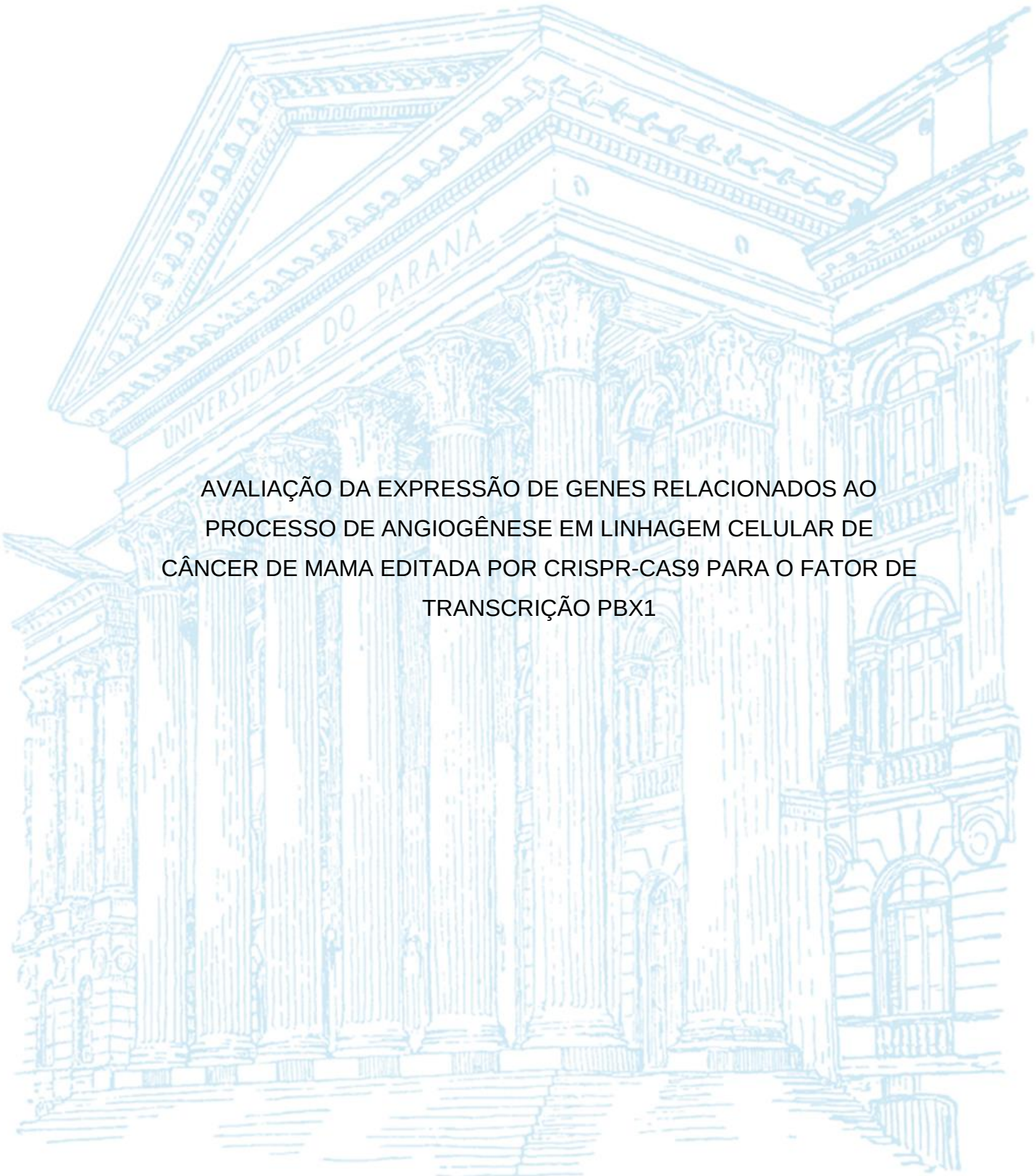
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA EDITADA POR CRISPR-CAS9 PARA O FATOR DE TRANSCRIÇÃO PBX1

CURITIBA

2023

JHONN WILLIAN DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA EDITADA POR CRISPR-CAS9 PARA O FATOR DE TRANSCRIÇÃO PBX1

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Profª. Drª. Daniela Fiori Gradia
Coorientadora: Profª. Drª. Carolina Mathias

CURITIBA

2023

TERMO DE APROVAÇÃO

JHONN WILLIAN DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA EDITADA POR CRISPR-CAS9 PARA O FATOR DE TRANSCRIÇÃO PBX1

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

_____

Prof(a). Dr(a)./Msc. _____

Orientador(a) – Departamento _____, UFPR

_____

Prof(a). Dr(a)./Msc. _____

Departamento _____, UFPR

_____

Prof(a). Dr(a)./Msc. _____

Departamento _____, UFPR

Curitiba, ____ de _____ de 2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente agradecer o apoio dos meus pais João e Clemilda e das minhas irmãs Joana, Janiny e Júlia que nunca jamais deixaram de acreditar em mim ou deixaram de me apoiar em toda e qualquer ideia maluca que já tive durante esses anos que finalmente nos trouxeram até aqui. Gostaria que meu pai estivesse vivo para estar comigo nesse momento e não tem um único dia qual não sinto a falta dele.

Agradeço também à ONG Pré-Vestibular Em Ação por ter me acolhido quando precisei de ajuda para o vestibular lá em 2015 e por continuar me acolhendo desde que iniciei meu voluntariado em 2017, por tudo aquilo que aprendi e ainda aprendo como professor voluntário e ex-aluno da instituição.

Não consigo pensar em gratidão sem lembrar dos meus amigos e colegas que estiveram comigo ao longo da graduação, especialmente a Paola, Matheus, Pedro e Rafa. Sinto falta de passar o dia inteiro com vocês no politécnico, sempre reclamando de quase tudo e ainda assim felizes por estarmos presentes.

Agradeço também a todos os professores e demais profissionais da UFPR que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional e acadêmica, em especial as minhas ex-orientadoras, professora Chirlei, professora Iris, professora Karin e professora Lupe. Um “muito obrigado!” ainda mais especial a professora Erika que como coordenadora do curso de biologia, me acolheu e me auxiliou em todas as vezes que tivemos contato, e a professora Daniela e a professora Carolina, que me orientaram no desenvolvimento desse trabalho e continuam me orientando na pós-graduação. Espero ter muitas oportunidades de escrever nossos nomes em trabalhos como esse e que sejam cada vez melhores e mais divertidos!

RESUMO

O câncer de mama representa um sério problema de saúde pública e é o tipo mais comum de câncer entre mulheres em todo o mundo. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para o triênio 2023-2025, 30,1% de todos os casos de câncer representem os de mama. O fator de transcrição *PBX1*, que desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário, tem sido associado a vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama receptor de estrogênio positivo (RE+), e pode estar relacionado a pelo menos cinco diferentes *hallmarks* do câncer. No entanto, ainda há poucos estudos explorando essa relação. Neste estudo, investigamos a possível conexão entre o fator de transcrição *PBX1* e dois genes envolvidos nos processos de angiogênese (*TIMP1* e *VEGFA*). Comparamos a expressão desses genes na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 com uma linhagem celular MCF-7 editada, pelo método de CRISPR-CAS9, para o gene *PBX1*. Os resultados revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão desses genes entre as duas linhagens. Esse resultado sugere que o *PBX1* não modula diretamente a atividade dos genes *TIMP1* e *VEGFA*.

Palavras-chave: Câncer de mama. PBX1. MCF-7. Angiogênese.

ABSTRACT

Breast cancer represents a serious public health issue and is the most common type of cancer among women worldwide. According to INCA, it is estimated that between 2023 and 2025, 30.1% of all breast cancer cases fall into this category. The transcription factor *PBX1*, which plays an important role in embryonic development, has been associated with various cancer types, including estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer, and may be related to at least five different cancer hallmarks. However, there are still few studies exploring this relationship. In this study, we investigated the possible connection between the transcription factor *PBX1* and two genes involved in angiogenesis processes (*TIMP1* and *VEGFA*). We compared the expression of these genes in the MCF-7 breast cancer cell line with an MCF-7 cell line edited for the *PBX1* gene. The results revealed no statistically significant difference in the expression of these genes between the two cell lines. This finding suggests that *PBX1* does not directly modulate the activity of the *TIMP1* and *VEGFA* genes.

Key-words: Breast cancer. PBX1. MCF-7. Angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *PBX1*.....19

FIGURA 2: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *TIMP1*.....20

FIGURA 3: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *VEGFA*.....21

FIGURA 4: SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *PBX1*.....22

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....10

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....12

2.1 CÂNCER DE MAMA.....12

2.2 MCF-7.....14

2.3 *PBX1*.....15

2.4 TIMP1, ANGPTL4 E VEGFA NA ANGIOGÊNESE 16

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....17

3.1 CULTIVO CELULAR.....17

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA.....17

3.3. QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL (RT-QPCR) 17

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....18

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....18

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....22

REFERÊNCIAS.....23

1. **INTRODUÇÃO**

Câncer é o termo em comum para mais de 100 patologias que possuem a característica de proliferação celular desordenada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes e distantes. Por meio de um processo complexo, denominado carcinogênese, as células se tornam independentes e escapam dos mecanismos de controle intrínseco. Uma vez que estão se dividindo, podem invadir outros tecidos e espalhar-se para outros locais do corpo em um processo denominado metástase (INCA, 2023), criando inclusive recursos de manutenção própria, como angiogênese e expressão de fatores que inibem a apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres no mundo (OMS, 2023), representando um grande problema de saúde pública. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou-se que para o triênio de 2023 a 2025 sejam diagnosticados cerca de 73.610 novos casos somente no Brasil, correspondendo a 30,1% das neoplasias que acometem mulheres e a mais frequente delas, com exceção do câncer de pele não melanoma (ACS, 2019; INCA, 2023).

As habilidades adquiridas ou *hallmarks* do câncer, descritos por Hannahan & Weinberg (2000; 2011) descrevem um conjunto de características em comum aos diversos tipos de câncer. Dentre elas, a capacidade angiogênica do tecido é fundamental para a progressão tumoral, uma vez que células neoplásicas, assim como células saudáveis, precisam de oxigênio e nutrientes providos pela circulação. Quando a célula passa do estado quiescente para o estado angiogênico (*angiogenesis switch*), ela passa a induzir a formação de vasos, e assim o tumor ganha a capacidade de se nutrir e migrar para outros tecidos (ZHOU et al., 2017).

Diferentes subtipos de câncer de mama estão relacionados com prognósticos distintos em cada paciente, para o qual vários fatores contribuem. Estes subtipos são classificados de acordo com grau histológico, origem da formação do tumor e padrões imunoistoquímicos de expressão dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP), HER2 (do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, ou receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) e marcadores de proliferação celular, como o Ki-67 (PEROU et. al., 2000).

Dos subtipos de carcinomas mamários, os que expressam o receptor de estrogênio (ER) são os mais frequentes, correspondendo a pelo menos dois terços de todos os casos (VALENTIN et al., 2012; ACS, 2019), e podem ser divididos em luminal

A (de crescimento mais lento e melhor prognóstico) e luminal B (usualmente mais agressivos e com prognóstico menos favorável). Ambos os tipos apresentam maior responsividade ao tratamento quimioterápico quando comparados aos outros subtipos de câncer de mama, ainda que sejam responsáveis pela morte de milhares de mulheres no mundo (INIC, 2014). Os medicamentos alvo-específicos como os que tem como alvo o receptor de estrogênio (como por exemplo o Tamoxifeno) aumentam a eficiência dos tratamentos e, com frequência, reduzem a quantidade e severidade dos efeitos colaterais. No entanto, uma parcela considerável (40%) dos tumores desenvolve resistência à terapia quimioterápica alvo (WARDELL et al., 2015; JORDAN, 2018; LOI et al., 2019).

A heterogeneidade dos carcinomas mamários, é reflexo da variedade de perfis moleculares de cada subtipo. Diversas pesquisas são desenvolvidas para caracterizar essas assinaturas moleculares, na busca por biomarcadores, como estudos que buscam fatores de transcrição associados ao comportamento proliferativo de determinado tecido. Fatores de transcrição são moléculas que regulam a expressão gênica, modulando-a conforme a necessidade celular e são importantes atores do processo de tumorigênese. O fator de transcrição *PBX1* foi primeiramente identificado como um proto-oncogene em leucemia (NOURSE et. al., 1990) e desde então sua expressão tem sido relacionada com várias etapas da organogênese e do desenvolvimento de tumores. Existem estudos associando o gene *PBX1* com vários *hallmarks* do câncer, como sinalização de proliferação sustentada, invasão e metástase, resistência a apoptose, desregulação do metabolismo energético e indução a angiogênese (VEIGA et al. 2021), no entanto, a relação entre *PBX1* e angiogênese em câncer de mama ainda não foi descrita.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se há modulação da expressão de genes relacionados ao processo de angiogênese regulados por *PBX1*. Para isto, utilizou-se a linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal A (MCF-7 ed.) editada por CRISPR-Cas9 para o gene *PBX1* em relação a linhagem não modificada (MCF-7). A linhagem editada foi obtida através de um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (VEIGA, 2022) e consistiu no levantamento de genes relacionados com os *hallmarks* do câncer e a obtenção de linhagens editadas desses genes em questão, sendo o *PBX1* um dos genes editados gerando a linhagem MCF-7 ed. Posteriormente, três genes relacionados aos processos de angiogênese (*TIMP1*, *ANGPTL4*, *VEGFA*) foram eleitos com base na bibliografia referente a esse *hallmark*,

resultando na construção de primers para análise via RT-qPCR da expressão desses três candidatos e de um controle endógeno (*U6*) na linhagem editada (MCF-7 ed.) em comparação com a linhagem selvagem (MCF-7), a fim de compreender a possível relação do *PBX1* com a angiogênese, na tentativa de esclarecer o papel desse gene nesse importante processo fisiológico de sustento e manutenção dos tumores sólidos

2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer em mulheres no mundo, com 73.610 novos casos diagnosticados somente em território nacional em 2022 de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), sendo responsável por quase 18 mil mortes em 2020 no Brasil (INCA, 2023). Ainda de acordo com o INCA, o câncer de mama não é exclusivo das mulheres e apesar de ser raro, no Brasil cerca de 1% do total de diagnósticos ocorrem em homens. Em um contexto global, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima que no final de 2020 2,3 milhões de mulheres foram diagnósticas com a doença e cerca de 685 mil morreram em decorrência de complicações relacionadas ao câncer de mama (WHO, 2023). A OMS estima ainda que em 2020 existiam cerca de 7,8 milhões de mulheres vivas que haviam sido diagnosticadas com a doença nos últimos 5 anos, tornando o câncer de mama o tipo mais prevalente de câncer em todo o mundo (WHO, 2023). O câncer de mama leva essa denominação pois é originado de maneira multifatorial (como pré-disposição genética, fatores ambientais e estilo de vida (INCA, 2023) do tecido mamário, mais comumente a partir das glândulas mamárias ou dos ductos que transportam o leite materno (SCULLY et al., 2012). Os sintomas do câncer de mama usualmente consistem no aparecimento de nódulos nas mamas ou nas axilas (local de grande concentração gânglios linfáticos), que a depender do estágio de proliferação podem ser identificados como potenciais tumores a partir de diferentes técnicas sendo o autoexame um dos mais importantes para a detecção precoce (AKRAM et al., 2017).

O câncer de mama é uma doença bastante heterogênea na qual as neoplasias mamárias podem ser classificadas de acordo com suas características moleculares, histológicas, padrões de proliferação e crescimento, potencial invasivo de outros tecidos entre outros fatores (WEIGELT et al., 2010). De acordo com o potencial

invasivo, podemos dividir o câncer de mama entre o câncer de mama não invasivo e o câncer de mama invasivo. O câncer de mama não invasivo apresenta o subtipo carcinoma ductal *in situ* (CDIS) como o mais prevalente, compreendendo cerca de 90% dos diagnósticos entre os não invasivos. Já o subtipo carcinoma lobular *in situ* (CLIS), menos comum, é considerado um fator de risco para maior probabilidade de invasão tecidual quando não tratado (SHARMA et al., 2010). Entre os subtipos invasivos, o carcinoma ductal invasivo é o mais comum (80%), inicialmente presente nos ductos mamários, invadindo tecidos adjacentes. Ainda do ponto de vista histológico, o carcinoma lobular invasivo invade os tecidos ao redor dos lóbulos mamários, sendo o segundo tipo mais comum entre os invasivos (cerca de 15%), ainda que bem menos comum que o carcinoma ductal invasivo (SHARMA et al., 2010; WEIGELT et al., 2010). Existem ainda outros tipos de câncer de mama que não se encaixam ou se encaixam parcialmente nas categorias previamente determinadas, como o carcinoma inflamatório, medular ou mucinoso ainda que menos comuns que os anteriormente citados (JENKINS et al., 2021).

Nos anos 70, Wellings e colaboradores (1973; 1975) demonstraram que as diferenças entre os carcinomas ductais ou lobulares não necessariamente refletiam o tecido de origem desses tumores e por consequência, essa classificação refletia somente as características apresentadas pelo tecido tumoral. Essa demonstração contribuiu para a necessidade de uma classificação molecular do câncer de mama, já que um entendimento da progressão fisiológica desses tumores poderia contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes através de um tratamento mais preciso (WEIGELT et al., 2010). Em uma revisão de 2009, Weigelt e Reis-Filho (2009) classificaram o câncer de mama em quatro principais tipos moleculares: os luminais divididos em A e B, os que apresentam uma superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+), os basal-like os normal-like.

Dentro da classificação imunoistoquímica, o subtipo luminal A é representado por cerca de 60% do total de casos diagnosticados, contando também com o melhor prognóstico, pertencendo a essa categoria por apresentar os receptores de estrogênio (RE) e/ou receptores de progesterona (RP) com baixos níveis de expressão do HER2 e taxas reduzidas de proliferação celular (EROLES et al., 2012). O subtipo luminal B é similar ao luminal A, porém tende a apresentar um prognóstico menos favorável, apresentando maiores níveis de HER2, pior resposta terapêutica quando comparado com o A e maiores taxas de proliferação (EROLES et al., 2012).

Ainda que os subtipos luminais, e em especial o luminal A apresente um melhor prognóstico quando comparado aos demais subtipos, anualmente milhares de mulheres morrem devido a complicações relacionadas a esses subtipos, mesmo quando recebem tratamento especializado (INIC, 2014). Dessa forma, entender o papel dos genes que estão relacionados com esses perfis tumorais torna-se essencial para a compreensão da progressão tumoral como um todo e consequentemente, do desenvolvimento de terapias mais eficientes. É nesse contexto que linhagens tumorais como a MCF-7, representante do subtipo luminal A, são úteis para o desenvolvimento de estudos e experimentos que não dependam de testes clínicos em pacientes, contribuindo para o entendimento da doença através de análises laboratoriais *in vitro* como uma linhagem modelo para o câncer de mama.

2.2 MCF-7

A linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal A MCF-7 (um acrônimo para *Michigan Cancer Foundation-7*) é uma das linhagens celulares mais amplamente utilizadas como modelo em estudos de câncer de mama, mais especificamente, como um modelo para os subtipos luminais. Essa linhagem foi estabelecida em 1973 por Soule e colaboradores na Fundação do Câncer de Michigan (hoje conhecida como *The Barbara Ann Karmanos Cancer Institute*) que isolaram células de uma efusão pleural de uma mulher de 69 anos já em estado de metástase. Baseado no histórico hospitalar dessa paciente e dos procedimentos e tratamentos quais a paciente havia sido submetida no passado, Soule e colaboradores sabiam que as células eram responsivas a terapias hormonais, ainda que não fosse claro de que maneira isso acontecida. O receptor de estrogênio foi originalmente descrito nessa linhagem em 1973 e em 1975, outros pesquisadores demonstraram que moduladores seletivos do receptor de estrogênio (MSRE) como o tamoxifeno, inibiam o crescimento dessas células tumorais e que esse crescimento poderia ser retomado através do tratamento com estrogênio (COMŞA et al., 2015).

Desde as descobertas dos pesquisadores de Michigan, a linhagem celular MCF-7 vem sido amplamente utilizada como modelo em milhares de estudos que investigam o câncer de mama, incluindo em testes de novas drogas, potenciais terapias, mecanismos moleculares entre outros (COMŞA et al., 2015). Como discutido brevemente, essa linhagem é positiva para o receptor de estrogênio (RE+) e de

progesterona (RP+) e devido a sua baixa expressão de HER2, característica não invasiva e não agressiva, é frequentemente classificada como pertencente ao subtipo luminal A (VILLALOBOS, 1995). Ainda que usualmente descrita como uma linhagem única, existem diversas variações dessa linhagem celular (COMSA et al., 2015). A linhagem editada para o fator de transcrição *PBX1* (MCF-7 ed.) foi obtida através da técnica do CRISPR-Cas9 derivada de um trabalho previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa que elencou e editou genes potencialmente relacionados com os *hallmarks* do câncer revisados por Hanahan e Weinberg em 2011.

2.3 *PBX1*

O gene *PBX1* (do inglês *Pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1* ou fator de transcrição 1 da leucemia de células pré-B em tradução livre) é um fator de transcrição pertencente à família PBX1-4, envolvido majoritariamente no desenvolvimento embrionário, sendo potencialmente relacionado ao câncer desde sua descrição em 1990 devido ao seu papel na proliferação celular e potencial envolvimento na regulação do ciclo celular (VEIGA et al., 2021). Descrito inicialmente através de uma translocação t(1;19) (q23;p13.3) fundido ao gene E2A (um regulador de diferenciação de linfócitos), o *PBX1* foi nomeado *Prl* (do inglês *pre-B cell leukemia*) e posteriormente renomeado como *PBX1*, já que o gene da prolactina já era conhecido como *PRL* (VEIGA et al., 2021; E ASPLAND et al., 2011). No ano de sua descrição, a translocação *PBX1-E2A* estava presente em aproximadamente 23% de todas as células pré-B dos pacientes leucêmicos e estava relacionada a um pior prognóstico e resposta a quimioterápicos (E ASPLAND et al., 2001).

Posteriormente, o *PBX1* foi descrito como um gene com mais de 340 kb localizado no cromossomo 1, mais especificamente no braço 1q23.3, codificando a proteína *PBX1* de uma família de proteínas homeobox, com capacidade de ligação direta ao DNA (NCBI, 2023). Em uma revisão do nosso grupo de pesquisa publicada em 2021, Veiga e colaboradores relacionaram o *PBX1* com pelo menos cinco diferentes hallmarks do câncer, características elencadas por Hanahan e Weinberg revisitadas em 2011 e comuns a quase todos os tipos de câncer, sendo elas: manutenção do sinal proliferativo, resistência à morte celular, ativação de invasão e metástase, desregulação da bioenergética celular e indução da angiogênese (VEIGA et al., 2021).

2.4 *TIMP1*, *ANGPTL4* e *VEGFA* na angiogênese

A angiogênese é um processo natural onde vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes, presente desde o desenvolvimento embrionário até a fase adulta, como na regeneração de tecidos lesionados, por exemplo (RISAU, 1997). A formação de vasos sanguíneos adjacentes é um dos *hallmarks* do câncer elencados por Hanahan e Weinberg (2011) e está presente em praticamente todos os tumores sólidos. Existem alguns genes conhecidamente relacionados a esse processo, como o *TIMP1* (do inglês *TIMP metallopeptidase inhibitor 1*, ou inibidor tecidual da metalopeptidase 1 em tradução livre), *ANGPTL4* (do inglês *Angiopoietin Like 4*, ou proteína similar a angiopoietina 4) e *VEGFA* (do inglês *Vascular Endothelial Growth Fator*, ou fator de crescimento endotelial vascular) que foram amplamente investigados e analisados em dezenas de estudos, servindo como alvos para investigação de processos envolvendo o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (JOHNSEN et al., 2011; CARMELIET et al., 2000).

A família de genes *TIMP* agem como inibidores de metalonaproteinases, conhecidos por seu papel na remodelação extracelular através do controle das proteínas metaloproteinases (MMPs) (RIES, 2014). As proteínas TIMPs agem como moléculas sinalizadoras similares as citoquinas e estão relacionadas com o crescimento celular, apoptose, angiogênese e oncogênese, reforçando seu relevante papel na formação de novos vasos sanguíneos (RIES, 2014; GRÜNWALD et al., 2019). O *TIMP1* está localizado no cromossomo 22, na posição q13.31 e possui aproximadamente 13,1 kB (NCBI, 2023). Já o gene *ANGPTL4* codifica para a proteína de mesmo nome que quando secretada na matriz celular, está envolvida na regulação da permeabilidade vascular, da angiogênese e de respostas inflamatórias em diferentes tecidos (GUO et al., 2014). Okochi-Takada e colaboradores (2014) demonstraram que a proteína ANGPTL4 age como uma proteína supressora de tumor ao inibir a angiogênese e consequentemente, tumores com alta capacidade de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, possivelmente possuem a atividade da ANGPTL4 alterada, tornando o gene dessa proteína um potencial alvo para investigação em diferentes tipos tumorais (GUO et al., 2014). O *ANGPTL4* está localizado no cromossomo 19, na posição p13.3 e apresenta cerca de 6,7 kb (NCBI, 2023). Já o *VEGFA* é um gene central na formação de novos vasos e por essa razão levam nome de fator de crescimento endotelial, com vias metabólicas complexas e

não totalmente compreendidas sendo alvo de potenciais terapias anticâncer há muitas décadas (FERRARA, 2002). Esses genes pertencem a superfamília de genes PDGF (do inglês *platelet-derived growth factor*, ou fator de crescimento derivado de plaquetas) e todos os membros da família possuem algum grau de relação com a formação de novos vasos sanguíneos (SHIBUYA, 2001). Através de consulta a bancos de dados, não foi possível determinar se a proteína do gene *PBX1* tem como alvo algum dos genes escolhidos para avaliação do processo de angiogênese. Caso houvesse uma relação direta entre o fator de transcrição e o gene alvo, seria esperado que uma alteração no fator de transcrição afetasse a expressão dos seus genes alvo (NCBI, 2023; UCSC, 2023).

3. **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 Cultivo celular

As linhagens celulares MCF-7, e MCF-7 editada para o gene *PBX1* (MCF-7 ed) foram mantidas em garrafas de cultura utilizando meio DMEM (Gibco) suplementado com 100mg/mL de estreptomicina, 60 mg/mL de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37ºC e posteriormente coletadas para a extração de RNA.

3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

O isolamento do RNA das linhagens celulares foi realizado utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguido por uma quantificação do RNA realizada no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific ®) e estocado à -80ºC. Posteriormente, o RNA foi submetido a tratamento com DNAse I (Invitrogen) e a síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante a partir de 1µg de RNA. Após a conversão, o cDNA foi estocado à -20ºC.

3.3. Quantificação por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A análise de RT-qPCR foi efetuada utilizando o master mix SYBR green (Applied Biosystems) e oligonucleotídeos específicos para o gene do fator de transcrição *PBX1* e de três genes relacionados à via de angiogênese: *TIMP1*, *ANGPTL4* e *VEGFA*. A quantificação relativa foi avaliada a partir da comparação do ciclo em que o nível de fluorescência alcançou um limiar pré-estabelecido (Ct) do gene alvo em relação a dois controles endógenos, determinado pelo cálculo do valor de $2^{-\Delta\,\Delta Ct}$ Como controle, foi analisado a expressão do gene basal, o *U6* (um snRNA). As reações foram realizadas em triplicata no equipamento ViiA 7 Real-time PCR System (Thermo Fischer Scientific ®). A relação dos oligonucleotídeos e respectivas sequências está no Quadro 1.

QUADRO 1: SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR

Gene	Sequência *forward* (5´- 3')	Sequência *reverse* (5´- 3')
PBX1	TGCGTTCCCGATTTCTGGAT	AGACTGTGATGCCACACTTC
TIMP1	GGGCTTCACCAAGACCTACA	TGCAGGGGATGGATAAACA
ANGPTL4	TCCGTACCCTTCTCCACTTG	ACGCCTCTGGCCGTACCACT
VEGFA	CCTTGCTGCTCTACCTCCAC	ATGATTCTGCCCTCCTCCTT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

3.4. Análise estatística

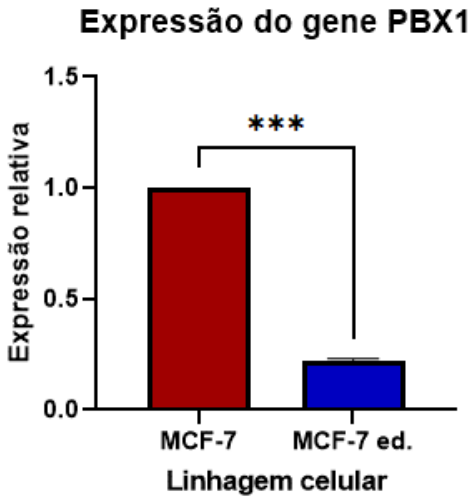
As análises estatísticas serão realizadas utilizando o teste t de Student com auxílio do software teste t de Student com auxílio do software GraphPad Prism 9.5.1. Inicialmente a expressão dos genes alvos será normalizada em relação ao gene basal (*U6*) e os dados brutos serão submetidos ao software.

4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com o objetivo de avaliar a possível modelação da expressão gênica de genes relacionados ao processo de angiogênese na linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal A (MCF-7) editada por CRISPR-Cas9 para o gene *PBX1* (MCF-7 ed.), os resultados das duplicatas biológicas realizadas em triplicatas técnicas, confirmaram a diferença significativa esperada na expressão do gene *PBX1* na linhagem MCF-7 quando comparada com a MFC-7 ed., considerando que a edição tinha como objetivo reduzir a expressão do *PBX1* (Figura 1).

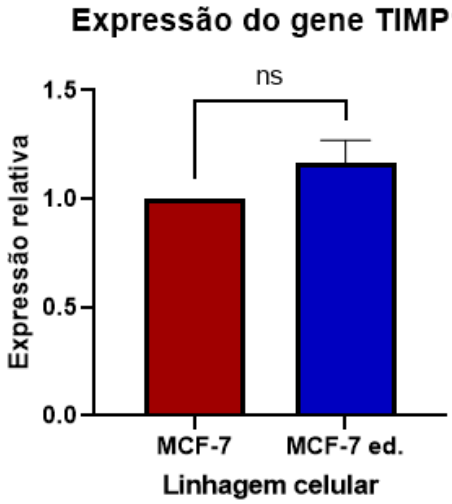
O gene *U6* de expressão constitutiva foi utilizado como normalizador para garantir que a diferença observada refletisse de fato a expressividade diferencial entre a linhagem controle e a linhagem editada, possibilitando as comparações.

FIGURA 1: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *PBX1* ENTRE A LINHAGEM MCF-7 E A LINHAGEM MCF-7 ED.



Confirmada a expressão diferencial do gene *PBX1*, comparamos a expressão do gene *TIMP1* na linhagem original em relação a linhagem editada. Esperávamos que, caso houvesse modulação da expressão gênica de genes relacionados a angiogênese pelo *PBX1*, uma diferença significativa seria encontrada como resultado da comparação, porém isso não aconteceu. Após a normalização, as diferenças na expressão do gene *TIMP1* nas duas linhagens não apresentaram diferença significativa (Figura 2).

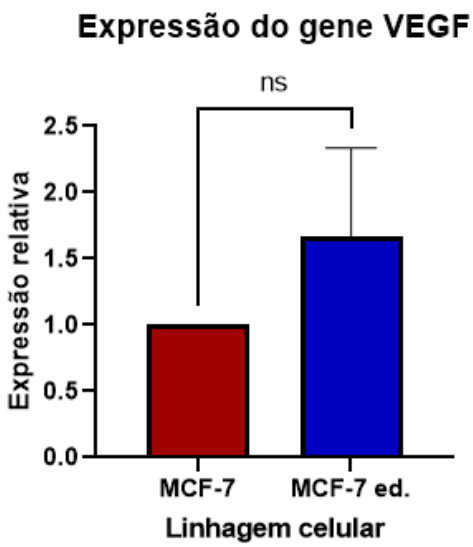
FIGURA 2: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *TIMP1* ENTRE A LINHAGEM MCF-7 E A LINHAGEM MCF-7 ED.



A mesma lógica seria aplicada para comparar a expressão do gene ANGPTL4, porém não houve amplificação de nenhum fragmento em nenhuma das triplicatas técnicas ou mesmo entre as triplicatas biológicas, possivelmente por algum problema envolvendo os primers, já que todas as demais reações aconteceram conforme esperado. Considerando que não havia mais tempo hábil para a síntese de novos primers e repetição das reações até a data solicitada para a entrega deste trabalho, optamos por prosseguir com as avaliações sem esse resultado.

Prosseguindo com a análise dados, a comparação agora foi realizada entre a linhagem MFC-7 em relação a linhagem MCF-7 ed. para o gene *VEGFA*. A diferença não foi significativa (Figura 3).

FIGURA 3: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE VEGFA ENTRE A LINHAGEM MCF-7 E A LINHAGEM MCF-7 ED.



Ainda que somente dois genes relacionados aos processos de angiogêneses tenham sido comparados entre a linhagem editada para o *PBX1* e a linhagem padrão, nenhum dos dois genes apresentou diferença significativa na expressão, indicando que possivelmente o gene *PBX1* não interage diretamente com o *TIMP1* ou o *VEGFA* na linhagem celular MCF-7. A região específica pela qual a proteína do gene *PBX1* se liga é conhecida (FIGURA 4), todavia nenhum dos bancos de dados consultados continham a informação da potencial ligação do fator de transcrição *PBX1* com regiões de controle da expressão gênica desses genes alvo. O levantamento de outros genes relacionados a esse processo e uma comparação em um maior número de experimentos independentes, enriqueceriam os achados do trabalho, porém por questões de logística e prazos para o desenvolvimento do e entrega trabalho essas análises adicionais puderam ser realizadas. Esses contratempos não diminuem a importância dos achados ou a necessidade de demais investigações da relação do *PBX1* com os *hallmarks* do câncer, já que a revisão de Veiga e colaboradores (2021) foi capaz de relacionar pelo menos outros quatro *hallmarks* do câncer envolvidos com a expressão do *PBX1* e futuros trabalhos ainda serão desenvolvidos com a linhagem editada a fim de uma maior compreensão do papel desse fator de transcrição no câncer de mama.

FIGURA 4: GRÁFICO DE LOGO DA SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *PBX1*.

FONTE: JASPAR 2022.

5. **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho teve como objetivo analisar a relação do fator de transcrição *PBX1* com três genes envolvidos no processo de angiogênese através da expressão gênica comparada, os genes *TIMP1*, *ANGPTL4* e *VEGFA*. Devido há imprevistos, foi analisado a expressão gênica de somente dois dos três candidatos iniciais. A expressão do gene *ANGPTL4* não foi avaliada. Diferente daquilo que se esperava como resultado baseado na revisão bibliográfica e no papel do *PBX1* no processo de angiogênese, não houve diferença estatística significativa na expressão gênica dos genes candidatos entre a linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal A (MCF-7) e a mesma linhagem editada para o gene *PBX1* (MCF-7 ed.). Futuros trabalhos que possam reavaliar o papel desses genes juntamente com outros genes envolvidos com o processo angiogênese em câncer de mama poderão dar suporte as conclusões desse trabalho, bem como, contribuir para o entendimento do papel do fator de transcrição *PBX1* no câncer de mama.

REFERÊNCIAS

ACS: American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020. Atlanta: **American Cancer Society**, Inc. p. 1-44, 2019.

AKRAM, M., IQBAL, M., DANIYAL, M., & KHAN, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, 50, 1-23.

AO, X., DING, W., GE, H., ZHANG, Y., DING, D., & LIU, Y. (2020). PBX1 is a valuable prognostic biomarker for patients with breast cancer. **Experimental and therapeutic medicine**, 20(1), 385-394.

ASPLAND, S. E., BENDALL, H. H., & MURRE, C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. **Oncogene**, 20(40), 5708-5717.

CARMELIET, P., & JAIN, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, 407(6801), 249-257.

COMŞA, Ş., CIMPEAN, A. M., & RAICA, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, 35(6), 3147-3154.

EROLES, P.; BOSCH, A.; ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012. Elsevier Ltd.

FERRARA, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**, 2(10), 795-803.

GRÜNWALD, B., SCHOEPS, B., & KRÜGER, A. (2019). Recognizing the molecular multifunctionality and interactome of TIMP-1. **Trends in cell biology**, 29(1), 6-19.

GUO, L., LI, S. Y., JI, F. Y., ZHAO, Y. F., ZHONG, Y., LV, X. J., ... & QIAN, G. S. (2014). Role of Angptl4 in vascular permeability and inflammation. **Inflammation Research**, 63, 13-22.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer de mama: vamos falar sobre isso?. Disponível em <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama> acesso em junho de 2023.

INIC, Z., ZEGARAC, M., INIC, M., MARKOVIC, I., KOZOMARA, Z., DJURISIC, I. & JANCIC, S. (2014). Difference between luminal A and luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, 8, CMO-S18006.

CASTRO-MONDRAGON J.A.; RIUDAVETS-PUIG R.; RAULUSEVICIUTE I.; BERHANU LEMMA R.; TURCHI L.; BLANC-MATHIEU R.; Lucas J.; BODDIE P.; KHAN A.; MANOSALVA PÉREZ N.; FORNES O.; LEUNG T.Y.; AGUIRRE A.; HAMMAL F.; SCHMELTER D.; BARANASIC D.; BALLESTER B.; SANDELIN A.; LENHARD B.; VANDEPOELE K.; WASSERMAN W.W.; PARCY F.; and MATHELIER A. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles Nucleic Acids Res. 2022 Jan 7;50(D1): D165-D173.

JENKINS, S., KACHUR, M. E., RECHACHE, K., WELLS, J. M., & LIPKOWITZ, S. (2021). Rare breast cancer subtypes. **Current oncology reports**, 23, 1-14.

JOHNSEN, G. M., BASAK, S., WEEDON-FEKJAER, M. S., STAFF, A. C., & DUTTAROY, A. K. (2011). Docosahexaenoic acid stimulates tube formation in first trimester trophoblast cells, HTR8/SVneo. **Placenta**, 32(9), 626-632.

JORDAN, V.C. Tamoxifen Resistance Trumped and Oral Selective Estrogen Receptor Degraders Arrive. **Clinical Cancer Research**. V. 24(15), p. OF1-OF3, 2018.

LOI, S., GIOBBIE-HURDER, A., GOMBOS, A., BACHELOT, T., Hui, R., CURIGLIANO, G. & SCHNEIER, P. (2019). Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b–2 trial. **The Lancet Oncology**, 20(3), 371-382.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> acesso em junho de 2023.

NOURSE, J. et. al. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 535-545, 1990.

OKOCHI-TAKADA, E., HATTORI, N., TSUKAMOTO, T., MIYAMOTO, K., ANDO, T., ITO, S., ... & USHIJIMA, T. (2014). ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. **Oncogene**, 33(17), 2273-2278.

OMS: Organização Mundial da Saúde. Disponível em <https://www.who.int/pt/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action> acesso em junho de 2023.

PEROU, C.M.; SØRLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, Ø.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LØNNING, P.E.; BØRRESEN-DALE, A-L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** V.406, p.747-752, 2000.

RIES, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. **Cellular and molecular life sciences**, 71, 659-672.

SCULLY, O. J., BAY, B. H., YIP, G., & YU, Y. (2012). Breast cancer metastasis. **Cancer genomics & proteomics**, 9(5), 311-320.

SHARMA, G. N., DAVE, R., SANADYA, J., SHARMA, P., & SHARMA, K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, 1(2), 109.

SHIBUYA, M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. **Cell structure and function**, 26(1), 25-35.

SOULE H. D.; VAZGUEZ J.; LONG A.; ALBERT S. and BRENNAN M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst 51**: 1409-1416, 1973.

UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC**. Genome Res**. 2002 Jun;12(6):996-1006.

VALENTIN, M.V.; SILVA, S.D.; PRIVAT, M. ALAOUI-JAMALI, M.; BIGNON, Y-J. Molecular insights on basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. V. 134, p. 21-30, 2012.

VEIGA, R. N.; DE OLIVEIRA, J. C.; GRADIA, D. F. PBX1: a key character of the hallmarks of cancer. **Journal of Molecular Medicine**, p. 1-14, 2021

VILLALOBOS, M., OLEA, N., BROTONS, J. A., OLEA-SERRANO, M. F., RUIZ DE ALMODOVAR, J. M., & PEDRAZA, V. (1995). The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. **Environmental health perspectives**, 103(9), 844-850.

WARDELL, S.E.; ELLIS, M.J.; ALLEY, H.M.; EISELE, K.; VanARSDALE, T.; DANN, S.G.; ARNDT, K.T.; PRIMEAU, T.; GRIFFIN, E.; SHAO, J.; CROWDER, R.; LAI, J-P.; NORRIS, J.D.; McDONNELL, D.P.; LI, S. Efficacy of SERD/SERM Hybrid-CDK4/6 Inhibitor Combinations in Models of Endocrine Therapy-Resistant Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**. V. 21(22), p. 5121-5130, 2015.

WEIGELT, B., & REIS-FILHO, J. S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?. **Nature reviews Clinical oncology**, 6(12), 718-730.

WEIGELT, B., GEYER, F. C., & REIS-FILHO, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they?. **Molecular oncology**, 4(3), 192-208.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global health estimates: Leading causes of death**. Disponível em < https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death > acesso em junho de 2023.

ZHOU, Z.; YAO, H.; HU, H. Disrupting Tumor Angiogenessi and “the hunger games” for breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1026, 2017.