA LFS, PERON JPS, BELLINI MH. Silencing of nuclear factor kappa b 1 gene expression inhibits colony formation, cell migration and invasion via the downregulation of interleukin 1 beta and matrix metalloproteinase 9 in renal cell carcinoma. **Mol Biol Rep.** 47(2):1143-1151. 2020.
35. RIEMANN K, BECKER L, STRUWE H, *et al.* 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 Genomics.** 16(11):783-8. 2006.
36. MORAIS C, PAT B, GOBE G, JOHNSON DW, HEALY H. Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. **Nephrol Dial Transplant.** 21(12):3377-88. 2006.
37. 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.** 25(5):1462-74. 2010.
38. MORAIS C, GOBE G, JOHNSON DW, HEALY H. 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):412-25. 2010.
39. MORAIS C, GOBE G, JOHNSON DW, HEALY H. The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. **Int J Biochem Cell Biol.** 43(11):1537-49. 2011.
40. MASUNURO, K. The Hope and Hype of CRISPR-Cas9 Genome Editing: A Review. **JAMA Cardiol.** 2(8):914-919. 2017.

41. MOJICA FJ, RODRIGUEZ-VALERA F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. **FEBS J.** 283(17):3162-9. 2016.
42. MAKAROVA KS, HAFT DH, BARRANGOU R, BROUNS SJ *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nat Rev Microbiol.** 9(6):467-77. 2011.
43. MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNBASHI OS, COSTA F *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nat Rev Microbiol.** 13(11):722-36. 2015.
44. MOJICA FJM, MONTOLIU L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. **Trends Microbiol.** 24(10):811-820. 2016.
45. SANJANA, N.E. *et al.* Improved lentiviral vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. **Nature Methods.** 2014.
46. SHALEM O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. **Science.** 343:83-87. 2014.
47. WOHLRAB C, KUIPER C, VISSERS MC *et al.* Ascorbate modulates the hypoxic pathway by increasing intracellular activity of the HIF hydroxylases in renal cell carcinoma cells. **Hypoxia (Auckl).** 15;7:17-31. 2019.
48. ANDERSEN CL, JENSEN JL, ØRNTØFT TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.** 64:5245–5250. 2004.
49. VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3:research0034.1. 2002.
50. PFAFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C, Neuvians TP *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett.** 26:509–515. 2004.
51. SILVER N, BEST S, JIANG J *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Mol Biol.** 7:33. 2006.
52. PIHUR V, DATTA S, DATTA S. RankAggreg, an R package for weighted rank aggregation. **BMC Bioinformatics.** 10:62. 2009.
53. ROYDS JA, DOWER SK, QWARNSTROM EE, LEWIS CE. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFκB. **Mol Pathol.** 51(2):55-61. 1998.

54. GAO Y, LI J, QIAO N, MENG Q, *et al.* Adrenomedullin blockade suppresses sunitinib-resistant renal cell carcinoma growth by targeting the ERK/MAPK pathway. ***Oncotarget***. 7(39):63374-63387. 2016.
55. KACHKIN DV, KHOROLSKAYA JI, IVANOVA JS, RUBEL AA. An Efficient Method for Isolation of Plasmid DNA for Transfection of Mammalian Cell Cultures. ***Methods Protoc***. 3(4):69. 2020.
56. LIU B, DIAZ ARGUELLO OA, CHEN D *et al.* CRISPR-mediated ablation of overexpressed EGFR in combination with sunitinib significantly suppresses renal cell carcinoma proliferation. ***PLoS One***. 15(5):e0232985. 2020.
57. SILVER N, BEST S, JIANG J, THEIN SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. ***BMC Mol Biol***. 7:33. 2006.
58. BRYM P, RUŚĆ A, KAMIŃSKI S. Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia-virus infected cattle. ***Vet Immunol Immunopathol***. 153(3-4):302-7. 2013.
59. DE LIMA CAD, DE LIMA SC, BARBOSA AD *et al.* Postmenopausal Osteoporosis reference genes for qPCR expression assays. ***Sci Rep***. 9(1):16533. 2019.
60. ARROWSMITH S. Identification and validation of suitable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in pregnant human myometrium. ***Mol Biol Rep***. 48(1):413-423. 2021.
61. GU YH, CUI XW, REN JY *et al.* Selection of internal references for RT-qPCR assays in Neurofibromatosis type 1 (NF1) related Schwann cell lines. ***PLoS One***. 16(2):e0241821. 2021.
62. CHE J, YAO X, WANG C *et al.* Hypoxia promoted renal cell carcinoma cell migration through regulating lncRNA-ENST00000574654.1. ***Am J Transl Res***. 12(7):3884-3894. 2020.
63. WANG Y, ZHANG Y, LIU Q *et al.* Selection and validation of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis of flowering stages and different genotypes of *Iris germanica* L. ***Sci Rep***. 11(1):9901. 2021.
64. PIHUR V, DATTA S, DATTA S. Weighted rank aggregation of cluster validation measures: a Monte Carlo cross-entropy approach. ***Bioinformatics***. 23(13):1607-15. 2007.

65. MARCIANO CMM, IBELLI AMG, PEIXOTO JO *et al.* Stable reference genes for expression studies in breast muscle of normal and white striping-affected chickens. ***Mol Biol Rep.*** 47(1):45-53. 2020.
66. MAJIDZADEH-A K, ESMAEILI R, ABDOLI N. TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. ***BMC Res Notes.*** 4:215. 2011.
67. IYER G, WANG AR, BRENNAN SR *et al.* Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research. ***Sci Rep.*** 7:43763. 2017.
68. BAKHASHAB S, LARY S, AHMED F, *et al.* Reference genes for expression studies in hypoxia and hyperglycemia models in human umbilical vein endothelial cells. ***G3 (Bethesda).*** 4(11):2159-65. 2014.
69. GLENN ST, JONES CA, LIANG P *et al.* Expression profiling of archival renal tumors by quantitative PCR to validate prognostic markers. *Biotechniques.* 43(5):639-40, 642-3, 647. 2007.
70. BAKHASHAB S, LARY S, AHMED F *et al.* Reference genes for expression studies in hypoxia and hyperglycemia models in human umbilical vein endothelial cells. ***G3 (Bethesda).*** 4(11):2159-65. 2014.
71. HANSSON J, LINDGREN D, NILSSON H *et al.* Overexpression of Functional SLC6A3 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. ***Clin Cancer Res.*** 23(8):2105-2115. 2017.
72. BEFANI C, LIAKOS P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. ***J Cell Physiol.*** 233(12):9087-9098. 2018.
73. ALBADARI N, DENG S, LI W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. ***Expert Opin Drug Discov.*** 14(7):667-682. 2019.
74. TAM AB, MERCADO EL, HOFFMANN A *et al.* ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. ***PLoS One.*** 7(10):e45078. 2012.
75. WANG Y, ZHANG Y. Prognostic role of interleukin-6 in renal cell carcinoma: a meta-analysis. ***Clin Transl Oncol.*** 22(6):835-843. 2020.
76. ISHIBASHI K, KOGUCHI T, MATSUOKA K *et al.* Interleukin-6 induces drug resistance in renal cell carcinoma. ***Fukushima J Med Sci.*** 64(3):103-110. 2018.
77. SUN W, LIU DB, LI WW *et al.* Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9. ***Int J Oncol.*** 44(5):1551-60. 2014.

78. SZKLARCZYK D, GABLE AL, NASTOU KC *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. ***Nucleic Acids Res.*** 49(D1):D605-D612. 2021.

8. ANEXOS

ANEXO I – Submissão do artigo

Molecular Biology Reports	
Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Human Renal Cell Carcinoma under Hypoxic Conditions –Manuscript Draft–	
Manuscript Number:	
Full Title:	Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Human Renal Cell Carcinoma under Hypoxic Conditions
Article Type:	Original Article
Keywords:	Renal cell carcinoma, hypoxia, endogenous genes, normalization
Corresponding Author:	MARIA Bellini IPEN: Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	IPEN: Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luiz Felipe S. Teixeira
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Luiz Felipe S. Teixeira Rodrigo Gigliotti Luana da Silva Ferreira MARIA Helena Bellini
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Background: Due to the loss of von Hippel-Lindau tumor suppressor function, clear renal cell carcinoma (ccRCC) deregulates hypoxia pathways. Quantitative PCR is a powerful tool for quantifying differential expression between normal and cancer cells. Reliable gene expression analysis requires the use of genes encoding housekeeping genes. Therefore, in this study, eight reference candidate genes were evaluated to determine their stability in 786-0 cells under normoxic and hypoxic conditions.</p> <p>Methods and Results: Four different tools were used to rank the most stable genes: GeNorm, NormFinder, BestKeeper, and Comparative Ct (ΔCt), and a general ranking was performed using the RankAggreg. According to the four algorithms, the TFRC reference gene was identified as the most stable, and therefore, no agreement was observed for the 2nd and 3rd positions. A general classification was then established using the RankAggreg tool. Finally, the three most suitable reference genes to be used in 786-0 cells under normoxic and hypoxic conditions were TFRC, RPLP0, and SDHA.</p> <p>Conclusions: To our knowledge, this is the first study to evaluate reliable genes that can be used in gene expression analysis in ccRcc under a hypoxic environment.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Ismael Silva Universidade Federal de São Paulo: Universidade Federal de Sao Paulo ismael.toco@epm.br Dr. is an expert in cancer molecular biology. In addition, he coordinates several projects in the field of human oncology.</p> <p>Maria Dagli USP: Universidade de Sao Paulo mlzdagli@usp.br Dr. Dagli is a specialist in cancer pathology. In addition, he has extensive experience in</p>

ANEXO II – Publicação do artigo

Molecular Biology Reports
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05212-9>

ORIGINAL ARTICLE

Silencing of nuclear factor kappa b 1 gene expression inhibits colony formation, cell migration and invasion via the downregulation of interleukin 1 beta and matrix metalloproteinase 9 in renal cell carcinoma

Luiz Felipe S. Teixeira¹ · Jean Pierre S. Peron² · Maria Helena Bellini¹

Received: 4 July 2019 / Accepted: 27 November 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is a highly deadly urological tumor due to its high metastatic incidence and its notorious chemoresistance. The nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) family has been associated with apoptosis resistance and cellular invasion in RCC. The purpose of this study was to evaluate the impact of NF- κ B1 gene silencing on the colony formation, cell migration and invasion abilities of the RCC cell line. Renca-mock and Renca-shRNA-NF- κ B1 cells were used in this work. NF- κ B1 downregulation was assessed by western blotting. The mRNA expression levels of interleukin-1 beta (IL-1 β) and MMP-9 were assessed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The IL-1 β levels in the culture media were determined by a commercial ELISA kit. The MMP-9 protein expression and gelatinolytic activity were evaluated by western blotting and zymography, respectively, and the migration and invasion abilities were analysed. The expression levels of p105 and p50 in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells were significantly reduced compared with those in the Renca-mock cells. The colony numbers of shRNA-NF- κ B1 cells were lower than the colony numbers of the Renca-mock cells. NF- κ B1 knockdown inhibited the cell migration and invasion of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells. These cells also exhibited reduced levels of IL-1 β . The MMP-9 expression and activity levels were significantly reduced in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells. Taken together, these results indicate that the downregulation of NF- κ B1 suppresses the tumorigenicity of RCC by reducing MMP-9 expression and activity; thus, NF- κ B1 could be a molecular target for RCC treatment.

Keywords Renal cell carcinoma · NF- κ B1 · shRNA · IL-1 β · MMP-9 · Colony formation · Migration · Invasion

Silencing of nuclear factor kappa b 1 gene expression inhibits colony formation, cell migration and invasion via the downregulation of interleukin 1 beta and matrix metalloproteinase 9 in renal cell carcinoma

Luiz Felipe S. Teixeira¹ · Jean Pierre S. Peron² · Maria Helena Bellini¹

Received: 4 July 2019 / Accepted: 27 November 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is a highly deadly urological tumor due to its high metastatic incidence and its notorious chemoresistance. The nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) family has been associated with apoptosis resistance and cellular invasion in RCC. The purpose of this study was to evaluate the impact of NF- κ B1 gene silencing on the colony formation, cell migration and invasion abilities of the RCC cell line. Renca-mock and Renca-shRNA-NF- κ B1 cells were used in this work. NF- κ B1 downregulation was assessed by western blotting. The mRNA expression levels of interleukin-1 beta (IL-1 β) and MMP-9 were assessed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The IL-1 β levels in the culture media were determined by a commercial ELISA kit. The MMP-9 protein expression and gelatinolytic activity were evaluated by western blotting and zymography, respectively, and the migration and invasion abilities were analysed. The expression levels of p105 and p50 in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells were significantly reduced compared with those in the Renca-mock cells. The colony numbers of shRNA-NF- κ B1 cells were lower than the colony numbers of the Renca-mock cells. NF- κ B1 knockdown inhibited the cell migration and invasion of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells. These cells also exhibited reduced levels of IL-1 β . The MMP-9 expression and activity levels were significantly reduced in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells. Taken together, these results indicate that the downregulation of NF- κ B1 suppresses the tumorigenicity of RCC by reducing MMP-9 expression and activity; thus, NF- κ B1 could be a molecular target for RCC treatment.

Keywords Renal cell carcinoma · NF- κ B1 · shRNA · IL-1 β · MMP-9 · Colony formation · Migration · Invasion

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 90–95% of the kidney cancer cases, and approximately 25–30% of patients with RCC develop metastasis after surgery [1, 2]. These patients have a relatively low 5-year survival rate of less than 10% [3]. The histological subcategory of RCC occurring with the highest frequency is Clear cell RCC (ccRCC) [4]. Almost 85% of sporadic ccRCC has the Von Hippel–Lindau

(VHL) tumour suppressor gene mutated, deleted or epigenetically silenced. The loss of VHL function leads to a constitutively active hypoxia-inducible factor alpha (HIF α) pathway. Additionally, the inactivation of VHL was shown to activate nuclear factor kappa B (NF- κ B), a family of transcription factors that promotes tumour growth [5, 6]. Researchers have confirmed that this transcription factor is expressed in almost all cell types and regulates many genes with roles related to pathological processes, such as inflammation, oxidative stress, apoptosis, cell survival, invasion, and migration [7].

Mammals are known to exhibit these five members of the Rel/NF- κ B family: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) and NF- κ B2 (p100/p52). NF- κ B1-p105 and NF- κ B2-p100 are precursor molecules that, when cleaved from the N-terminal region of the proteasome (26S), generate mature proteins: p50 and p52 [7]. NF- κ B-regulated

✉ Maria Helena Bellini
mhmarumo@terra.com.br

¹ Department of Biotechnology, IPEN-CNEN/SP, 2242
Av. Lineu Prestes, Cidade Universitária, Butantã,
São Paulo 05508-000, Brazil

² Immunology Department, ICB IV, University of São Paulo,
São Paulo, Brazil

products, such IL-6, TNF, IL-1, and chemokines are major mediators of inflammation [8]. In the tumour milieu, IL-1 induces the expression of various metastatic mediators, such as matrix metalloproteinases (MMP), VEGF, IL-8, IL-6, TNF- α , and TGF β [9].

The involvement of p50 in carcinogenesis has been demonstrated in vitro [10] and in clinical studies [11]. There is a positive correlation between the histological grade, invasion, and metastasis with NF- κ B1 activation in RCC [12, 13]. In addition, it has been reported that p50 promoter polymorphisms (−94 ins/del ATTG, rs28362491) are associated with an increased risk of RCC [14].

Metastasis is a multi-step process involving the proteolytic degradation of the basement membrane, cellular migration, and invasion through the barrier into secondary sites [15]. The degradation of the matrix in the basement membrane is largely controlled by extracellular proteinases, such as the matrix metalloproteinases (MMPs) [16]. MMPs are overexpressed in almost all cancers, including RCC [17]. Among them, the increased expression of MMP-9, which is transcriptionally regulated by NF- κ B, has been correlated with a poor prognosis for RCC [18]. Thus, the aim of this study was to evaluate the impact of the downregulation of the NF- κ B1 gene on the colony formation, cellular migration and invasion abilities of the murine renal cell adenocarcinoma cell line.

Materials and methods

Cell lines

The RCC cell line used (Renca) was obtained from American Type Culture Collection (catalogue no: CRL-2947TM, Manassas, VA, USA). Renca–mock and Renca-shRNA-NF- κ B1 cells were both obtained by our laboratory. In brief, Short hairpin ribonucleic acid (ShRNA) targeting NF- κ B1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and the empty vector were packet into HEK 293T cells. The concentrate lentivirus supernatant of these cells was then used to transduce Renca cells. After that, puromycin was added to the culture media to select resistant clones [19].

All cell lines were cultured in RPMI-1640 (Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA) medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco®, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA) in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. [19].

RNA extraction and RT-qPCR

Total cellular RNA was extracted with TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Next, the cDNA was

synthesized with the 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, Carlsbad, CA, USA) 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. The target gene expression levels were normalized to the GAPDH mRNA levels. The primers used were as follows: MMP-9, forward: 5'-CAAGTGGGACCATCATAACATCA-3' and reverse: 5'-CTCGCGGCAAGTCTTCAGA-3'; IL-1 β , forward: 5'-AGTTGACGGACCCCAAAAGAT-3' and reverse: 5'-GGACAGCCCAGGTCAAAGG-3'; GAPDH, forward: 5'-GCCTTCCGTGTTCTTACCC-3' and reverse: 5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'. The relative quantification of gene expression was performed with the 2^{− $\Delta\Delta$ CT} method [13]. PCR was carried out using the ABI-Prism 7000 quantitative PCR instrument (Applied Biosystems Company, Foster City, CA, USA).

Protein extraction and western blotting analysis

The protein contents were extracted from the cells and were prepared with the CellLyticTM M reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After centrifugation, the supernatant was collected and added to Protease Inhibitor Cocktail powder (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The protein concentration was detected by the bicinchoninic acid assay (BCA) method and was stored at −80 °C until required for use. The protein was loaded at a concentration of 50 μ g per lane, separated by 12% SDS-PAGE and transferred onto GE Hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, which were then blocked in 5% skim milk in Tris-buffered saline at room temperature for 1 h. The membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: anti-NF- κ B1 p105/p50 (rabbit monoclonal anti-mouse; Abcam, Cambridge, UK), anti-MMP-9 goat polyclonal (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), Anti-IL-1 β goat polyclonal (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and anti-GAPDH (MAB374 mouse monoclonal; Millipore, Massachusetts, USA), all diluted 1:500; then the membranes were incubated with the following HRP-conjugated secondary antibodies: goat anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA), donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) and goat anti-mouse (Invitrogen, CA, USA), all diluted 1:1000, for 2 h at room temperature. The anti-GAPDH antibody was used as a loading control. To detect the Western blot signals, the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) was used. Photos were taken using the

Uvitec Cambridge Alliance 4.7 equipment. The results were quantified using ImageJ software.

Colony formation assay

Renca cells were seeded (1×10^2 cells) onto 60 mm plates containing RPMI medium with 10% FBS and were maintained in growth conditions for 10 days. Then, the plates were washed twice with PBS, fixed and stained with 3 ml of 2% formaldehyde/4% rhodamine B (Synth, SP, Brazil) for 20 min. After this, the plates were washed with distilled water, and the colonies were manually counted.

Wound healing assay

Renca cells were seeded into six-well plates (4×10^5 cells/well). Once the cells reached 90% confluence, a wound area was carefully created by scraping the cell monolayer with a sterile 1000 μ l pipette tip. The cells were then washed once with PBS to remove the detached cells. Subsequently, the cells were incubated at 37 °C in 5% carbon dioxide. The width of the wound area was monitored with an inverted microscope at various time points. The cells that migrated to the lower compartment of the membrane were photographed on the inverted Nikon Eclipse 100 microscope for cell quantification using ImageJ software; then, the following formula was used to calculate the percentage of migrated area: $\% = (\text{Area } 0 \text{ h} - \text{Area } 48 \text{ h}) / (\text{Area } 0 \text{ h}) \times (100)$.

Transwell migration assay

Transwell chambers (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) with 2 mm diameter polycarbonate filters and 8 μ m pores were used. Renca cells (2×10^5 cells/chamber) were resuspended in 100 μ L of RPMI medium without FBS and were transferred to the Transwell chambers that were placed in 24-well plates containing RPMI medium with FBS, which functioned as a chemotactic solution. After incubation for 48 h, the chambers were washed with PBS, fixed with 3.7% formaldehyde for 2 min, washed with PBS, and permeabilized with 100% methanol for 20 min. The methanol was removed by washing with PBS, and the cells were stained with 1% Giemsa stain (Synth, SP, BRA) for 15 min. The cells retained in the upper membrane compartment were removed with a cotton swab. The cells that migrated to the lower compartment of the membrane were photographed on an inverted Nikon Eclipse E100 microscope for cell quantification using ImageJ software.

Transwell invasion assay

Transwell chambers (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) with 2 mm diameter polycarbonate filters and 8 μ m pores

were used. Matrigel (Corning, Bedford, MA, USA) was diluted in RPMI free of fetal bovine serum (FBS) in a 1:10 proportion (32 μ g/ml) and was then incubated for 1 h for gel polymerization. Renca cells (2×10^5 cells/chamber) were resuspended in 100 μ L of RPMI medium without FBS and were transferred to the Transwell chambers that were placed in 24-well plates containing RPMI medium with FBS, which functioned as a chemotactic solution. After incubation for 48 h, the chambers were washed with PBS, fixed with 3.7% formaldehyde for 2 min, washed with PBS, and permeabilized with 100% methanol for 20 min. The methanol was removed by washing with PBS, and the cells were stained with 1% Giemsa stain (Synth, SP, BRA) for 15 min. The cells retained in the upper membrane compartment were removed with a cotton swab. The cells that migrated to the lower compartment of the membrane were photographed on an inverted Nikon Eclipse 100 microscope for cell quantification using ImageJ software.

Zymography

Gelatine zymography was performed as follows: polyacrylamide gels (SDS-PAGE, 10%) were copolymerized with gelatine (0.1%) (Sigma-Aldrich). For each sample, 25 μ l of serum-free conditioned media and sample buffer (without β -mercaptoethanol) were loaded into the gel well. Electrophoresis was performed in the presence of SDS at a constant voltage of 100 V. Following electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 for 15 min in an orbital shaker. After that, the zymograms were incubated for 18 h at 37 °C in the incubation buffer (5 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM ZnCl_2). After incubation, the gels were fixed with methanol:acetic acid:water (4.5:1:4.5, v/v) for 15 min at room temperature with moderate agitation. The gels were then stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250 and were destained with methanol:acetic acid:water (4.5:1:4.5, v/v). The areas of enzymatic activity appeared as clear bands over the dark background.

Measurement of IL-1 β production

Renca cells were trypsinized, counted, and 1×10^6 cells were transferred into 6-well flasks with 4 mL of RPMI without serum. After 24 h, the conditioned media was transferred into 1.5-mL tubes, centrifuged (300 $\times$ g) to remove cellular debris, and the resulting supernatants were filtered using 0.22 μ m disposable TPP syringe filters (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) and were stored at -20 °C until they were assayed for IL-1 β .

The concentrations of IL-1 β in the supernatants of the Renca cell cultures were determined using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Statistical analysis and protein–protein interaction map

Simple comparisons of the means were performed by Student's *t* test. The results of the present study are presented as the mean $\pm$ SDs. Multiple mean comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). $P < 0.05$ indicated a statistically significant difference. All experiments were performed in triplicates. A protein–protein interaction map was generated using the STRING v11.0 website by inputting the following proteins: NF- κ B1, MMP-9 and IL-1. The results were set to display up to ten interactions [20].

Results

Expression of p105 and p50 proteins decreased significantly in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells

First, the NF- κ B1 gene knockdown effect on the protein level was evaluated by western blotting. The results revealed that the expression of p105 and p50 in Renca-shRNA-NF- κ B1 cells was reduced by $84 \pm 0.01\%$ ($P < 0.01$) and $77 \pm 0.08\%$ ($P < 0.001$), respectively (Fig. 1a, b). In all experiments, Renca non-target shRNA transduced cells (Renca-mock) were used as controls.

Silencing of NF- κ B1 inhibited the clonogenic capacity of RCC cells

To determine whether NF- κ B1 is required for the clonogenic growth of Renca cell lines, the cells were plated and maintained in culture for 10 days with or without knock-down. NF- κ B1 knockdown led to the inhibition of colony formation. The colony numbers of shRNA-NF- κ B1 cells ($49.0 \pm 1.0/\text{plate}$) were significantly lower than those of the Renca-mock control group ($69.33 \pm 4.0/\text{plate}$) ($P < 0.01$ vs Renca-mock) (Fig. 2a and b).

Silencing of NF- κ B1 inhibits the migration and invasion of Renca cells

To establish whether the decreased NF- κ B1 levels would impact the migration of Renca cells, a wound healing assay and a transwell migration assay were performed. Wound healing assay results (Fig. 3a) demonstrated that NF- κ B1 knockdown produced a 10% inhibition of Renca-shRNA-NF- κ B1 cell migration ($P < 0.01$ vs. Renca mock). (Figure 3a1). This finding was Corroborated by those obtained by transwell migration assay where the number of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells that had migrated decreased by 0.5-fold compared with the number of Renca-mock cells ($P < 0.001$ vs. Renca mock) (Fig. 3b, b1). The invasion ability was assessed using a transwell assay (Fig. 3c). The number of Renca-shRNA-NF- κ B1 cells penetrating the membrane decreased by 0.6-fold compared with the number of Renca-mock cells ($P < 0.001$ vs. Renca mock) (Fig. 3c1).

Fig. 1 Stable knockdown of NF- κ B1 in Renca cells. **a** Western blotting analysis. The optical density values of the corresponding bands were quantified by ImageJ software, and GAPDH was used as an

internal control. **b** The results show a reduction of p105 protein (** $P < 0.01$ vs Renca-mock) and p50 (***) ($P < 0.001$ vs Renca-mock)

Fig. 2 shRNA-mediated knockdown of NF-κB1 inhibited the clonogenic capacity of Renca cells. **a** Representative images of stained colonies. **b** Quantitative analysis revealed a significant difference

between Renca-mock and the Renca-shRNA-NF-κB1 ($P < 0.05$). (** $P < 0.01$ vs Renca-mock) Values are the mean $\pm$ SD; $n = 3$

Knockdown of NF-κB1 inhibited IL-1β mRNA expression and protein production by Renca cells

The effect on the production of *IL-1β*, a known target gene of *NF-κB*, by Renca-shRNA-NF-κB1 cells was evaluated. The *IL-1b* mRNA production was assessed by RT-qPCR, demonstrating lower expression levels in the Renca-shRNA-NF-κB1 cells, with an mRNA-level reduction of $98.3 \pm 0.11\%$ ($P < 0.001$) compared to that of the Renca-mock cells (Fig. 4a). Protein expression was verified by ELISA assays using culture media and western blotting of cell protein extracts. Corroborating the RT-qPCR data, the *IL-1β* expression in the Renca-shRNA-NF-κB1 culture media was 0.39 ± 0.01 pg/mL whereas mock cells showed 9.58 ± 0.27 pg/mL ($P < 0.001$) (Fig. 4b). As expected, the western blotting analysis revealed a reduction of *IL-1β* by $92.13 \pm 0.55\%$ compared to that in the Renca-mock cells ($P < 0.001$) (Figs. 4c, d).

Knockdown of NF-κB1 downregulated MMP-9 expression and activity by Renca cells

MMP-9 expression was assessed by RT-qPCR and western blotting analyses. NF-κB1 mRNA expression decreased by $89.00 \pm 0.05\%$ compared to that in the Renca-mock cells ($P < 0.001$) (Fig. 5a). This was further corroborated by western blotting, revealing a decrease in active MMP-9 (86 kDa) by approximately $49.4 \pm 0.57\%$ ($P < 0.01$) (Fig. 5b, c). Furthermore, the gelatinolytic activity of MMP-9 was also significantly decreased in the Renca-shRNA-NF-κB1 cells (Fig. 5d). Corroborating all these findings, a protein interaction map was generated using the STRING website and provided evidence of the interaction between NF-κB1, MMP-9 and IL-1.

Discussion

NF-κB is a very important transcription factor, is ubiquitously expressed in many different cell types, and orchestrates several cellular and molecular mechanisms, mainly those involved in the immune response because most toll-like receptors and several cytokines signalling pathways converge for NF-κB translocation into the nucleus [8]. Of further interest, clinical evidence has suggested that nuclear NF-κB also plays a crucial role in tumour cell functions, such as proliferation, migration, and apoptosis [21]. An altered expression of NF-κB in solid tumours has been correlated with poor prognosis and resistance to antineoplastic treatments [11, 22].

In this report, we demonstrate that the colony formation ability, as well as the migration and invasion capacity of Renca-shRNA-NF-κB1 cells, were significantly impaired; this was likely due to a reduction in MMP-9 activity as well as other NF-κB target genes. The results from the western blots revealed that p105/p50 protein expression was efficiently downregulated in these cells. The strategy of using an shRNA to successfully reduce the expression of a target gene has been widely used [23, 24].

Renca-shRNA-NF-κB1 cells presented with decreased colony formation, indicating that NF-κB1 mediates the proliferative potential of Renca colony-forming cells. However, whether this is a direct effect of NF-κB inhibition on cell cycle-related genes has not been addressed. In fact, NF-κB1 may directly target several genes that modulate cell survival and proliferation, such as Cyclins and MAP kinases (Fig. 5e). Thus, it is possible that NF-κB1 inhibition in Renca-shRNA-NF-κB1 cells could lead to the reduced expression of such genes, impairing cell viability and expansion.

Fig. 3 NF-κB1-knockdown inhibits Renca cell migration and invasion. **a** The migration of Renca cells was assessed by a wound-healing assay. Representative images of wound closure were taken at 0 h and 48 h after wounding under $\times 100$ magnification. **a1** Cell migration was quantified and represented in a Bar graph (* $P < 0.05$ vs Renca-mock). **b** Assessment of cell migration by transwell assay.

Representative image of migration by transwell assay. **B1** migration was quantified and represented in a Bar graph ($P < 0.001$ vs. Renca-mock) (**b1**). **c** Representative images of the invasion assay, **c1** Cell invasion was quantified and represented in a Bar graph (** $P < 0.001$ vs Renca-mock). Values are the mean $\pm$ SD; $n = 3$

On the other hand, NF-κB may also have an indirect impact on the aforementioned phenomenon. It has been shown that during cancer, several tumoural growth factors are secreted, either by the tumour cells themselves or by nearby host cells [25, 26]. Here, we show that Renca-shRNA-NF-κB1 cells exhibited a decreased IL-1 response compared to that of Renca-shRNA-cells. IL-1 is a very important cytokine for the innate immune response, not

only against pathogens but also against tumour cells. IL-1 secretion follows a complex and orchestrated molecular mechanism called pyroptosis, which is dependent on inflammasome assembly and the cleavage of pro-IL-1β in the cytoplasm [26, 27]. Interestingly, it has been shown that IL-1 may also act as a tumour growth factor, boosting tumour cell growth and survival [10]. Thus, it is plausible that Renca-shRNA-NF-κB1 cells have not only a reduced IL-1

Fig. 4 NF- κ B1-knockdown inhibited IL-1 β expression. **a** RT-PCR analysis. **b** Determination of IL-1 β concentration in the supernatants of Renca cell culture. (***) $P < 0.001$ vs Renca-Mock). **c** Western blotting analysis. The optical density values of the corresponding

bands were quantified by ImageJ software, and GAPDH was used as an internal control. **d** The results show a reduction of IL-1 β protein (***) $P < 0.001$ vs Renca-mock). Values are the means $\pm$ SD; $n = 3$

secretion level, but also an impaired signalling pathway, as IL-1 activates the IL-1R signalling pathway that also results in NF- κ B1 translocation. However, these implications must be addressed in vivo because, as already mentioned, IL-1 has an important anti-tumoural function, mainly by recruiting inflammatory cells.

In addition, our data show that the low levels of NF- κ B p50 caused a significant decrease in the cell migration and invasion of Renca cells. This is due to a decrease in the expression of MMP-9, an important metastasis promoting factor. The promoter of MMP-9 has responsive elements for several different transcriptional factors, including AP-1, SP-1, Ets and NF- κ B [28]; this is evidence for a direct correlation between them. Accumulated data have correlated the enhanced expression of MMP-9 with the activation of NF- κ B and metastasis [18, 29]. MMP-9 is an endopeptidase with three fibronectin Type II domains that confer higher affinity for its collagen substrate [30]. This activity helps degrade the extracellular matrix, allowing metastatic cells to detach from the primary tumour and to gain access to the circulation, leading to metastasis. Moreover, MMP-9 may also act on endothelial cells, facilitating the carcinogenesis

of skin cells and the spread throughout the body [31]. Thus, consistent with these findings, we have shown that NF- κ B1 abrogation led to reduced MMP-9 secretion, impairing Renca cells to migrate in Transwell assays. Although it has already been shown in the literature that NF- κ B acts on MMP-9 transcription, it is worth mentioning that we also observed a significant reduction of MMP-9 activity after NF- κ B1 knockdown, probably due to the reduced level of this molecule in the supernatant.

As mentioned, IL-1 also signals through NF- κ B1. Thus, IL-1 signalling pathway impairment by shRNA-NF- κ B1 in Renca cells may also account for the overall suppression of MMP-9 secretion. In addition, a published meta-analysis on ccRCC gene expression was performed by Suraj Peri and collaborators and identified that the elevated expression of MMP-9 was significantly associated with a higher relative risk, poorer prognosis, and reduced survival for RCC patients [32].

In summary, our data, presented here, show the role of NF- κ B1 in orchestrating the proliferation and metastatic potential of RCC cells in vitro. As mentioned, RCC accounts for 90–95% of kidney cancer cases, of which, 25–30% of

Fig. 5 NF-κB1-knockdown downregulated MMP-9 expression and activity. **a** RT-PCR analysis. **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 MMP-9 at the protein level (* $P < 0.01$

vs Renca-mock). **d** MMP-9 Gelatinase activity in 48 h conditioned medium from Renca-mock and Renca-shRNA-NF-κB1 cells. **e** Protein Interaction Maps elaborated using STRING website shows direct interaction between NFκ-B1, MMP-9 and IL-1

patients develop metastasis after surgery. This evidence supports the clinical importance of RCC as well as the importance of understanding its biology. The relevance of our findings in vivo was not addressed, but it is one of our further goals. Both IL-1 and MMP-9 seem to have a dual role in vivo, as both may boost the immune response [26], facilitating the recruitment of inflammatory cells and promoting tumoural growth and metastasis. This is clinically corroborated, as bladder tumours may be treated by the intravesical inoculation of BCG (Bacille Calmette-Guérin), a robust immune stimulus of pro-inflammatory cytokines, including IL-1.

Conclusion

The knockdown of NF-κB1 renal tumour cells significantly reduced the potential for colony formation, expansion and cellular migration in vitro. These findings correlate with the

downregulation of IL-1 and MMP-9 secretion, as well as with MMP-9 activity, indicating a possible molecular mechanism for NF-κB1 in the development and progression of RCC. Finally, this study suggests that NF-κB1 could be a molecular target for RCC therapy.

Acknowledgements We would like to thank Ms. Amanda Ikegami for her valuable technical support on this project. This study was supported by FAPESP (Process number 2014/19265-7), CNPQ and CNEN.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- Gao Y, Li H, Ma X, Fan Y, Ni D, Zhang Y, Huang Q, Liu K, Li X, Wang L, Gu L, Yao Y, Ai Q, Du Q, Song E, Zhang X (2017)

- KLF6 Suppresses metastasis of clear cell renal cell carcinoma via transcriptional repression of E2F1. *Cancer Res* 77:330–342
2. Foguer K, Braga MS, Peron JPS, Bortoluci KR, Bellini MH (2016) Endostatin gene therapy inhibits intratumoral macrophage M2 polarization. *Biomed Pharmacother* 79:102–111
3. Kim W, Zachary G, Daaka Y (2012) Rap1GAP regulates renal cell carcinoma invasion. *Cancer Lett* 320(1):65–71
4. Zarrabi K, Fang C, Wu S (2017) New treatment options for metastatic renal cell carcinoma with prior anti-angiogenesis therapy. *J Hematol Oncol* 10(1):38
5. Shenoy N, Pagliaro L (2016) Sequential pathogenesis of metastatic VHL mutant clear cell renal cell carcinoma: putting it together with a translational perspective. *Ann Oncol* 27:1685–1695
6. An J, Rettig MB (2005) Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 25(17):7546–7556
7. Karin M (2009) NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(5):a000141
8. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D (2017) 30 Years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell* 168(1–2):37–57
9. Voronov E, Carmi Y, Apte RN (2014) The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol* 5:114
10. Braga MS, Foguer K, Chaves KCB, Lima LS, Scavone C, Bellini MH (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. *Biomed Pharmacother* 68:873–879
11. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR (2006) Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* 4:48
12. Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N, Murai M (2003) Increased nuclear factor- κ B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 24:377–384
13. Meteoglu I, Erdogan IH, Meydan N, Erkus M, Barutca S (2008) NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 27:53
14. Cai H, Sun L, Cui L, Cao Q, Qin C, Zhang G, Mao X, Wang M, Zhang Z, Shao P, Yin C (2013) A functional insertion/deletion polymorphism (-94 ins/del ATTG) in the promoter region of the NFKB1 gene is related to the risk of renal cell carcinoma. *Urol Int* 91(2):206–212
15. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB (2010) Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev* 29(3):405–434
16. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141(1):52–67
17. Roomi MV, Ivanov V, Kalinovskiy T, Niedzwiecki A, Rath M (2006) Modulation of human renal cell carcinoma 786-0 MMP-2 and MMP-9 activity by inhibitors and inducers in vitro. *Med Oncol* 23(2):245–250
18. Lin YW, Lee LM, Lee WJ, Chu CY, Tan P, Yang YC, Chen WY, Yang SF, Hsiao M, Chien MH (2016) Melatonin inhibits MMP-9 transactivation and renal cell carcinoma metastasis by suppressing Akt-MAPKs pathway and NF- κ B DNA-binding activity. *J Pineal Res* 60(3):277–290
19. Ikegami A, Teixeira LFS, Braga MS, Dias MHS, Lopes EC, Bellini MH (2018) Knockdown of NF- κ B1 by shRNA inhibits the growth of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncol Res* 26(5):743–751
20. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P et al (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45(D1):D362–D368
21. Bosman MC, Schuringa JJ, Vellenga E (2016) Constitutive NF- κ B activation in AML : causes and treatment strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 98:35–44
22. Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, Mandolesi A, Loupakis F, Zaniboni A, Catalano V, Quadri A, Zorzi F, Berardi R, Biscotti T, Labianca R, Falcone A, Cascinu S (2007) Nuclear factor- κ B tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 25(25):3930–3935
23. 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. *Oncol Rep* 34(2):859–867
24. Zhong MA, Zhang H, Qi XY, Lu AG, You TG, Gao W, Guo XL, Zhou ZQ, Yang Y, Wang CJ (2011) ShRNA-mediated gene silencing of heat shock protein 70 inhibits human colon cancer growth. *Mol Med Rep* 4(5):805–810
25. Qian BZ, Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39–51
26. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10(9):942–949
27. Latz E (2010) The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 22:28–33
28. Chen CY, Hsiao HL, Yang CM (2012) PI3-K/Akt/JNK/NF- κ B is essential for MMP-9 expression and outgrowth in human limbal epithelial cells on intact amniotic membrane. *Stem Cell Res* 9(1):9–23
29. Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J (2017) TNF- α promotes invasion and metastasis via NF-Kappa B pathway in oral squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res* 23:141–149
30. Kridel SJ, Chen E, Kotra LP, Howard EW, Mobashery S, Smith JW (2001) Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 276(23):20572–20578
31. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103(3):481–490
32. Peri S, Devarajan K, Yang DH, Knudson AG, Balachandran S (2013) Meta-analysis identifies NF- κ B as a therapeutic target in renal cancer. *PLoS ONE* 8(10):e76746

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

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.**