

# A FUNÇÃO DE NF-kappaB E TWIST1 NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NO CÂNCER DE MAMA

Bruno R. B. Pires<sup>1</sup> (DO); Gerson M. Ferreira<sup>1</sup>; Renata Binato<sup>1</sup>; Eliana Abdelhay<sup>1</sup>

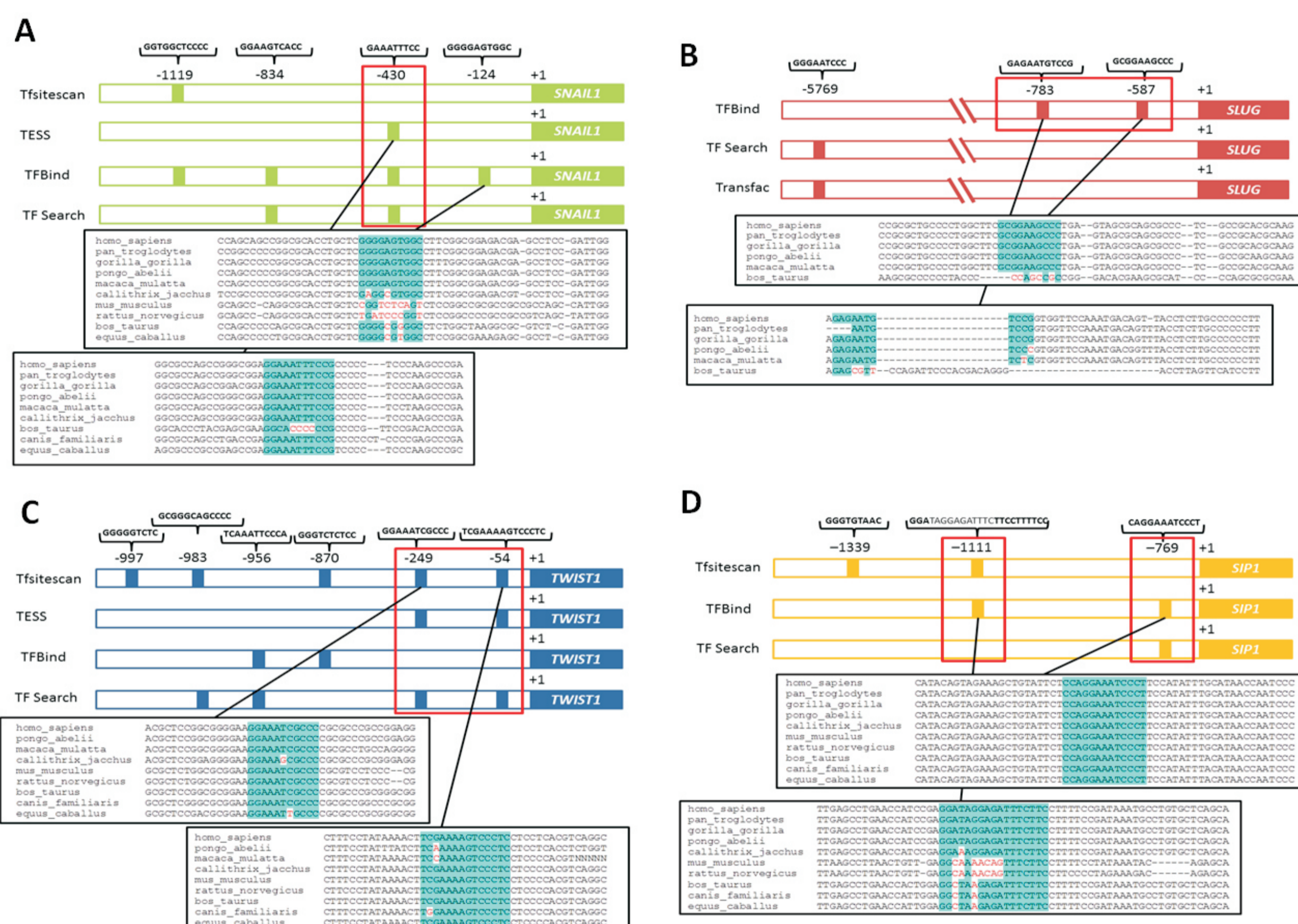
<sup>1</sup>Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Laboratório de Célula-Tronco, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

\* Autor para correspondência: brunoricardopires@gmail.com

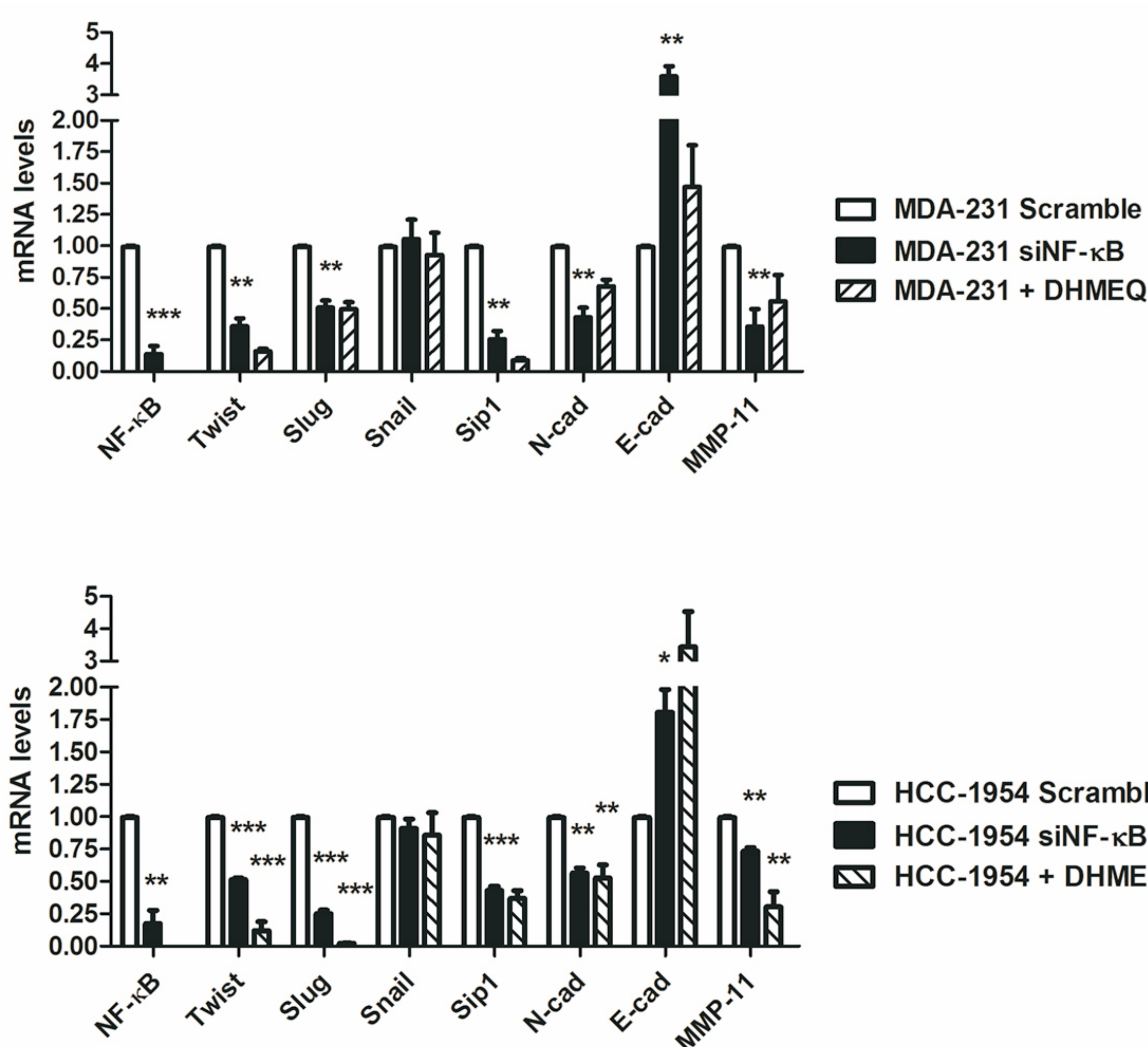
## RESUMO

O câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea composta por múltiplos subtipos com características moleculares e comportamentos distintos. No Brasil, esta neoplasia é a primeira causa de morte por câncer em mulheres, principalmente devido ao diagnóstico em estágios avançados, quando a possibilidade do desenvolvimento de metástases é maior. O processo metastático está relacionado com a expressão de fatores de transcrição (TFs) como Twist1, Snail, Slug e Sip1, envolvidos com a transição epitélio-mesenquimal (EMT). Recentemente, descrevemos o papel de NF-κB como regulador da expressão gênica dos fatores TWIST1, SLUG e SIP1 nas células agressivas de CM HCC-1954 (fenótipo Her2/neu positivo) e MDA-MB-231 (Triplo-negativo, TN). Por meio de ferramentas de bioinformática, identificamos sítios consenso de ligação para NF-κB na região promotora destes genes que foram confirmados in vitro por imunoprecipitação de cromatina seguida por qPCR. Posteriormente, validamos a atividade da região promotora descrita através de fusões da região de ligação para NF-κB ao gene repórter da Luciferase. Foi avaliada também a expressão de NF-κB, Twist, Slug, e Sip1 em 11 amostras de pacientes com câncer de mama por RT-qPCR. O grupo TN expressou os maiores níveis de NF-κB, Slug e Sip1, em relação aos subtipos Luminal e HER2. Porém, os subtipos HER2 e TN expressaram altos níveis de Twist1. Em seguida, avaliamos a correlação entre os níveis de NF-κB, Twist, Slug e Sip1 pelo método de Pearson. Os resultados mostraram uma clara correlação positiva entre a expressão de NF-κB com a expressão de Twist1 ( $r=0.923$ ;  $P<0.0001$ ), Slug ( $r=0.786$ ;  $P=0.007$ ) e Sip1 ( $r=0.823$ ;  $P<0.0001$ ). Diante disso, os resultados confirmaram a correlação positiva entre os níveis de NF-κB e de seus alvos de regulação descritos neste trabalho. Entre os TFs envolvidos na EMT, Twist1 é descrito como o principal regulador deste fenômeno no CM, porém, seu papel durante a evolução dos diferentes subtipos de CM ainda não está claro. Por isso, foi realizado o silenciamento do gene Twist1 na linhagem celular HCC-1954 através do RNA de interferência específico (shTwist) e concomitantemente, utilizamos o controle negativo de silenciamento (Scramble). O silenciamento de Twist1 medido por RT-qPCR resultou em uma redução de 95% da expressão relativa de Twist1 após 48h de transfecção. Para uma análise global do efeito do silenciamento, amostras de mRNA foram submetidas a análise em larga escala por microarranjo através do GeneChip human exon array. Foram considerados apenas os genes diferencialmente expressos, cujos níveis foram 2 vezes maior ou menor em relação ao Scramble. Esses resultados mostraram profundas alterações moleculares provocadas pela diminuição da expressão de Twist1, pois 141 genes apresentaram a expressão aumentada e 190 diminuída. Uma análise por meio do software Metacore, agrupou esses genes de acordo com a função molecular, revelando inúmeras correlações entre Twist1 com importantes processos biológicos e vias de sinalização como: Coagulação Sanguínea, sinalização de TGF-β/SMADs, Interleucina-17, entre outros. Posteriormente, os genes diferencialmente expressos serão confirmados por RT-qPCR em amostras de pacientes com CM e o estudo da função de Twist1 nas vias de sinalização mencionadas será o objeto de futuras investigações.

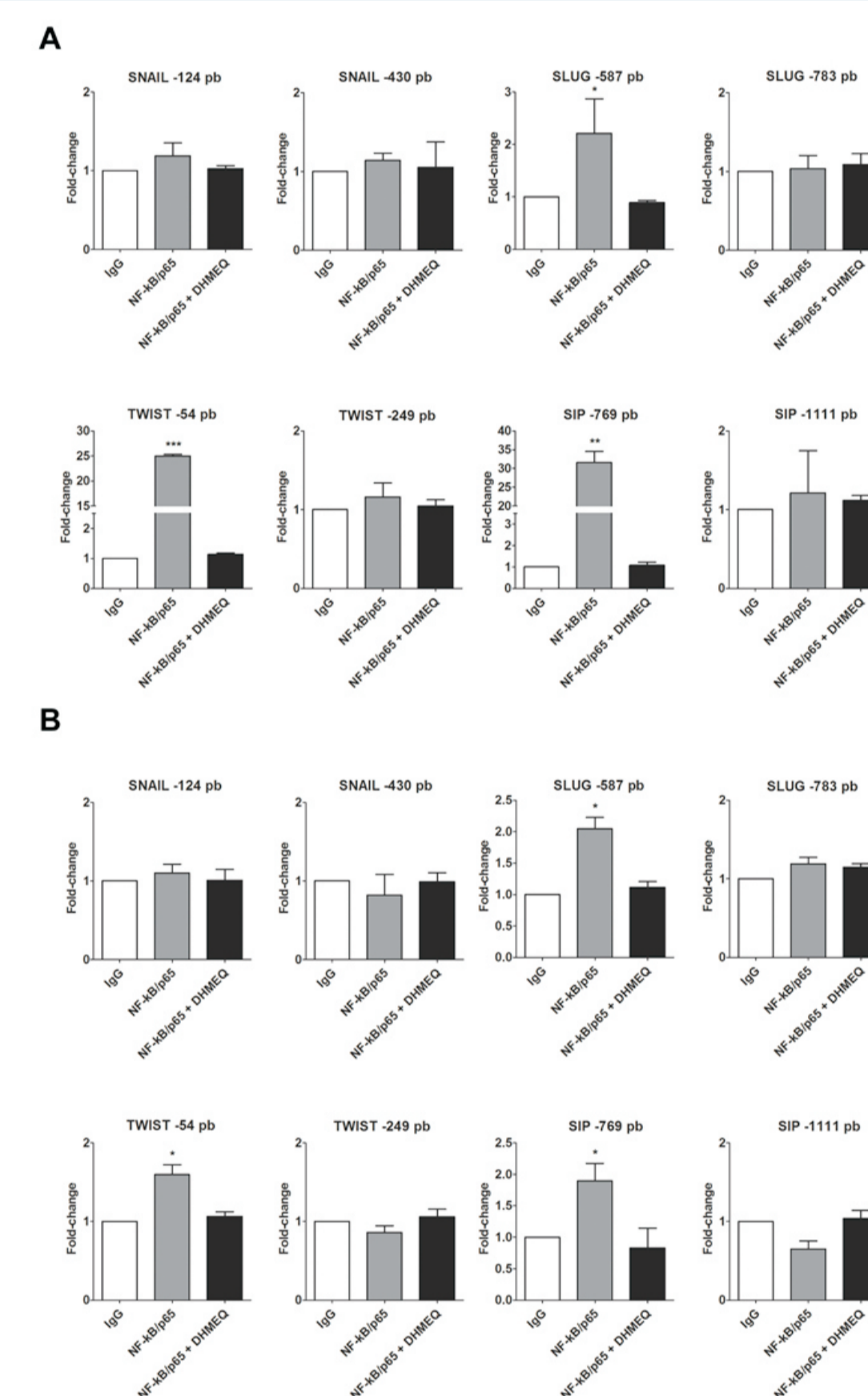
## RESULTADOS



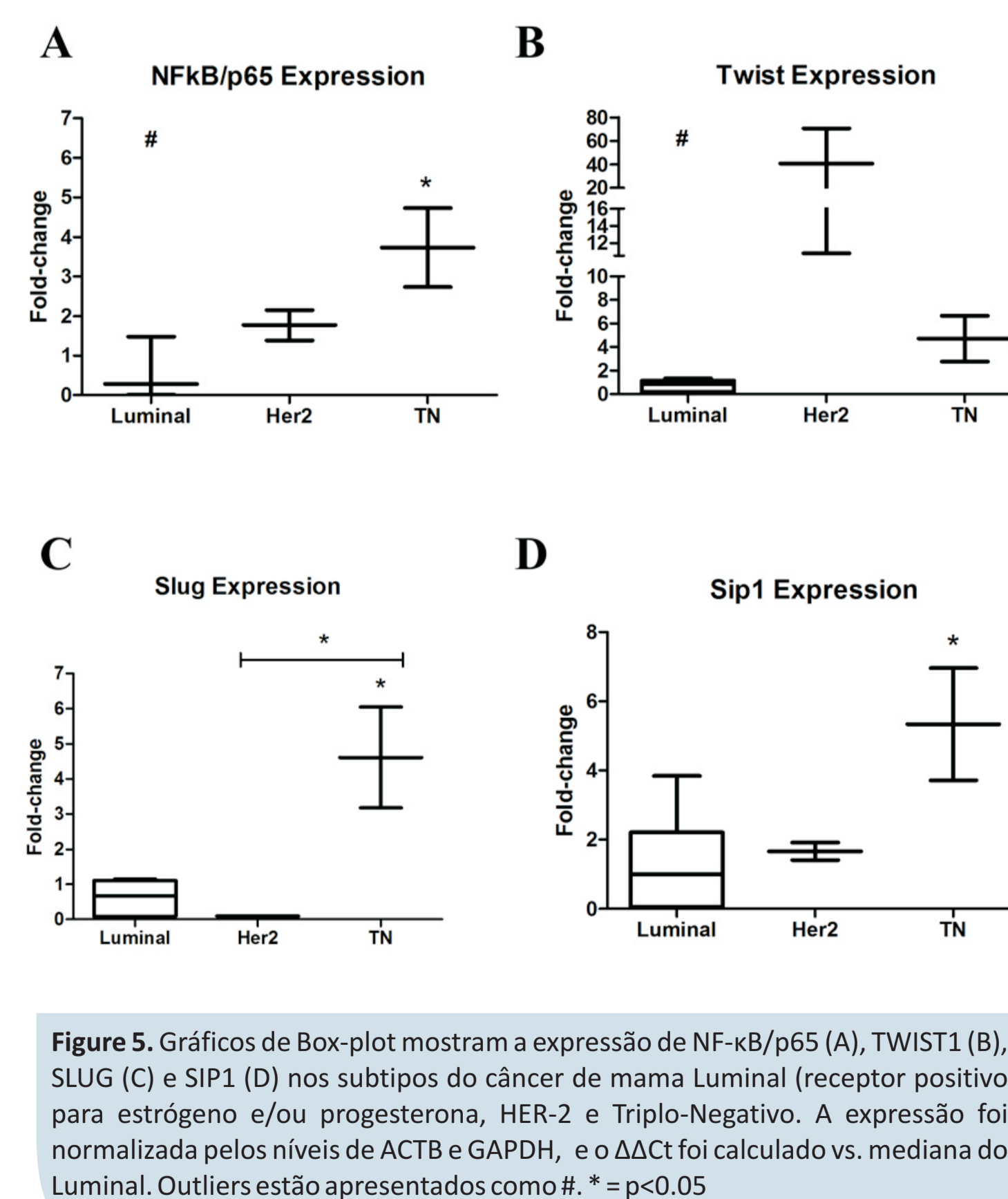
**Figura 1.** Esquema representativo da predição de sítios de ligação de NF-κB na região promotora dos genes SNAIL1 (A), SLUG (B), TWIST1 (C) e SIP1 (D) utilizando as ferramentas de bioinformática Tfsitescan, TESS, TFBind, TFSearch e Transfac. Os alinhamentos mostram quais regiões são conservadas entre várias espécies de metazóitos e em vermelho destacam-se as regiões que foram investigadas. +1: início da transcrição



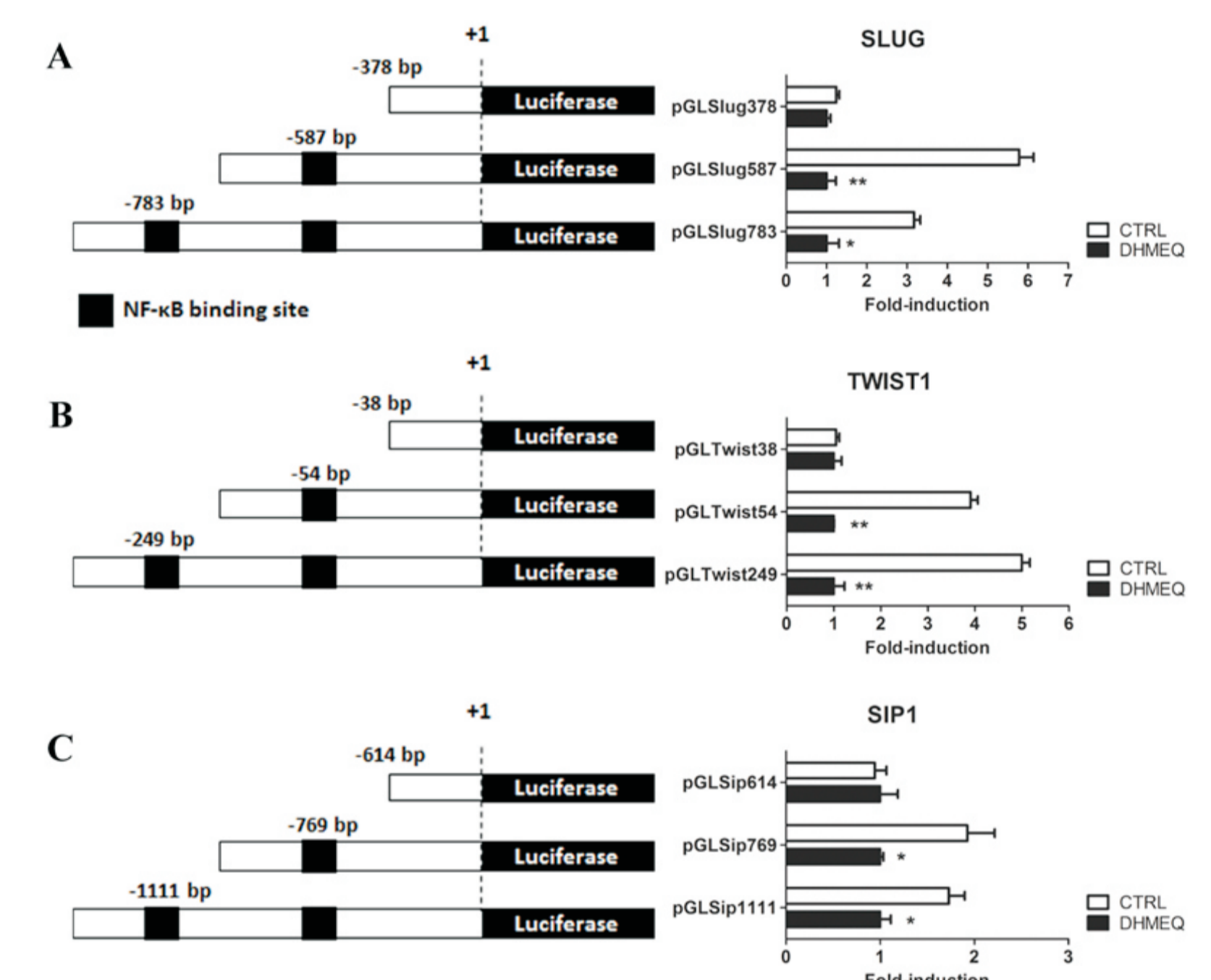
**Figure 4.** Níveis relativos de expressão de mRNA dos fatores indutores da EMT (Snail1, Slug, Twist1 e Sip1) e de seus alvos de regulação (E-caderina (E-CAD), N-caderina (N-CAD) e Metaloproteínase 11 (MMP11)) comparadas ao RNA Scramble, em resposta ao silenciamento de NF-κB ou da inibição farmacológica por DHMEQ nas células MDA-MB-231 (A) e HCC-1954 (B). As expressões foram normalizadas pelos genes constitutivos ACTB e GAPDH. As barras representam as médias (± DP). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



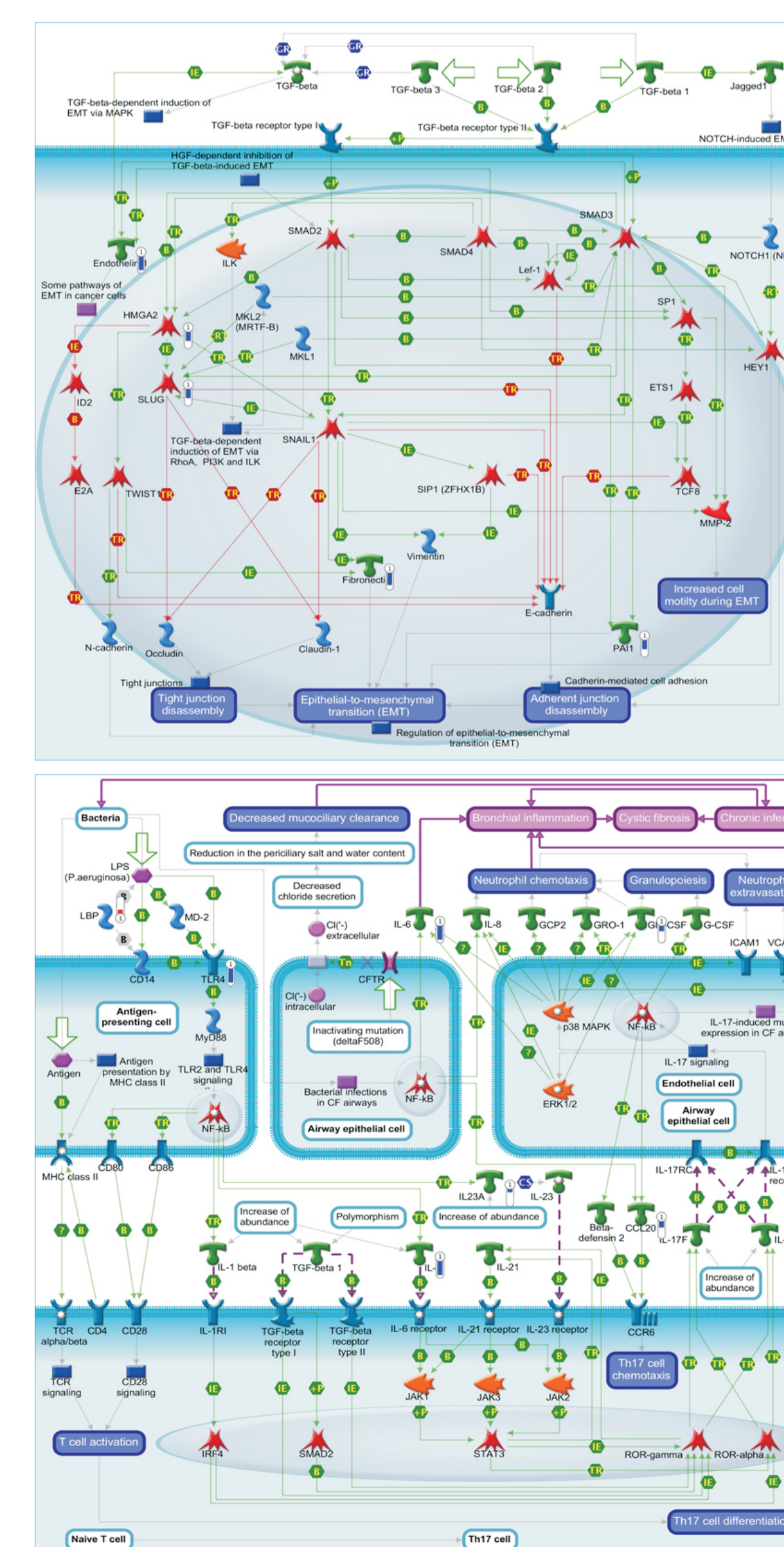
**Figura 2.** Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para os sítios de ligação de NF-κB preditos nas regiões promotoras dos genes SNAIL, SLUG, TWIST1 e SIP1. Histogramas representam a amplificação por qPCR do DNA imunoprecipitado com os anticorpos anti-IgG e anti-NF-κB/p65 nas células MDA-MB-231 (A) e HCC-1954 (B). NF-κB/p65 + DHMEQ: experimento realizado nas células tratadas com 10 μg/ml de DHMEQ. DNA total (Input) foi usado como referência de amplificação. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Figure 5.** Gráficos de Box-plot mostram a expressão de NF-κB/p65 (A), TWIST1 (B), SLUG (C) e SIP1 (D) nos subtipos do câncer de mama Luminal (receptor positivo para estrogênio e/ou progesterona, HER-2 e Triplo-Negativo). A expressão foi normalizada pelos níveis de ACTB e GAPDH, e o  $\Delta\Delta Ct$  foi calculado vs. mediana do Luminal. Outliers estão apresentados como #. \* =  $p < 0,05$



**Figure 3.** Atividade relativa das fusões de sequências da região promotora de SLUG (A), TWIST1 (B) and SIP1 (C) com o gene da luciferase clonada no plasmídeo pGL3 transfectadas na célula MDA-MB-231. O plasmídeo de expressão pRL-TK renilla luciferase foi utilizado como um controle interno e os valores foram normalizados pelo sinal do pGL3 vazio (Mock). As barras brancas indicam a expressão normal de NF-κB e as barras pretas mostram a inibição através do tratamento com DHMEQ. Cada barra representa a média ± DP.



**Figure 6.** Mapas das principais vias de sinalização alteradas pelo silenciamento de TWIST1, de acordo com a significância estatística (valor-p) da distribuição de genes/proteínas presentes nas análises: (A) Transição Epitélio-Mesenquimal Dependente de TGF-β / SMADs e (B) Resposta Imune mediada por Th17. Os dados de expressão relativa dos genes presentes no estudo são visualizados no mapa ao lado de um termômetro em azul (para downregulation) ou vermelho (para upregulation).