



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Programa de Pós-Graduação em Biociências

Juliana Alves Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca  
de novas funções moleculares**

Rio de Janeiro

2021

Juliana Alves Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca de novas  
funções moleculares**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-  
Graduação em Biociências, da Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Coorientador: Prof. Dra. Carolina Panis

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R696 Rodrigues, Juliana Alves.  
Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca de novas funções moleculares / Juliana Alves Rodrigues. - 2021.  
90 f.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Mencialha  
Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Carolina Panis

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Mamas – Câncer– Teses. 2. Citoesqueleto – Teses. 3. Reparo do DNA - Teses.  
4. Fator de Transcrição AP-1. I. Mencialha, André Luiz. II. Panis, Carolina. III.  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara  
Gomes. IV. Título.

CDU 618.19-006.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Juliana Alves Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca de novas  
funções moleculares**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-  
Graduação em Biociências, da Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 16 de agosto de 2021.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Carolina Panis  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz  
Instituto Nacional do Câncer

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Pedro Nicolau Neto  
Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2021

## **DEDICATÓRIA**

À minha família e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo presente da vida e as oportunidades diárias concedidas.

À minha família, as pessoas mais importantes da minha vida, a minha mãe e meu pai, Edna e Italo, pelo suporte incondicional, ao meu irmão Italo Júnior pelo apoio, a minha madrinha Carla e sua família, pelo incentivo e carinho.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Andre Mencialha, pelo suporte, ensinamento, paciência, dedicação e por compartilhar comigo todo conhecimento que tem e me ajudar a crescer durante todos esses anos de orientação, você foi o melhor mentor que poderia ter entrado no meu caminho durante esse, que foi um dos processos mais desafiadores que enfrentei.

Agradeço aos colegas do laboratório, Isis, Priscyane, Adilson, Keila, Diego, Matheus ao professor Adenilson Fonseca, por todo apoio, dias agradáveis de trabalho, pelas trocas de sempre, o suporte durante os momentos não tão fáceis, especialmente esse último um ano e meio, em que enfrentamos esse cenário tão caótico.

Agradeço aos meus amigos, especialmente os que resistiram às minhas mudanças durante o processo de amadurecimento, Carol Oliveira, Alessandra Filgueiras, Paula Mello, Mariana Bottany, Marina Coutinho, Alessandro Sales, Bruno Lamy, Mariana Braz, Thalita Scandolaro, Alessandra Sá por todos os conselhos, paciência, escuta, ajuda durante esse período e por toda a vida.

Agradeço a minha co-orientadora Carolina Panis pela ajuda na realização das análises e pelos ensinamentos.

A metamorfose é irreversível.

Depois que voa, a borboleta  
jamais volta a rastejar.

*Wandy Luz*

## RESUMO

RODRIGUES, Juliana Alves. **Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama:** em busca de novas funções moleculares. 2021. 90f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O câncer de mama é a segunda neoplasia que mais mata mulheres em países desenvolvidos e a primeira causa de morte em países em desenvolvimento. A via de reparo por excisão de base (BER) é responsável por reparar os danos causados por radicais livres no DNA, entretanto, o mau funcionamento contribui para a formação e progressão de tumores. A endonuclease APE1, principal enzima de BER, é responsável por preparar os sítios abásicos para continuidade do reparo e a expressão aumentada tem sido relacionada com agressividade e um prognóstico ruim. Desta forma, neste trabalho foi avaliada a função da endonuclease APE1 na proliferação, agressividade, e regulação gênica de modelos celulares de câncer de mama. O ensaio de WST-1 foi realizado para avaliar a viabilidade das culturas celulares após inibição da APE1 com o CRT0044876. O ensaio de Anexina V/7-AAD foi realizado para investigar o mecanismo de morte ativado pelo CRT0044876. Em seguida, foi realizado o ensaio de imunofluorescência com faloidina para avaliação do citoesqueleto de actina. Ademais, foi realizado o ensaio de microarranjo a fim de investigar as possíveis alterações de expressão gênica causadas pela inibição de APE1 e a validação por PCR em tempo real da expressão de genes relacionados a regulação da via de citoesqueleto. Foram realizados os ensaios de migração celular por *Wound-healing* e invasão celular em *Transwell*® com matrigel, para investigar o potencial metastático dos modelos celulares. Por fim, a análise de TCGA foi utilizada para investigar possíveis correlações da assinatura gênica da atividade de APE1 e expressão de genes de vias alteradas do microarranjo. O ensaio de viabilidade celular mostrou que a inibição da função endonuclease da APE1 é importante para viabilidade de células MDA-MB-231 e MCF-7, reduzindo em aproximadamente 50 % a viabilidade em culturas de células MDA-MB-231 e em 25 % a viabilidade em culturas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876 em concentrações maiores que 1000 µM, após 6 h de tratamento. O ensaio de apoptose/necrose mostrou que ambos os mecanismos são acionados simultaneamente em células MDA-MB-231, onde as taxas de apoptose e necrose foram de aproximadamente 57% e 59%, respectivamente. A imunofluorescência em células MDA-MB-231 mostrou formação de lamelipódios e fibras de estresse. O microarranjo mostrou alteração de 2399 genes regulados positivamente e 496 genes regulados negativamente em células MDA-MB-231, sendo que a principal via alterada foi a relacionada à regulação do citoesqueleto. Em adição, o ensaio de migração celular mostrou variação significativa, aproximadamente 10%, após tratamento com CRT0044876 em células MDA-MB-231. Por fim, através da PCR pôde-se observar aumento de aproximadamente 11 vezes nos transcritos de *MMP1*, aumentado 8,25 vezes no microarranjo, em células MDA-MB-231. Em células MCF-7 houve redução de aproximadamente 4 vezes nos transcritos de *PAK2*, que aparece no microarranjo aumentado 2,92 vezes. Análises do TCGA, indicaram que há uma correlação média entre atividade da APE1 e a expressão de *MMP1*. No subtipo *basal-like* há maior expressão de *ENAH*, *NRAS*, *NCKAP1*, *DIAPH3* e *MMP1*. Desta forma, os resultados indicam que a inibição da função endonuclease da APE1 é importante para viabilidade em culturas de células MDA-MB-231 e MCF-7, porém só induz alteração morfológica em células MDA-MB-231. Tal inibição sugere ainda uma regulação gênica de APE1, principalmente em relação ao citoesqueleto e processo de migração de células MDA-MB-231.

Palavras-chave: APE1. BER. Microarranjo. Citoesqueleto.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Juliana Alves. **Investigation of the role of APE1 in breast cancer models: in search of new molecular functions.** 2021. 90f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Breast cancer is the second cancer that kills more women in developed countries and the first cause of death in developing countries. The basic excision (BER) repair pathway is responsible for repairing the free radical damage to DNA; however, the malfunction contributes to the formation and progression of tumors. APE1 endonuclease, the main BER enzyme, is responsible for preparing the abasic sites for repair continuity and increased expression has been related to aggressiveness and a poor prognosis. Thus, in the present study, the function of APE1 endonuclease in proliferation, aggressiveness, and gene regulation of cellular models of breast cancer was evaluated. WST-1 assay was performed to evaluate the viability of cell lines after APE1 inhibition with CRT0044876. Annexin V/7-AAD assay was performed to investigate the mechanism of death activated by CRT0044876. Immunofluorescence assay with Phalloidin was then performed to evaluate the actin cytoskeleton. In addition, microarray assay was performed to investigate possible gene expression changes caused by APE1 inhibition and real-time PCR validation of gene expression related to cytoskeleton pathway regulation. Wound-healing and cellular invasion cell migration trials were performed in Transwell® with matrigel to investigate the metastatic potential of cell models. Finally, TCGA analysis was used to investigate possible correlations of gene signature of APE1 activity and expression of altered microarray pathway genes. Cell viability assay showed that inhibition of APE1 endonuclease function is important for viability of MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, reducing viability in MDA-MB-231 cell line by approximately 50 %, and viability in MCF-7 cell line by 25 %7 incubated with CRT0044876 at concentrations greater than 1000  $\mu$ M after 6 h of treatment. Apoptosis/necrosis assay showed that both mechanisms are triggered simultaneously in MDA-MB-231 cells, where apoptosis and necrosis rates were approximately 57% and 59%, respectively. Immunofluorescence in MDA-MB-231 cell line showed formation of lamellipodia and stress fibers. Microarray assay showed alteration of 2399 positively regulated genes and 496 negatively regulated genes in MDA-MB-231 cells, with the main altered pathway being related to cytoskeleton regulation. In addition, cell migration assay showed significant variation, approximately 10%, after treatment with CRT0044876 in MDA-MB-231 cells. Finally, through PCR, it was possible to observe an increase of approximately 11 times in MMP1 transcripts, increased 8.25 times in microarray, in MDA-MB-231 cells. In MCF-7 cells there was a reduction of approximately 4 times in PAK2 transcripts, which appears in the increased microarray 2.92 times. GA analyses indicated that there is a mean correlation between APE1 activity and MMP1 expression. In the basal-like subtype there is more expression of ENAH, NRAS, NCKAP1, DIAPH3, and MMP1. Thus, the results indicate that inhibition of APE1 endonuclease function is important for viability in MDA-MB-231 and MCF-7 cell cultures, but only induces morphological alteration in MDA-MB-231 cells. Such inhibition also suggests a gene regulation of APE1, mainly in relation to the cytoskeleton and MDA-MB-231 cell migration process.

Keywords: APE1. BER. Microarray. Cytoskeleton.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da via de reparo por excisão de base (BER)..	20
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do gene <i>APEX1</i> .....	22
Figura 3 - Representação esquemática da proteína e funções da APE1.....	23
Figura 4 - Representação dos processos biológicos regulados pela APE1 em células tumorais.....	25
Figura 5 - Viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	42
Figura 6 - Viabilidade celular em culturas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	43
Figura 7 - Taxa de morte celular por apoptose e necrose em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	44
Figura 8 - Representação da expressão dos genes alterados da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876.....	45
Figura 9 - Agrupamento do KEGG dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876...	48
Figura 10 - Agrupamento do <i>Reactome</i> dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	50
Figura 11 - Agrupamento do <i>geneontology Cellular component</i> dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	52
Figura 12 - Fotografias representativas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	53
Figura 13 - Fotografias representativas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	54
Figura 14 - Fotografia da imunofluorescência do citoesqueleto de actina da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876.....	55
Figura 15 - Taxa de migração de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	57

Figura 16 - Taxa de invasão de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	59
Figura 17 - Nível de transcritos <i>APEX1</i> em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	60
Figura 18 - Nível de transcritos <i>MMP1</i> , <i>PAK2</i> e <i>ARHGEF12</i> em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	62
Figura 19 - Níveis de transcritos <i>MMP1</i> , <i>PAK2</i> e <i>ARHGEF12</i> em células MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	63
Figura 20 - <i>Heatmap</i> da correlação entre a assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão dos genes alterados da via de regulação de citoesqueleto de actina.....	65
Figura 21 - Níveis de expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo de acordo com subtipos tumorais.....	68
Figura 22 - <i>Heatmap</i> da correlação entre a assinatura gênica da atividade da APE1 e a expressão de <i>MMP1</i> .....	70
Figura 23 - Níveis de expressão de <i>MMP1 in silico</i> de acordo com subtipos tumorais.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tabela da sequência e ciclagem dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR.....	38
Tabela 2 –	Tabela dos 20 genes com maior alteração na expressão do microarranjo após tratamento com CRT0044876 da célula MDA-MB-231.....	46
Tabela 3 –	Coeficientes de correlação entre a expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto e assinatura gênica da atividade de APE1.....	66
Tabela 4 –	Coeficientes de correlação entre <i>MMP1</i> e assinatura gênica da atividade da APE1.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i>
8 - oxoG	<i>8-Oxoguanine</i>
ACTN $\beta$	<i>Beta-actin</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APE1	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1</i>
APEX1	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
DEPC	<i>Dietilpirocarbonato</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
dNTPs	<i>Desoxirribonucleotídeos fosfatados</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ER/PR	<i>Estrogen Receptor/ Progesterone Receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i>
KCl	<i>Cloreto de potássio</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>Fosfato monopotássico</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
NaCl	<i>Cloreto de sódio</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>Fosfato dissódico</i>
NF $\kappa$ -B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Rac1	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac1)</i>
Rho-GTPase	<i>Small G proteins Ras-like GTPases</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-qPCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
TM	Temperatura de <i>Melt</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$	micrômetro
nm	nanômetro
mmHg	milímetro de mercúrio
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
Kb	quilobase
<	menor que
>	maior que
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
O <sub>2</sub>	oxigênio
mg/mL	miligrama por mililitro
%	por cento
U/mL	unidade por mililitro
h	hora
$\pm$	mais ou menos
°C	graus Celsius
cm <sup>2</sup>	centímetro ao quadrado
bp	<i>base pair</i>
min	minuto
$\mu\text{M}$	micromolar
mM	milimolar
$\mu\text{g}$	micrograma
mA	miliAmpère
rpm	rotação por minuto
$\mu\text{L}$	microlitro
mL	mililitro
$\Delta\text{G}$	delta G (variação de energia livre de Gibbs)

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
1.1	<b>Danos no DNA e Via de Reparo por Excisão de Base</b> .....	17
1.2	<b>AP-endonuclease 1 (APE1)</b> .....	21
1.3	<b>AP-endonuclease 1 e câncer</b> .....	24
1.3.1	<u>AP-endonuclease 1 e câncer de mama</u> .....	26
1.3.2	<u>AP-endonuclease 1 como possível alvo terapêutico</u> .....	27
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
2.1	<b>Objetivos gerais</b> .....	29
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	29
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	<b>Cultura de células</b> .....	30
3.2	<b>Viabilidade Celular</b> .....	31
3.3	<b>Avaliação de indução de apoptose e necrose</b> .....	32
3.4	<b>Ensaio de fluorescência</b> .....	32
3.5	<b>Extração de RNA</b> .....	33
3.6	<b>Tratamento com DNase</b> .....	34
3.7	<b>Síntese de cDNA</b> .....	34
3.8	<b>Microarranjo de DNA</b> .....	35
3.9	<b>Ensaio de migração – <i>Wound Healing</i></b> .....	36
3.10	<b>Ensaio de invasão em <i>transwell</i></b> .....	36
3.11	<b>Elaboração de <i>primers</i></b> .....	37
3.12	<b>PCR em tempo real (RT-qPCR)</b> .....	38
3.13	<b><i>The Cancer Genome Atlas (TCGA)</i></b> .....	39
3.14	<b>Análise estatística</b> .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	<b>Avaliação da viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876</b> .....	41
4.2	<b>Avaliação do tipo de morte celular em culturas de MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876</b> .....	43
4.3	<b>Avaliação da expressão gênica por microarranjo em células MDA-MB-231</b>	

	<b>incubadas com CRT0044876.....</b>	
4.4	<b>Avaliação da morfologia de células MDA-MB-231 e CRF-7 incubadas com CRT0044876.....</b>	<b>44</b>
4.5	<b>Avaliação da migração celular de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....</b>	<b>53</b>
4.6	<b>Avaliação da invasão de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....</b>	<b>56</b>
4.7	<b>Avaliação dos níveis de transcrito de APEX1 em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....</b>	<b>58</b>
4.8	<b>Validação do microarranjo de células MDA-MB-231 por RT-qPCR.....</b>	<b>60</b>
4.9	<b>Análise in silico da correlação da assinatura de atividade de APE1 com a expressão dos genes de regulação de citoesqueleto de actina.....</b>	<b>61</b>
4.10	<b>Análise in silico dos subtipos tumorais e expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo.....</b>	<b>64</b>
4.11	<b>Análise in silico da correlação da expressão de MMP1 com assinatura de APE1.....</b>	<b>66</b>
4.12	<b>Análise in silico dos subtipos tumorais e expressão de MMP1.....</b>	<b>69</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE A- Expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo de acordo com subtipos tumorais.....</b>	<b>80</b>
		<b>91</b>

## INTRODUÇÃO

A via de reparo por excisão de base (BER) é responsável por restaurar danos no DNA causados por oxidação, alquilação e quebras de fita simples. O mau funcionamento da via de BER está diretamente associado ao surgimento e progressão de alguns tumores, sobretudo o câncer de mama (MADHUSUDAN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2016). A via de BER é composta por pelo menos 11 glicosilases, responsáveis pelo reconhecimento dos danos, e aproximadamente, 20 outras enzimas responsáveis pela remoção da base danificada e reposição de uma base sem danos (WU *et al.*, 2012; KROKAN e BJORAS, 2013). A compreensão dos componentes da via de BER e sua relação com o câncer de mama pode desvendar novas características da doença, assim contribuir para descoberta de tratamentos mais eficazes.

AP-endonuclease 1 (APE1, do inglês: *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*), uma das enzimas cruciais para o perfeito funcionamento da via de BER, é responsável pela remoção da base danificada, gerando um sítio abásico. Além disso, APE1 também é requerida para ativar, em resposta ao metabolismo redox, múltiplos fatores transcricionais como NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , p53, AP-1. APE1 também atua como co-reguladora transcricional de diversos genes (WOO *et al.*, 2014; GUERREIRO *et al.*, 2016; ROYCHOUDHURY *et al.*, 2016). Woo e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento nos níveis de expressão da APE1 no núcleo de células de câncer de mama está relacionado à maior atividade no reparo do DNA. Porém, ainda não são conhecidos os efeitos da inibição do domínio C-terminal, relacionado à função endonuclease da APE1, para a função biológica da célula tumoral. Tão menos ainda se sabe sobre outras alterações moleculares decorrentes da inibição do domínio de reparo da APE1 em células de câncer de mama.

O desenvolvimento do câncer de mama está relacionado a diversos fatores, dentre os quais destacam-se os relacionados a hábitos alimentares, fatores ambientais, reprodutivos e genéticos (KUMAR *et al.*, 2016). Alguns estudos demonstram que o funcionamento incorreto dos mecanismos de reparo também está associado ao surgimento e desenvolvimento do câncer de mama (WU *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016; LIRUSSI *et al.*, 2016). Além disso, as vias de reparo de DNA também estão associadas aos mecanismos de resistência aos tratamentos contra o câncer (WU *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2016; CREE e

CHARLTON, 2017). É, portanto, de suma importância a compreensão das atividades dos componentes responsáveis pelo funcionamento das vias de reparo, principalmente quando este apresenta funções diretamente relacionadas às atividades celulares, como é o caso da proteína APE1, que atua em diversos mecanismos que contribuem para promoção e progressão tumoral (ABBOTTS e MADHUSUDAN, 2010).

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Danos no DNA e Via de Reparo por Excisão de Base

O processo de formação do câncer é caracterizado por três etapas principais: iniciação, promoção e progressão. Iniciação ocorre quando surge uma mutação carcinogênica e o dano no DNA se torna estável. Na segunda fase, a promoção, ocorre a expansão seletiva de clones da célula mutada, gerando uma pré-neoplasia. E, no último estágio, ocorre a formação da neoplasia, transformando o tumor benigno em câncer e é caracterizado por vascularização, invasão e metástase, este estágio é chamado progressão.

Apesar dos diversos fatores associados ao surgimento do câncer, inúmeros estudos apontam a influência de ROS nas células tumorais, especialmente quando se refere ao tumor de mama (COOKE *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2006; GURER-ORHAN *et al.*, 2018). Os radicais livres e espécies oxidativas podem se comportar como produtos tóxicos dentro da célula e, o acúmulo destas espécies pode resultar em danos em macromoléculas, tais como DNA, lipídios e proteínas. No entanto, quando há uma resistência por parte das células ao excesso de ROS, em níveis não tóxicos, estes atuam como sinalizadores celulares, isto é, inibidores ou indutores de transcrição, agindo como reguladores de ciclo celular, proliferação, fatores de crescimento, vias de sinais de tradução e replicação, resultando em acúmulo de erros e instabilidade genômica, que são acontecimentos sabidamente envolvidos no surgimento e promoção da carcinogênese (BOURGEAIS; GOUILLEUX-GRUART; GOUILLEUX, 2013).

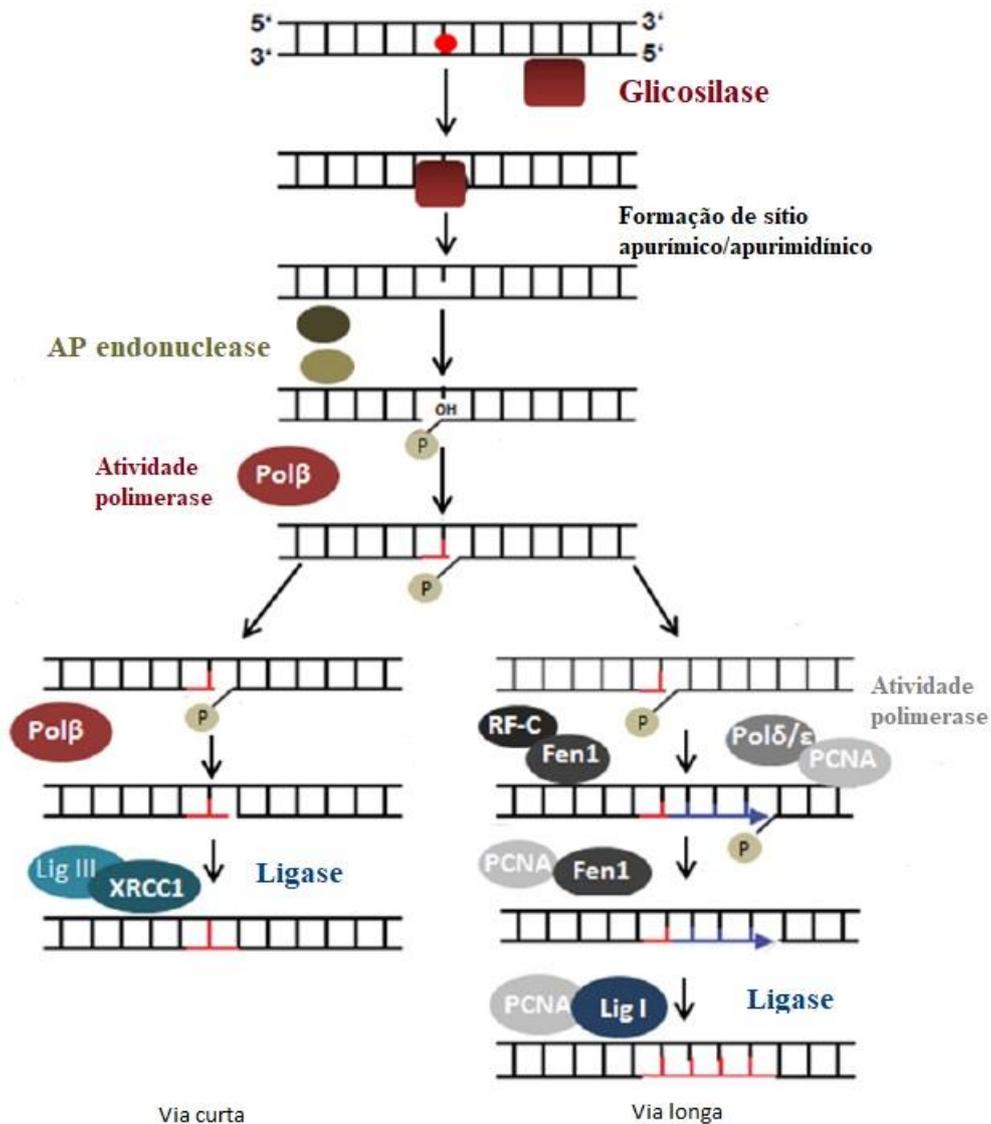
Apesar das ROS fazerem parte da fisiologia celular, em situações de desequilíbrio da homeostase, causado por fatores endógenos ou exógenos, é necessário ativar mecanismos celulares para o controle dos níveis de ROS. Desta forma, para proteção das células de agentes externos e internos que geram ROS, existe uma rede complexa de vias de sinalização dedicada à detecção de tal desequilíbrio, que inclui inúmeras respostas antioxidantes (GUERREIRO *et al.*, 2013). Entretanto, nem sempre é possível evitar que o dano acometa a molécula de DNA, onde é armazenada toda informação gênica, por essa razão, a presença de

vias de reparo de DNA é imprescindível para manter a integridade dessas informações (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004; BERRA e MENCK, 2006).

O dano mais comum causado por oxidação do DNA ocorre em guaninas, formando a 8-oxoG (do inglês: *8-Oxoguanine*). Esse tipo de dano é reparado pela via de reparo por excisão de base (BER, acrônimo em inglês para *Base Excision repair*). Em situações como esta, a via de BER age no reconhecimento e remoção de bases nitrogenadas alteradas no DNA, através da ação de glicosilases, DNA nucleases, polimerases e ligases (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004). Além disso, a via de BER é responsável por reparar danos causados por hidrólises espontâneas ou modificações causadas por agentes alquilantes (FAN e WILSON III, 2005).

Sendo assim, para reparo do DNA pela via de BER, inicialmente as glicosilases reconhecem a base que danificada e, após reconhecimento, a base é retirada através da hidrólise da ligação N-glicosídica, formando um sítio abásico (sítio AP), que pode ser apurínico ou apurimidínico, dependendo do tipo de base danificada, purina ou pirimidina, respectivamente. No caso de um dano causado por oxidação da guanina, a principal DNA glicosilase envolvida nesse processo de reconhecimento é a 8-oxiguanina glicosilase (OGG1) (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004; ABDULSALAM; THOWFEIK; MERINO, 2016). Em seguida, endonucleases são recrutadas para reconhecimento e incisão na fita danificada de DNA, sendo a endonuclease AP-endonuclease 1 (APE1) a responsável por esse processo na maioria das vezes em que ele ocorre (KROKAN e BJØRÅS, 2013). Após esta etapa de geração de um grupo 3'-hidroxil, que é um substrato para atuação de DNA-polimerase, dois caminhos podem ser seguidos (figura 1): nos casos onde apenas uma base foi danificada, o caminho curto é acionado, e para situações onde duas ou mais bases foram danificadas, o caminho longo será o percorrido. No caminho curto, as enzimas PCNA, FEN1, entre outras, são as polimerases responsáveis pela substituição da base danificada. Por outro lado, no caminho longo, POL $\beta$  e XRCC1 são as enzimas que atuam nesse processo. Por fim, após a ação das polimerases, as ligases agem na finalização do reparo. Neste momento, LIG1 age principalmente no caminho curto, enquanto LIG3 atua no caminho longo.

Figura 1 - Representação esquemática da via de reparo por excisão de base (BER)



Legenda: Imagem ilustrativa da via de reparo por excisão de base. O dano é reconhecido por uma glicosilase. Os sítios AP são modificados pela ação de uma AP endonuclease, na maioria das vezes APE1, que é seguida pela ação de uma polimerase, sendo que a via pode seguir o caminho curto ou o caminho longo. Nos casos de mais de um dano oxidativo, a via de reparo preferencialmente segue o caminho longo. Adaptação: (LEYNS E GONZALEZ, 2012).

O aumento do número de dados científicos que relacionam a deficiência de enzimas da via de BER e o aumento no risco de desenvolvimento de doenças, como o câncer, demonstra a importância do estudo de seus mecanismos de atuação. Al-tassan *et al.* (2002) mostraram, por exemplo, que a deficiência na atividade da glicosilase MYH tem sido relacionada com o aparecimento de pólipos intestinais e câncer colo retal. Em outro caso, há indicação da relação entre a redução nos níveis da OGG1 e o aumento no risco de desenvolvimento de câncer de

pulmão (RUSSO *et al.*, 2004). Foi descrito ainda, que a deficiência de uracil-DNA glicosilase (UNG) contribui na síndrome linfoproliferativa e no processo de infiltração linfocitário, aumentando a incidência de linfoma não Hodgkin de células B com perfis mais agressivos (NILSEN *et al.*, 2003). Narayan e colaboradores (2016) mostraram que uma associação entre APC e FEN1, que possuem atividade supressora quando atuando de forma individual, aumentam as chances do desenvolvimento de câncer de mama em pacientes que apresentaram polimorfismos e/ou mutações nesses genes. Além disso, alguns trabalhos investigaram as diferentes atuações da enzima PCNA e sua associação ao prognóstico ruim no câncer, especialmente o câncer de mama e a sua possível utilização como alvo de tratamentos terapêuticos, visto que esta proteína está relacionada a diferentes funções celulares, especialmente ao processo de proliferação (WANG, 2014; JURÍKOVÁ, *et al.*, 2016; CARDANO; TRIBIOLI; PROSPERI, 2020).

Desta forma, visto que o processo de ativação da via de BER é feito predominantemente pela proteína APE1, e existem ainda poucos dados que relacionem diretamente esta endonuclease e com o câncer de mama, sobretudo em relação a resistência e malignidade tumoral, faz-se necessário estudos que buscam entender melhor essa relação.

## 1.2 AP-endonuclease 1 (APE1)

A proteína APE1/Ref-1 (acrônimo em inglês para *apurinic endonuclease 1/redox factor-1*), referida neste trabalho como APE1, é codificada a partir do gene *APEX1* (acrônimo em inglês para *apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1*) cuja localização no cromossomo 14 na porção 14q11.2 (figura 2) . O gene é constituído por 5 éxons com aproximadamente 2542 pares de base, onde 958 pertencem a região codificante. *APEX1* apresenta 4 isoformas que são idênticas entre si, modificando apenas o tamanho do éxon 1 do primeiro transcrito em relação aos demais, e o sítio de *splice* doador para este éxon, além disso, todos codificam a mesma proteína que possui 318 aminoácidos e dois domínios, C-terminal e N-terminal (figura 3A), responsáveis por diferentes funções da proteína (ABBOTTS e MADHUSUDAN, 2010; NCBI, 2021).

Figura 2 – Representação esquemática do gene *APEXI*

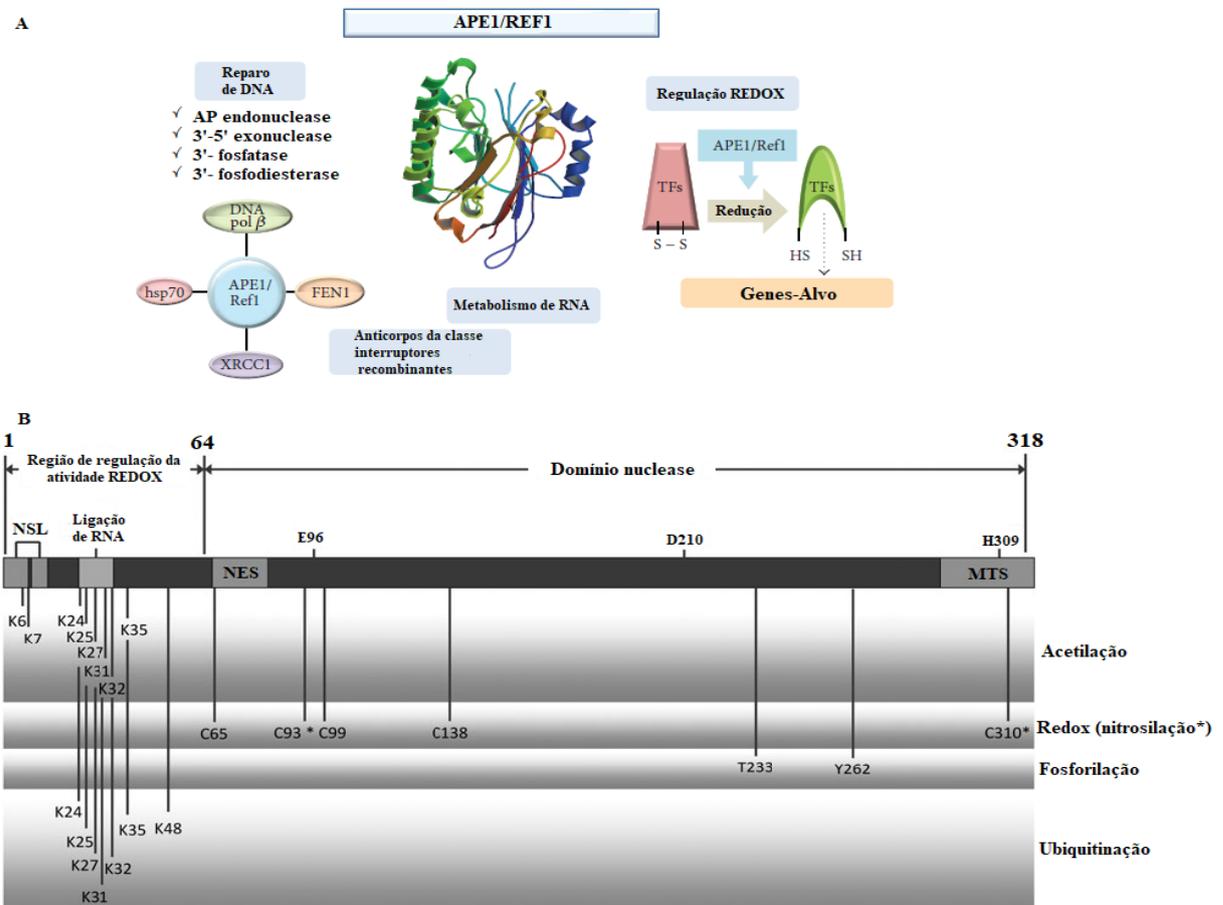


Legenda: Esquematização da estrutura gênica do *APEXI* humano. Os retângulos em branco representam os íntrons; os retângulos em cinza representam os éxons codificantes e os retângulos em preto representam os éxons não codificantes. ATG: início da região promotora. Imagem adaptada de Dyrkheeva e colaboradores (2016).

A proteína APE1 é um ortólogo mamífero da Xth encontrada em *Escherichia coli* (exonuclease III) e é a principal AP-endonuclease em células eucariontes que atua como chave mestre na via de reparo por excisão de base (nos mamíferos atua em 95 % dos casos de reparo), na resposta a todos os danos causados, sejam estes danos causados por oxidação, alquilação, sítios abásicos ou desaminação. Desta forma ela é tem importante participação na estabilidade genômica (TELL *et al.*, 2009, LAEV *et al.*, 2017). Esta função enzimática ocorre no domínio C-terminal da proteína (figura 3B) (SHA *et al.*, 2017).

Além da função da proteína APE1 como enzima de reparo da via de BER, ela também é descrita como capaz de atuar na regulação transcricional de expressão gênica através da atividade que ocorre no domínio N-terminal (figura 3B) (TELL *et al.*, 2009; LI e WILSON III, 2014). Este papel de regulador é obtido através da ativação, a partir de sua atividade redox, junto a diferentes fatores de transcrição como Egr-1 (acrônimo em inglês para *early growth response protein-1*), NF- $\kappa$ B (acrônimo em inglês para *nuclear factor- $\kappa$ B*), HIF-1 $\alpha$  (acrônimo em inglês para *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ), p53, AP-1 (acrônimo em inglês para *activator protein-1*) entre outros (TELL *et al.*, 2009; LI e WILSON III, 2014; LAEV *et al.*, 2017). Durante a atividade da porção redox, a proteína é ativada pela cisteína 65 (Cys65), que permite a formação de pontes dissulfeto no processo de redução. Estas pontes resultam na mudança conformacional da proteína APE1, facilitando a sua ligação com o fator de transcrição. Após esse processo, o complexo se liga ao gene alvo dando início à transcrição (figura A) (PARK *et al.*, 2014; LAEV *et al.*, 2017).

Figura 3 – Representação esquemática da proteína e funções de APE1



Legenda: Imagem ilustrativa dos domínios de APE1. O domínio N-terminal é responsável pela atividade redox e ativação de fatores de transcrição e o domínio C-terminal apresenta atividade AP-endonuclease, que é responsável pelo papel de APE1 na via de reparo de BER (A). Além dos sítios principais (E96, D210 e H309), outros sítios se mostram ativos na porção endonuclease e na porção redox há um sítio onde ocorre a ligação de RNA (B). NSL: sinal de localização nuclear, NES: sinal de exportação nuclear, MTS: sequência de direcionamento mitocondrial. Imagens adaptadas de: (PARK *et al.*, 2014; Li e Wilson, 2014).

No reparo do DNA, a APE1 tem função de endonuclease, pois é capaz de clivar a ligação fosfodiéster da fita de DNA no terminal 5' do sítio AP (apurínico/apirimidínico), gerando uma incisão no DNA com terminações 3' hidroxil e 5' dRP terminal. A cinética da incisão da fita nos sítios AP pela APE1 é de que a catálise rápida, seguida pela liberação lenta do produto, isto porque a rapidez da resposta é vital para estabilidade genômica dada a prevalência de sítios AP no genoma, enquanto o passo lento de catálise tem sido proposto a fim de evitar intermediários citotóxicos durante o processamento do dano e facilitar ligação entre as demais enzimas da via e o substrato (WHITAKER e FREUDENTHAL, 2018). O domínio C-terminal da APE1 se liga diretamente a fita de DNA e desliza em busca de sítios

AP, para assim cumprir sua função endonuclease. Apesar de não estar relacionada a atividade de reparo, a porção N-terminal também se liga à fita do DNA durante o processo de reparo, promovendo maior estabilidade na ligação entre enzima e substrato (LI e WILSON III, 2014; WHITAKER e FREUDENTHAL, 2018). Alguns estudos também mostram outras atividades relacionadas a sua ação endonuclease que, além de atuar classicamente na via de reparo por excisão de nucleotídeo, tem se mostrado envolvida no controle de qualidade do processamento de RNA, em especial durante o ciclo celular, como regulador no processo de *turnover* de mRNA *MYC*, e na ligação de DNA e RNA (PARK *et al.*, 2014; WHITAKER e FREUDENTHAL, 2018).

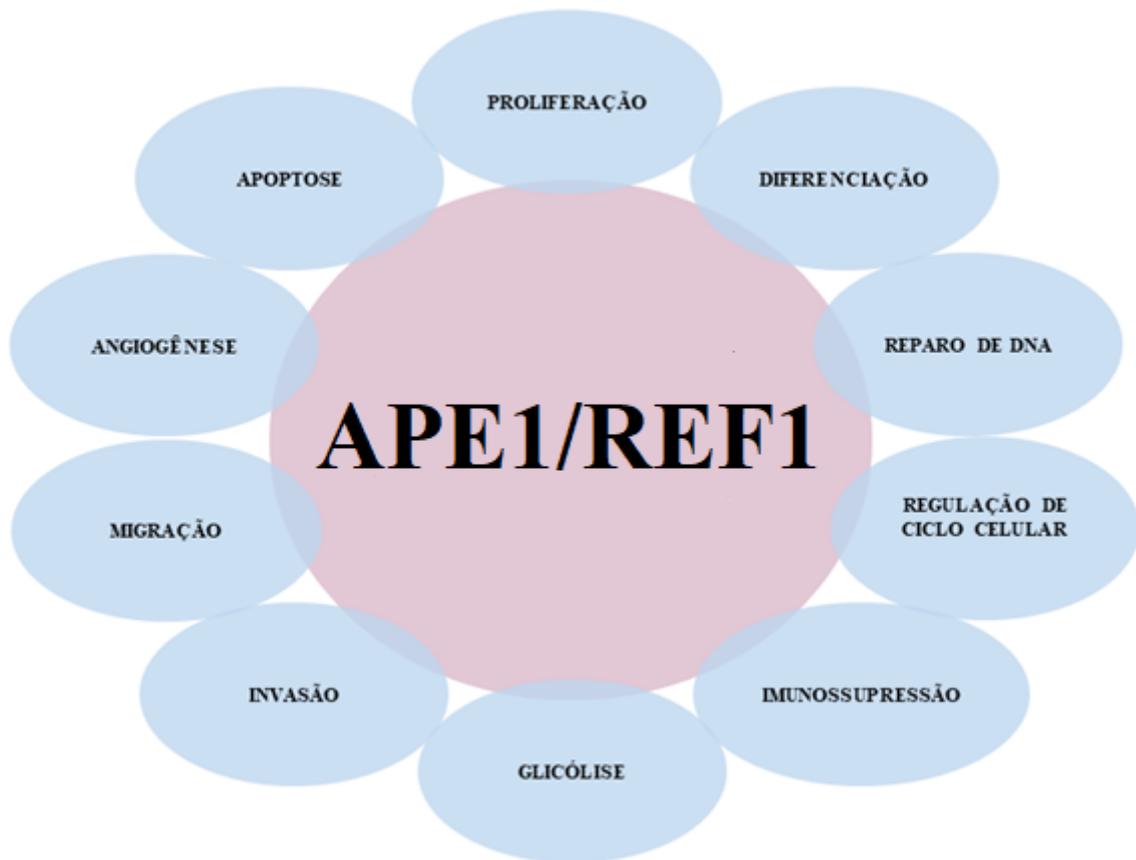
Estudos demonstraram a importância de APE1 no processo de carcinogênese e malignidade tumoral, devido as suas múltiplas funções.

### 1.3 AP-endonuclease 1 e câncer

APE1 é relacionada a diversas doenças que vão desde distúrbios metabólicos até doenças degenerativas e, ultimamente são persistentes as evidências da relação entre APE1 e câncer.

APE1 aparece no processo de tumorigênese como um dos responsáveis por promover crescimento, migração e sobrevivência das células tumorais, além de processos inflamatórios e angiogênese, através do papel que desempenha como co-reguladora na ativação de fatores de transcrição relacionados a estes eventos (figura 4) (SHAH *et al.*, 2017; CASTON *et al.*, 2021). Além disso, APE1 está superexpressa em diversos tipos de tumores, como tumor de pulmão, de cólon, de ovário, leucemias e tumor de mama, contribuindo para sua agressividade e ineficácia de tratamentos (PARK *et al.*, 2014; SHAH *et al.*, 2017).

Figura 4 – Representação dos processos biológicos regulados pela APE1 em células tumorais



Legenda: Imagem ilustrativa dos processos regulados pela APE1 como ativadora de fatores transcricionais em células tumorais. APE1/REF1 (acrônimo em inglês para *apurinic endonuclease 1/redox factor-1*). Fonte da imagem: autor.

A localização da APE1 é predominantemente nuclear, porém, em células tumorais, APE1 tem sido observada tanto no núcleo quanto no citoplasma destas células, em respostas aos altos níveis de ROS citoplasmático e/ou mitocondrial, sendo essa localização nos dois compartimentos celulares relacionada à agressividade e mau prognóstico do tumor (ABBOTTS e MADHUSUDAN, 2010).

Sengupta e colaboradores (2016) comprovaram que um aumento da acetilação da APE1 influencia no reparo de danos no DNA, promovendo proliferação e evitando apoptose de células tumorais. APE1 apresenta papel importante ao coordenar a via de BER, e sua ausência é incompatível com a sobrevivência das células em mamíferos. Entretanto, têm sido observadas variações polimórficas da APE1, que têm sido associadas a um estresse gênico, o que contribui para estabilização da proliferação de células tumorais e , de forma negativa,

para promoção do tumor (LIRUSSI *et al.*, 2016). Hong e colaboradores (2016) demonstraram que há expressão da APE1 em altos níveis em amostras de adenocarcinoma de esôfago, o que contribuiria para a sobrevivência das células tumorais.

### 1.3.1 AP-endonuclease 1 e câncer de mama

O câncer de mama é considerado o mais frequente em mulheres e a principal causa de morte relacionada a câncer (GURER-ORHAN *et al.*, 2018; GUERREIRO *et al.*, 2017). Altas taxas de mortalidade estão relacionadas a um perfil extremamente heterogêneo e desenvolvimento de metástase (GUERREIRO *et al.*, 2017).

Atualmente, os tumores de mama são classificados de acordo com os resultados dos ensaios histopatológicos, considerando presença ou ausência de receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), sendo classificados como: luminal A (onde expressa ER e/ou PR, mas não expressa HER2), luminal B (expressa ER e/ou PR e HER2), HER2 (não expressa ER e PR) e triplo negativo (não expressa ER, PR e HER2). Esta classificação é importante, considerando que os diferentes tipos respondem de forma diferente aos tratamentos, portanto contribui para escolha do tratamento e análise prognóstica (PEROU *et al.*, 2000). Abdel-Fatah e colaboradores (2014) mostraram uma correlação entre tumores que expressam estrogênio e os níveis de proteínas da via de BER, incluindo APE1, sendo que esta correlação está diretamente vinculada a agressividade do tumor. Da mesma maneira, Woo e colaboradores (2014) mostraram, que há uma correlação clínico-patológica entre o nível de expressão APE1 elevado e os níveis do tumor em relação a classificação hormonal (ER e PR). Em tumores que, segundo a classificação molecular são considerados luminal A, foi observada uma maior frequência de pacientes com APE1 elevado, enquanto em relação ao tipo *basal-like* é mais frequente pacientes com nível diminuído de APE1.

Em câncer de mama, APE1 encontra-se superexpresso e está relacionada com a malignidade do tumor (COSKUN *et al.*, 2015). Além disso, polimorfismos em APE1 são associados á susceptibilidade de pacientes apresentarem um maior risco de desenvolverem a doença (ALMUTAIRI *et al.*, 2015; MASHAYEKHI *et al.*, 2015; HSIEH *et al.*, 2017). Estes

polimorfismos, no entanto, apenas se mostram como indicadores de risco do aparecimento e malignidade quando relacionados a outros fatores, pois de forma independentes não podem ser considerados bons sinalizadores (HUNG *et al.*, 2005; GU *et al.*, 2009; ALEKSEEVA *et al.*, 2019). Whitaker e colaboradores (2020) propuseram que polimorfismos em *APEX1* causados por SNPs (acrônimo em inglês para *single nucleotide polymorphisms*) devem ser observados com atenção, pois estes, quando associados à influência ambiental ou interações proteína-proteína, poderiam interferir de forma direta no aparecimento de doenças como câncer. Além disso, um outro estudo mostrou-se como APE1 participa do controle do processamento do RNA sendo relacionado ao metabolismo celular tumoral (ANTONIALI *et al.*, 2017). Diante disso, os estudos sugerem que a APE1 seja uma proteína multifuncional e envolvida com a agressividade tumoral.

### 1.3.2 AP-endonuclease 1 como possível alvo terapêutico

Devido à importância demonstrada da APE1 e sua interação nas células de câncer de mama, muitos autores discutem a relevância de tal proteína como alvo terapêutico para o tratamento do câncer ou possível marcador de diagnóstico ou prognóstico da doença (PARK *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2016; SHAH *et al.*, 2017). Muitos estudos mostraram que a inibição da porção redox da proteína APE1 contribui para sensibilização de diferentes células tumorais a tratamentos já aplicados na clínica atualmente, portanto, seria um alvo terapêutico em potencial (FISHEL e KELLEY, 2007; FISHEL *et al.*, 2011; CESARATTO *et al.*, 2013; GUERREIRO *et al.*, 2017). Já para a inibição da sua atividade de reparo de DNA, os dados são escassos. Além disso, Franchi e colaboradores (2020) mostraram que a associação da porção redox de APE1 com terapia fotodinâmica apresentou resultados promissores.

Choi e colaboradores (2016) discutiram a possibilidade da APE1 ser utilizada como biomarcador para alguns cânceres, como câncer de bexiga e de pulmão, visto que podem ser detectados em secreções como soro e urina. Ali e colegas (2016) reuniram evidências de trabalhos que mostraram que três inibidores de APE1, CRT0044876, ATA e APX3330, são letais para células deficientes de ATM e BRCA1.

Apesar dos avanços quanto aos desenvolvimentos de novos tratamentos do câncer, as modalidades já estabelecidas não perderão seu valor, principalmente onde os pacientes precisam de tratamentos mais acessíveis. Embora haja atualmente bastante foco em tratamentos modernos e direcionados, como a imunoterapia e outras terapias mais personalizadas, a quimioterapia e radioterapia são as terapias que continuaram por um bom período sendo as mais amplamente utilizadas. Mesmo que essas formas de tratamento tenham seus efeitos colaterais tal como danos no DNA ou, de forma sistêmica, danos à órgãos (BAPAT; FISHEL; KELLEY, 2009). Desta forma, há ainda um crescente interesse sobre as bases moleculares de todos os tipos de cânceres, incluindo o câncer de mama. Em resposta à demanda para compreensão e acesso de forma globalizada aos dados genômicos e biológicos sobre amostras neoplásicas, o NIH (acônimo em inglês para *National Institute of Health*) lançou em 2005 o TCGA (acônimo em inglês para *The Cancer Genome Atlas*). O TCGA é um banco de dados que cataloga e reúne a maior quantidade possível de informações genômicas, transcriptômicas e proteômicas de diversos tipos de câncer, e conta com a contribuição de vários grupos de pesquisadores que realizam as coletas e análises das amostras, para garantir a qualidade e informações acrescentadas ao banco de dados. Essas informações estão disponíveis de forma gratuita para pesquisadores de todo o mundo e podem ser utilizadas para diversas análises de bioinformática que vão ajudar a entender melhor o funcionamento dos diferentes tumores, e contribuir para proposta de novos e mais adequados métodos de diagnóstico e terapêuticos (TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015).

Portanto, este trabalho buscou investigar a importância do papel de APE1, enquanto endonuclease, em modelos celulares de câncer de mama.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Investigar efeitos da inibição da APE1 na proliferação, agressividade e regulação gênica em culturas de células de câncer de mama.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o potencial citotóxico do inibidor de APE1, CRT0044876, através de ensaio de viabilidade celular;
- b) Investigar alterações transcriptômicas globais, por ensaio de microarranjo de DNA, mediante inibição da APE1 em células de câncer de mama;
- c) Avaliar o potencial agressivo de células de câncer de mama incubadas com inibidor da APE1, CRT0044876, através de ensaio de migração celular (*wound healing*);
- d) Avaliar a expressão de genes das principais vias alteradas em células de câncer de mama incubadas com inibidor da APE1, CRT0044876, a partir de dados obtidos em ensaio de microarranjo do DNA, através de PCR em tempo real;
- e) Avaliar possíveis correlações entre a expressão de genes das principais vias alteradas, a partir de dados obtidos em ensaio de microarranjo do DNA, e assinatura gênica da atividade da APE1 através do TCGA.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de células

Para esse trabalho, foram utilizadas como modelos experimentais, culturas de células de linhagens de células de câncer de mama humana, MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) e MCF-7 (HTB22, ATCC). Células da linhagem MDA-MB-231 apresentam o perfil de um subtipo de câncer de mama que exibe ausência de marcadores moleculares, ER, PR e HER2, ou seja, triplo negativa, tem um elevado potencial de metástase e é pouco diferenciada, assemelhando-se a um dos subtipos de câncer de mama mais agressivo e de pior prognóstico (DIAS *et al.*, 2017). Enquanto as células da linhagem MCF-7 são ER+ e PR+, com fenótipo bem diferenciado e se assemelha ao subtipo de câncer de mama luminal A, que possui melhor prognóstico (SUBIK *et al.*, 2010).

As células foram cultivadas em atmosfera de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, em presença de meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Thermo Fisher, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, USA), 2 mM de Glutamina, 100 mg/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen, USA).

A semeadura de novas culturas celulares foi realizada quando as culturas anteriores atingiram a confluência de 80%, aproximadamente, e foi utilizada a proporção de 1:4 com auxílio de tripsina EDTA 1× (Invitrogen, USA), sendo semeadas em outras garrafas para manutenção das culturas. Para os experimentos, as células foram semeadas em uma densidade de 10.000 células/cm<sup>2</sup> e, após 24 h, os ensaios experimentais foram realizados. Neste caso, antes da semeadura das células, o número de células foi estimado por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer com auxílio do azul de tripan a 0,4%. Este corante penetra e não é expelido pelas células não viáveis, deixando-as azuis, permitindo identificar e diferenciar das células viáveis que são proficientes na extrusão do corante. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas garrafas de cultura e placas de 96 poços.

Para armazenamento das células, foram realizados protocolos de congelamento para manutenção de estoques em 90% SFB/10% Dimetilsulfóxido (DMSO). As preparações foram resfriadas gradativamente, seguindo protocolo de 16 h a -20 °C, em seguida para -70 °C pelo período mínimo de 24 h até o máximo de 1 mês e, por fim, as células foram armazenadas a -

196 °C em nitrogênio líquido. Para o descongelamento e reposição da cultura, as células foram retiradas do freezer -70 °C e incubadas a 37 °C. Após total descongelamento, as células foram lavadas com 5 mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, em português, Tampão Fosfato-Salino; NaCl; 80 g/L, KCl; 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 11,4 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 g/L) 1× e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20 % de SFB até a primeira semeadura. Após esse período, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 como descrito acima.

### 3.2 Viabilidade Celular

O ensaio de WST-1 consiste em um método colorimétrico baseado na capacidade de células converterem o sal Tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl) -2-(4-nitrophenyl) -2H-5-tetrazolio] -1,3-benzene disulphonate) em corante Formazan. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial succinato-tetrazolium redutase e somente ocorre em células viáveis. Com isso, através de variações na coloração do meio contendo WST-1, é possível inferir a proporção de células viáveis comparando as diferentes condições de tratamento. Para os ensaios de WST-1, as células foram semeadas em 150 µL de meio de cultivo, em placas de 96 poços a uma densidade de  $7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> e tratadas com diversas concentrações de CRT0044876, citadas adiante. Após o período do tratamento, foram adicionados 3 µL de WST-1 em cada poço e, em seguida, as placas foram mantidas durante 2 h a 37 °C em estufa umidificada contendo 5 % CO<sub>2</sub>. A quantificação das variações colorimétricas foi realizada em um leitor de Elisa (Polaris EE, Celler, Brasil) utilizando o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. Neste ensaio 150 µL de meio de cultivo com células e 3 µL de WST-1 foram utilizados como controle negativo para os tratamentos. Como padronização de “branco de reação” para leitura no leitor de Elisa foram utilizados 150 µL de meio de cultivo sem células e 3 µL de WST-1. A porcentagem de células viáveis, após os períodos de tratamentos, foi determinada pela razão entre a absorbância obtida das culturas tratadas e a absorbância das culturas não tratadas.

Para analisar o potencial citotóxico do CRT0044876, as células foram incubadas na presença deste agente químico nas concentrações de 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM e 1500 µM até a avaliação da viabilidade no tempo total de 6 h. As concentrações e período de incubação foram definidos de acordo com resultados obtidos previamente, durante o período

do mestrado, através da adaptação dos efeitos descritos por Madhusudan e colaboradores (2005). A porcentagem máxima de DMSO em cultura não ultrapassou 1%.

### 3.3 Avaliação de indução de apoptose e necrose

A externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática é um dos primeiros eventos que ocorre na superfície de uma célula em processo de apoptose ou de necrose, sendo que esta perda de assimetria do fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento por proteínas dependente de íons cálcio, como a Anexina V (BOERSMA *et al.*, 2005; GALLUZI *et al.*, 2012).

Para detecção de apoptose e necrose foi utilizado o Kit de detecção de apoptose FITC Anexina V/7-AAD (BioLegend, USA). Para este ensaio, as células previamente cultivadas e tratadas, conforme descrito previamente, em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> foram tripsinizadas e lavadas em PBS 1×. Após lavagem, as células foram passadas numa peneira e contadas. Foram transferidas 10<sup>5</sup> células para tubo FACS (acrônimo em inglês para *Fluorescence-activated cell sorting*) e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado celular foi adicionado 100 µL de tampão de ligação e em seguida acrescentados 2 µL de FITC Anexina V e 2 µL de 7-AAD. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min protegidas da luz, e posteriormente foi adicionado mais 400 µL de tampão de ligação e realizado a aquisição de cerca de 10000 eventos em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Para análise dos dados foi utilizado o software CellQuest (BD Biosciences, USA).

### 3.4 Ensaio de fluorescência

As modificações no citoesqueleto celular em resposta a tratamento com CRT0044876 foram avaliadas através da análise, por fluorescência, dos filamentos de actina polimerizada. A estratégia empregada para coloração da actina-F foi o uso da toxina faloidina-TRITC, uma falotoxina presente em cogumelos da espécie *Amanita phalloides* que se liga especificamente às actinas-F.

As células foram semeadas em lamínulas de vidro, sob condições estéreis em placas de 24 poços (uma lamínula por poço). As células foram semeadas numa quantidade de  $10^4$  células 1 mL de meio específico visando obter uma densidade média de 40 a 60% de células ao término do experimento. As células foram tratadas com CRT 0044876 e, após 6 h de incubação, o meio com CRT foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1× a 37 °C para remoção de resíduos de SFB e células mortas. Em seguida foram adicionados 500 µL de paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma-Aldrich, USA) por poço para a fixação das células. Após 30 min, o PFA foi removido, os poços foram preenchidos com PBS 1× e a placa foi mantida a 4-8 °C por 18 h, aproximadamente. As lamínulas foram retiradas dos poços com o auxílio de pinças, lavadas duas vezes com PBS 1× e incubadas por 5 min em Triton 0,1% em PBS 1×, em seguida, lavadas duas vezes com PBS 1× e incubadas por 1 h em câmara úmida na presença de 20 µL de faloidina-TRITC (50 ng/ml), e reconstituída em Metanol P.A. Após esse procedimento, a lamínula foi lavada três vezes com PBS 1× e foi acrescentado o fluoróforo marcador de ácidos nucleicos DAPI (cloridrato de 4',6- diamindino-2-fenilindol; 10 µM, Vector Laboratories, USA).

Após a incubação, as lamínulas foram novamente lavadas duas vezes com PBS 1×, montadas sobre 30 µL de glicerol-PPD (p- fenilenodiamina, Sigma-Aldrich, USA) sobre lâminas de vidro e seladas com esmalte transparente. As análises microscópicas das lâminas foram realizadas no Departamento de Histologia e Embriologia da UERJ, no microscópio de fluorescência (Microscope Axio Observer.A1, Zeiss-Vision, Alemanha).

### **3.5 Extração de RNA**

Para realização de PCR em tempo real, após o período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total com auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen, USA). Para extração de RNA, as células foram centrifugadas (1500 rpm, 5 min, 25 °C), o precipitado celular foi homogeneizado em 1 mL de TRIzol, seguindo com adição de 200 µL de clorofórmio. Os lisados celulares foram centrifugados (12000 g por 15 min a 4 °C), a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5 mL e os RNAs foram precipitados com a adição de 500 µL de isopropanol 100%. Após 24 h a -20 °C, as preparações foram

submetidas à centrifugação (12000 g, 30 min, 4 °C), sobrenadante foi descartado, os precipitados foram reconstituídos em etanol a 80 % e centrifugados (5 min, 12000 g, 4 °C). O sobrenadante foi descartado, as preparações foram mantidas à temperatura ambiente por 5 min para total evaporação do etanol e, posteriormente, reconstituídas em solução aquosa de dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich, USA) a 0,1%. A quantificação de RNA nas preparações foi realizada através de espectrofotometria com auxílio do equipamento Nanodrop 1000 (NanoDrop, USA). As soluções de RNA total foram armazenadas a -70 °C até a sua utilização.

### 3.6 Tratamento com DNase

Após a extração do RNA total, as preparações foram incubadas com DNase para remoção de resquícios de moléculas de DNA indevidamente obtidas da extração de RNA. Para tal, foi utilizada a DNase amplification grade I (Invitrogen, USA). Para tal, cerca de 2 µg de RNA total foram incubados com 1 U de DNase e 1× de Tampão DNase 10× em um volume total de 9 µL, por 15 min a 25 °C. A reação foi inativada adicionando 1 µL de EDTA a 25 mM e incubado a 65 °C por 10 min.

### 3.7 Síntese de cDNA

Para avaliação dos níveis de mRNA, RNA total foi convertido em *Complementary DNA* (cDNA, em português, DNA complementar) com auxílio do SCRIPT cDNA synthesis kit (Promega, USA). Brevemente, à reação do RNA tratado com DNase foram adicionados 4 µL de tampão 5× First-Strand, 1 µL de OligodT (500 µg/mL), 1 µL *Deoxynucleotide Triphosphates* (dNTP, em português, Desoxirribonucleotídeos Trifosfato) Mix (10 mM), 1 µL de Script Enzima RT. A síntese de cDNA foi realizada através de incubação das preparações por 50 min a 42 °C e posterior inativação da enzima a 70 °C por 15 min. As reações de síntese de cDNA foram realizadas em termociclador.

### 3.8 Microarranjo de DNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit *WT Expression Kit* (Ambion®, Life Technologies™, USA), conforme recomendação do fabricante (Affymetrix, Gene Chip Expression Analysis Technical Manual - Affymetrix Inc., USA). Cerca de 200 ng de RNA total de 3 experimentos independentes foram convertidos em cDNA dupla-fita utilizando o oligonucleotídeo iniciador T7-Oligo (dT). Seguindo para a síntese do cRNA (RNA complementar) biotinizado, o volume total do cDNA sintetizado através reação para a transcrição *in vitro*, incubando a preparação por 16 h a 40 °C no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, USA). Em seguida, o cRNA foi purificado utilizando *beads* magnéticas (Nucleic Acid Binding Beads, Ambion®, Life Technologies™, USA). Após síntese do cRNA, estes foram hibridizados contra o chip de microarranjo *Human Exon 1.0 ST* (Affymetrix Inc., USA). Todo o processo de lavagem e coloração foi feito na estação fluídica GeneChip® Fluidics Station 450 de acordo com a recomendação do fabricante. Para a leitura óptica dos chips *Human Exon 1.0 ST*, os arranjos de sonda foram lidos em scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix Inc., USA), e a captura das imagens e análise inicial das hibridações foram feitas com o software Affymetrix® Expression Console™ e os arquivos gerados foram salvos em formato \*.cel. Os dados obtidos na aquisição dos sinais de fluorescência presentes nos arquivos \*.cel foram normalizados e sumarizados utilizando o software *Expression Console* (Affymetrix Inc., USA).

Foram comparadas células tratadas com inibidor CRT0044876 na concentração 1000 µM pelo período de 6 h e não tratadas. Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, usando como ponto de corte  $\pm 1,5$  vezes, eles foram agrupados em vias de sinalização, utilizando a ferramenta WebGestalt 2019 (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) (WANG *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2019) e o método GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Os bancos de dados *geneontology Cellular componente*, Reactome (ASHBURNER *et al.*, 2000; CARBON *et al.*, 2009; CARBON *et al.*, 2019) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (OGATA *et al.*, 1999) foram usados na análise de agrupamento dos genes alterados em processos biológicos ou vias de sinalização.

### 3.9 Ensaio de migração celular – *Wound Healing*

A fim de avaliar o efeito da inibição de APE1 na capacidade de migração das células, foi realizado o ensaio de *Wound Healing*. Esse ensaio consiste na remoção de parte da monocamada de células através de um risco realizado com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. Para tal,  $4 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em placas de 6 poços com 2 mL de RPMI 1640 suplementado, em atmosfera 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 %, por 24 h. O SFB dessas culturas celulares foi reduzido a 1 %, para diminuir a proliferação. Após 18 h, aproximadamente, foi feita a remoção longitudinal de parte das células com a ponteira de 200 µL. Em seguida, as células foram lavadas com 2 mL PBS 1× e incubadas em meio de cultivo suplementado com 1% de SFB e foi realizado o tratamento com CRT0044876 na concentração de 250 µM. O espaço aberto foi fotografado, usando uma câmera digital (MOTO G6 Plus, Motorola Mobility, USA) e microscópio óptico invertido INV-100 utilizando ampliação de 100 × (Bel Engineering, Itália), em intervalos de 0 h e 24 h, para os grupos tratados e não tratados. A quantificação da migração celular foi obtida através da redução do espaço aberto em comparação com os seus respectivos controles, por meio do software imageJ, MRI *wound healing toll* ([http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound\\_Healing\\_Tool](http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool)). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes.

### 3.10 Ensaio de invasão em *transwell*

Para avaliar o efeito da inibição de APE1 na capacidade de invasão das células MDA-MB-231, foi utilizado o ensaio de invasão celular em *transwell* com matrigel. Para tal, culturas destas células foram realizadas até que atingissem a densidade de  $4 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup> em placas de 6 poços com 2 mL de RPMI 1640 suplementado, em atmosfera CO<sub>2</sub> a 5 %, a 37 °C, por 24 h. O SFB dessas culturas celulares foi reduzido a 1%, para não influenciar a proliferação e não promover morte. A câmara de *transwell* (Corning, USA), poro de 8.0 µm, foi umedecida com meio RPMI 1640 sem SFB por 1 min, seguido de aplicação de 30 µL de matrigel (Sigma-Aldrich, USA) a 1 mg/mL e incubação a 37 °C por 45 min. Após período de

2 h para gelificação da matrigel, uma suspensão de  $3 \times 10^4$  cel/poço em 200  $\mu$ L de meio RPMI 1640 com 1% de SFB foi adicionada à parte superior da câmara. O fundo do poço foi preenchido com 500  $\mu$ L de RPMI 1640 com 10% de SFB, seguindo com tratamento das células com CRT0044876 na concentração de 250  $\mu$ M. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 24 h. O meio de cultura foi removido, as células foram fixadas com etanol absoluto e coradas com cristal violeta a 0,005 %, ambos por 10 min, seguido de lavagem com água destilada até completa remoção do excesso de corante. As células que não atravessaram o matrigel foram removidas da área superior com uma haste flexível. Após secagem da câmara em temperatura ambiente, as imagens foram adquiridas com o microscópio óptico invertido Olympus IX71 (Tóquio, Japão) utilizando ampliação de 20 $\times$  equipado com fluorescência, e a contagem do número de células que atravessaram para região inferior foi realizada com o uso do software ImageJ (v.1.8.0\_112).

### 3.11 Elaboração de *primers*

As sequências dos genes alvos avaliados foram obtidas por meio da base de dados de genes do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Todas as variantes de transcrito do mesmo gene foram alinhadas a fim de se encontrar regiões comuns entre elas, a partir das quais foram selecionadas as sequências dos *primers*, cuidando para que a região escolhida, quando possível, se localizasse em dois éxons adjacentes diferentes. As sequências selecionadas foram verificadas quanto a determinados parâmetros através da ferramenta OligoAnalyzer 3.1, da seção SciTools, pertencente à plataforma IDT DNA (acrônimo em inglês para *Integrated DNA Technologies*), tais como: tamanho do *primer* (18-24 pares de bases), produto da PCR de 70-150 pares de bases, temperatura do *primer* ou  $T_M$  (temperatura de melt) entre 55 °C-60 °C, temperatura para formação de hairpin inferior a 35 °C e o  $\Delta G > -10$  para a formação de homodímero e heterodímero (BUSTIN, 2000).

Os *primers* também foram analisados quanto à especificidade de ligação à sequência de interesse por meio do algoritmo BLAST (acrônimo em inglês para *Basic Local Alignment Search Tool*) disponível on-line através do endereço eletrônico

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>. Os seguintes *primers* foram utilizados:

Tabela 1 – Sequência e condições de ciclagem dos *primers* utilizados na RT-qPCR

Gene	<i>primer forward</i>	<i>primer reverse</i>	Ciclagem
<i>APEXI</i>	5'- ATACTGGTCAGCTCCTTCGG -3'	5'- GCATAGGCGATGAGGAGCAT -3'	95 °C 15 s - 56 °C 20 s - 72 °C 20 s
<i>MMP1</i>	5'-AATAGTGGCCCAGTGGTTGAA-3'	5' GTCAGATGTGTTTGCTCCCAG-3'	95 °C 20 s - 60 °C 45 s
<i>PAK2</i>	5'-CCAGAAAGTGGGCTCGATT-3'	5'-TCTGTTCCCTTGGCATTGAGTG-3'	95 °C 20 s - 60 °C 45 s
<i>ARHGEF12</i>	5'-GGTGAATGGAACCTCTGGTGACT-3'	5'-CCAGATGCTCCAGGTGAATGA-3'	95 °C 20 s - 60 °C 45 s
<i>ACTNβ</i>	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'	95 °C 20 s - 65 °C 45 s

Legenda: Tabela dos genes selecionados para elaboração dos primers e validação do microarranjo, com as respectivas sequências e ciclagens. *APEXI* (acrônimo em inglês para *apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1*), *MMP1* (acrônimo em inglês para *matrix metalloproteinase-1*), *PAK2* (acrônimo em inglês para *P21 (RAC1) Activated Kinase 2*), *ARHGEF12* (acrônimo em inglês para *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 12*) e *ACTNβ* (acrônimo em inglês para *Actin Beta*).

### 3.12 PCR em tempo real (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi utilizada para avaliar os níveis dos genes selecionados e citados anteriormente e, para a então validação do microarranjo de RNA. Após tratamento da cultura celular com concentração de 1 mM de CRT0044876 por um intervalo de tempo de 6 h, foram realizadas as extrações e as reações de síntese de cDNA foram utilizadas para amplificação por PCR utilizando *Master Mix Sybr Green Master* (Promega). As reações das PCRs foram realizadas em volumes finais de 10 µL contendo 0,5 µM de cada *primer* e foram realizadas no termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen). As análises foram realizadas com auxílio do programa *Rotor-Gene 6000 Series Software* (Qiagen). Os níveis de mRNA dos genes *APEXI*, *MMP1*, *PAK2* e *ARHGEF12* foram normalizados pelos níveis de mRNA do gene *ACTNβ*. As reações foram feitas em triplicata experimental de pelo menos cinco experimentos

independentes, e as quantificações foram determinadas através do cálculo de  $\Delta\Delta Ct$  (LIVAK e SCHITTIGEN, 2001).

### 3.13 The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Para as análises *in silico* dos níveis de mRNA e subtipos tumorais foram utilizados dados públicos de pacientes com câncer de mama, obtidos do TCGA (acrônimo em inglês para *The Cancer Genome Atlas Program*) com coorte BRCA. O TCGA é um projeto que disponibiliza dados de sequenciamento do genoma e bioinformática, sendo composto por diversos tipos de cânceres. A coorte BRCA faz parte do projeto que é composta apenas por amostra de paciente de câncer de mama. Os dados podem ser gerados pelo TCGA *Research Network* (<https://www.cancer.gov/tcga>).

Todas as análises foram feitas na plataforma online do UCSC Xena (GOLDMAN *et al.*, 2020). Essa plataforma permite aos usuários agrupar conjuntos de dados genômicos para correlações entre variáveis genômicas e/ou fenotípicas. Além disso, utilizando os dados de microarranjo disponíveis, é possível organizar os dados de expressão gênica dos pacientes através de assinaturas gênicas. Essas assinaturas são formadas por uma equação onde cada gene contribui de forma positiva ou negativa e o resultado dessa equação indica níveis elevados ou reduzidos de acordo com perfis gênicos relacionados à análise. Ou seja, a coorte dos pacientes é organizada e distribuída desde elevados até baixos níveis de expressão de acordo com o resultado final da equação.

A assinatura de atividade de APE1 utilizada neste trabalho é composta por genes que se correlacionaram com a proteína em pacientes de câncer de mama e os que apresentaram maiores valores de expressão da equação dessa assinatura foram classificados como alta atividade de APE1. A seguinte assinatura foi cedida pelo autor Emiliano Dalla (AYYILDIZ *et al.*, 2020) e é composta por genes regulados positivamente (+) e negativamente (-), desta forma, e a equação gerada foi = + *RPLP1* + *PRPF19* + *TUFM* + *PHB* + *LRRC59* + *AHCY* + *NME1* + *TUBA1B* + *CDK5* + *KPNA2* + *FN1* + *GSTM1* + *RPLP0* + *ILF2* + *TRIM28* + *RAN* + *CCT3* + *MYL6* + *NUDC* + *DDB1* + *ARHGDI1* + *PSMD2* + *EIF4A3* + *CCT2* + *CKAP4* + *SRPRB* + *LGALS1* + *SHMT2* + *FH* + *ATP1A1* + *PHGDH* + *GGH* + *NPM1* + *CCT4* + *RPL7* +

*SET + XRCC5 + RPL4 + RARS + ARCN1 + WDR61 + RAC1 + RHOA + ACTB + RPA1 + PRDX6 + WDR5 + GNB1 + DCTN2 + TXNL1 + EIF3J + NDUFV1 + HARS + ACTR2 + UQCRC2 + COPS4 + APP + PCMT1 + PGD + RTN3 + EPHX1 + PSPH + CNP - SUGT1 - HUS1 - CLIC4 - EIF4A1 - OXCT1.*

### 3.14 Análise estatística

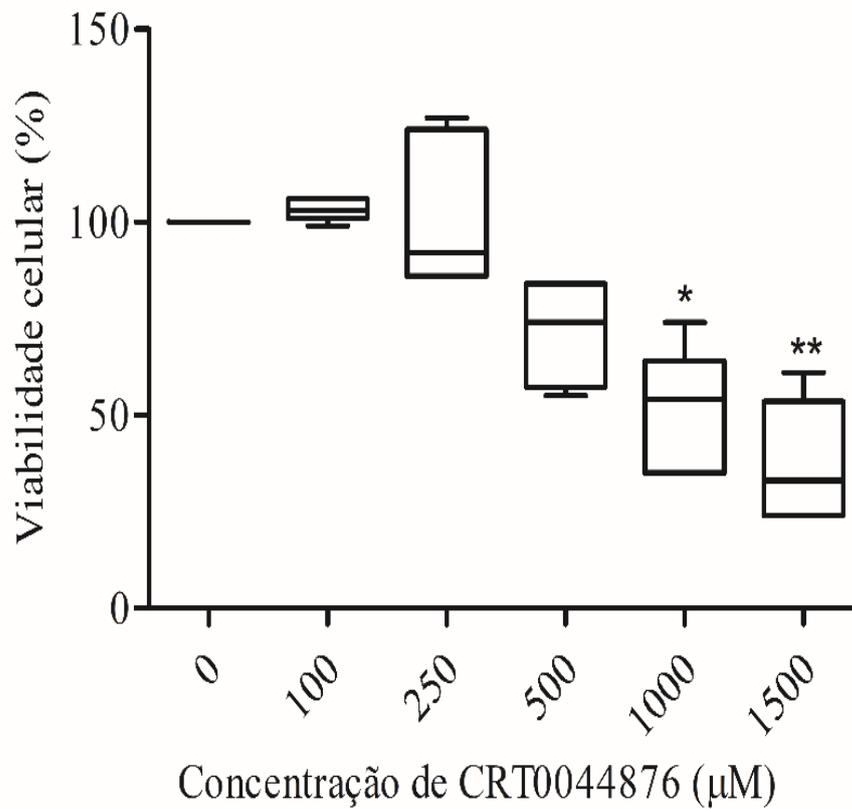
Os dados foram apresentados a partir das médias dos resultados encontrados  $\pm$ erro padrão, no caso de amostras que seguiam distribuição normal, e mediana e quartis para amostras que não apresentavam distribuição normal. Para determinar se um grupo de amostras possuía uma distribuição normal, foi realizado do teste Kolmogorov-Smirnov. Para os experimentos que passaram pelo teste de normalidade as comparações foram realizadas com o t de Student para dois grupos experimentais e ANOVA para comparação de três ou mais grupos experimentais, seguido de pós-teste de Bonferroni. Para experimentos não paramétricos, as análises comparativas entre dois grupos experimentais foram realizadas com o teste de Mann Whitney, e para três ou mais grupos experimentais utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para o valor de  $p < 0,05$ , e nas análises do Webgestalt os valores significativos consideraram o FDR (acrônimo para inglês *false discovery rate*)  $< 0,05$ . Nas análises dos testes de correlação foi considerado o coeficiente de Spearman para comparação das amostras, visto que estas não apresentam uma distribuição normal.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876

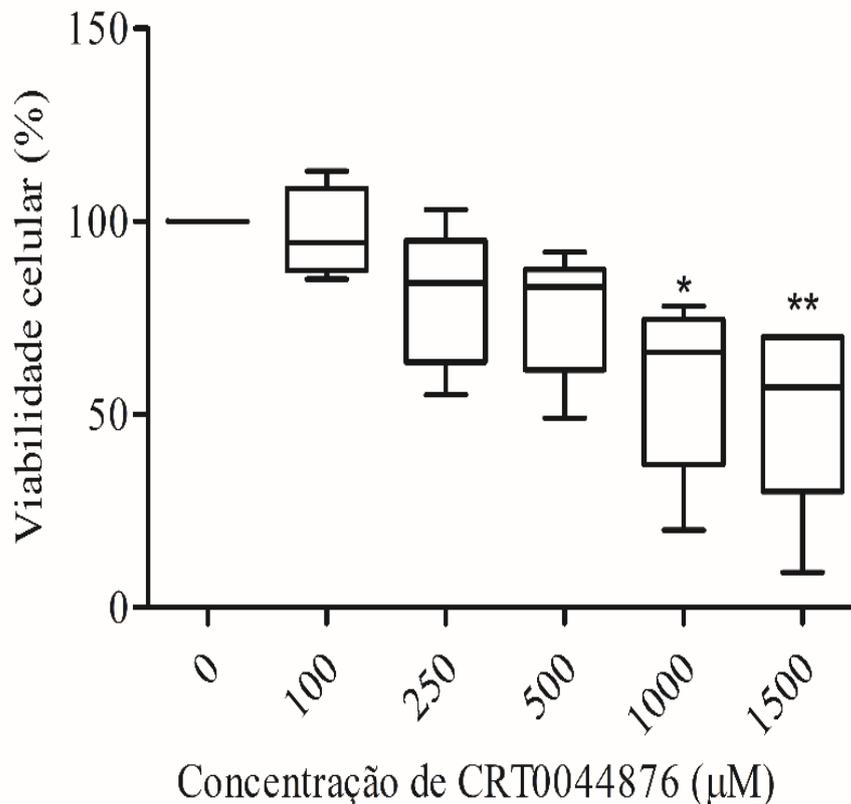
Para avaliar o efeito da inibição da APE1 em células de câncer de mama, as culturas de MDA-MB-231 e MCF-7 foram incubadas com CRT0044876 nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  e 1500  $\mu\text{M}$  pelo período de 6 h. Em culturas de MDA-MB-231 foi observado que as concentrações de 100  $\mu\text{M}$ , 250 e 500  $\mu\text{M}$  não alteraram significativamente ( $p>0,05$ ) a viabilidade celular, (figura 5). Entretanto, nas concentrações de 1000  $\mu\text{M}$  e 1500  $\mu\text{M}$  foram observadas reduções significativas ( $p<0,05$ ) na viabilidade celular de aproximadamente 50 % ( $\pm 5,4$  %) e 60% ( $\pm 6,2$  %), respectivamente (figura 5). Em culturas de células MCF-7 não foram observadas alterações significativas ( $p>0,05$ ) na viabilidade celular nas concentrações 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  de CRT0044876. Entretanto, nas concentrações 1000  $\mu\text{M}$  e 1500  $\mu\text{M}$  foi observado uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da viabilidade de aproximadamente, 25% ( $\pm 5$  %) e 40 % ( $\pm 5$  %), respectivamente (figura 6).

Figura 5 - Viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.



Legenda: Porcentagem de viabilidade celular adquirida através do método WST-1, avaliando cinco condições de tratamento: 100, 250, 500, 1000 e 1500 µM de CRT0044876 na cultura de células MDA-MB-231 após 6 h. O percentual de viabilidade dos controles foi definido como 100%. Os *boxplots* representam as medianas e 1º e 3º quartis de pelo menos quatro experimentos individuais. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Figura 6 - Viabilidade celular em culturas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876.



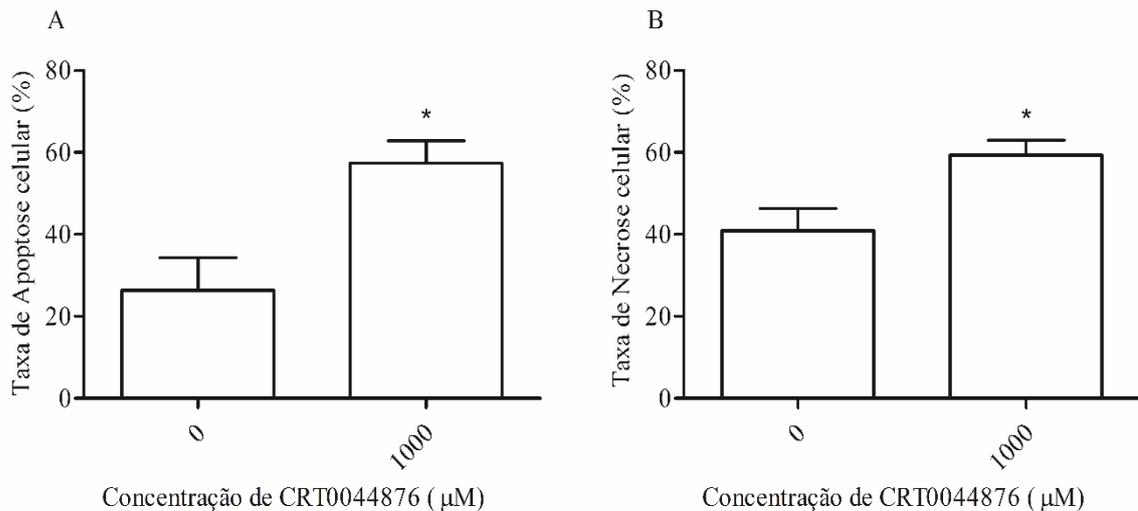
Legenda: Porcentagem de viabilidade celular adquirida através do método WST-1, avaliando cinco condições de tratamento: 100, 250, 500, 1000 e 1500 µM de CRT0044876 na cultura de células MCF-7 após 6 h. O percentual de viabilidade dos controles foi definido como 100%. Os boxplots representam as medianas e 1º e 3º quartis de pelo menos quatro experimentos individuais. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

#### 4.2 Avaliação do tipo de morte celular em culturas de MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876

A partir do ensaio de viabilidade celular, e para avaliar o tipo de morte que foi responsável pela redução da viabilidade celular, foram realizados ensaios de avaliação da indução de apoptose pelo método da Anexina V/7-AAD utilizando a concentração de CRT0044876 que apresentou diferença significativa do ensaio de WST-1. A aquisição do resultado se deu pela avaliação de intensidade de leitura dos marcadores de apoptose e/ou necrose, considerando a dificuldade de identificação de populações específicas para cada condição de morte. Desta forma, as células apresentaram perfil semelhante entre morte por

apoptose (figura 7A) onde pode-se observar uma taxa de aproximadamente 57 % ( $\pm 5,4$  %) de apoptose, e morte por necrose (figura 7B) onde pode-se observar uma taxa de aproximadamente 59 % ( $\pm 3,6$  %) de necrose. O resultado indica que o inibidor CRT0044876 interfere na viabilidade celular através do mecanismo de apoptose e necrose simultaneamente.

Figura 7 – Taxa de morte celular por apoptose e necrose em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876

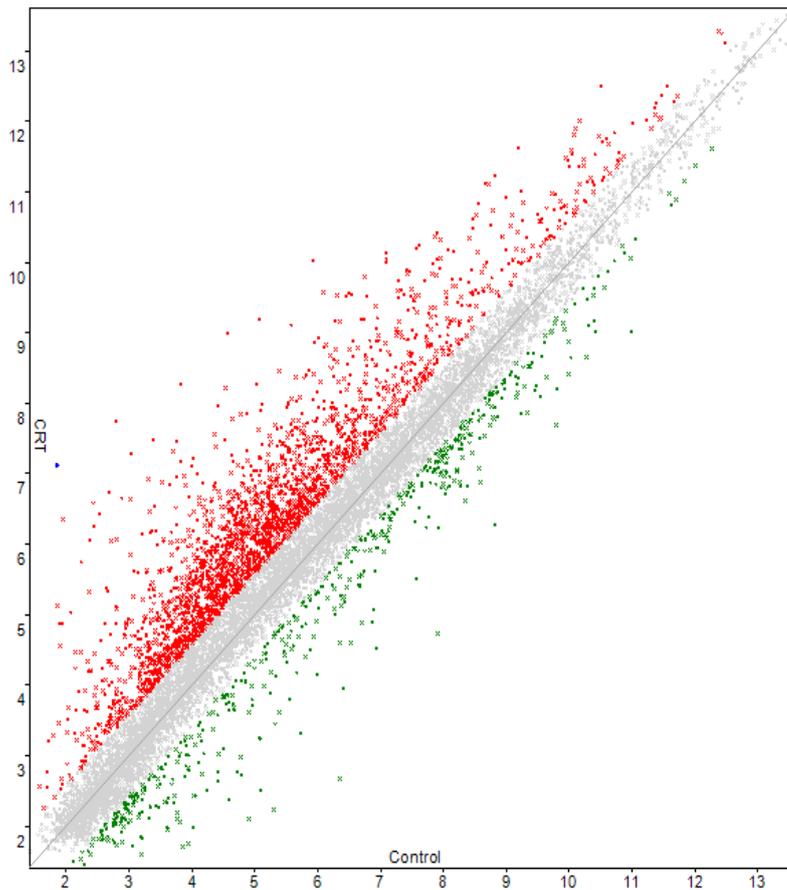


Legenda: Taxas de morte celular em células MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876 na concentração 1000 µM por 6 h. As barras representam as porcentagens de apoptose (A) e necrose (B) ( $\pm$  erro padrão) das células incubadas com CRT0044876. As taxas são representações da porcentagem de células adquiridas com marcadores específicos de apoptose (Anexina V) e de necrose (7-AAD). DMSO: células tratadas com dimetilsulfóxido por 6 h. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle (não incubado com CRT0044876).

#### 4.3 Avaliação da expressão gênica por microarranjo em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876

A análise do transcriptoma após 6 horas de tratamento com o inibidor de APE1, CRT0044876, a uma concentração de 1000 µM apresentou 2399 genes regulados positivamente enquanto 496 genes se apresentaram regulados negativamente (figura 8), sugerindo que a porção endonuclease de APE1 está envolvida, de alguma forma, na expressão gênica. Na Tabela 2 podem ser observados os 20 genes com as maiores alterações, sendo 10 genes mais expressivos e 10 genes menos expressivos.

Figura 8 – Representação da expressão dos genes alterados da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876



Legenda: Representação da expressão dos genes alterados da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu$ M pelo período de 6 h. Os pontos em vermelho representam os genes que tiveram sua expressão elevada, enquanto os pontos verdes correspondem aos genes com expressão diminuída após o período de incubação, comparando em relação ao controle. Os pontos mais afastados do eixo correspondem ao maior *fold change* apresentado.  $p < 0,05$ .

Tabela 2 – Tabela dos 20 genes com maior alteração na expressão do microarranjo após tratamento com CRT0044876 da célula MDA-MB-231

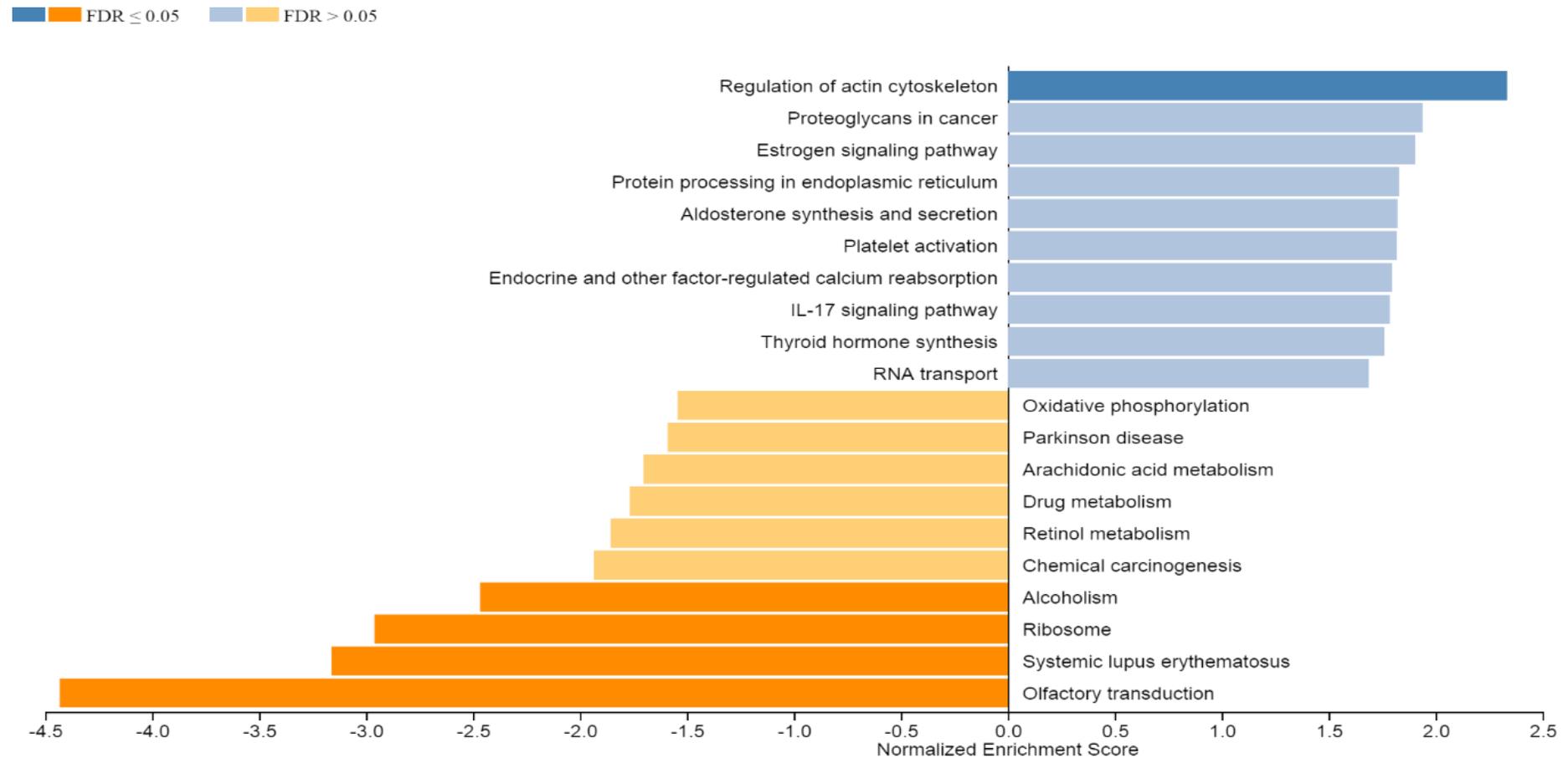
<b>Gene</b>	<b>fold-change</b>
<i>MALAT1</i>	21,67
<i>CPN1</i>	21,06
<i>RLIM</i>	14,93
<i>FAM91A1</i>	14,16
<i>ATF1</i>	12,78
<i>RDX</i>	12,32
<i>GNAQ</i>	12,26
<i>HSP90AA1</i>	11,22
<i>XPOT</i>	10,22
<i>CLTC</i>	9,43
<i>ND6</i>	-4,31
<i>OR56A1</i>	-4,43
<i>ID2B</i>	-4,51
<i>OR10A2</i>	-4,62
<i>CYP2A6</i>	-5,26
<i>LCE4A</i>	-5,44
<i>HES1</i>	-5,82
<i>ANKRD36B</i>	-5,96
<i>MS4A4A</i>	-7,02
<i>OR4N2</i>	-12,91

Legenda: Tabela dos vinte genes com maior alteração na expressão do microarranjo na célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu$ M pelo período de 6 h. *MALAT1* (acrônimo em inglês para *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*), *CPN1* (acrônimo em inglês para *Carboxypeptidase N Subunit 1*), *RLIM* (acrônimo em inglês para *Ring Finger Protein, LIM Domain Interacting*), *FAM91A1* (acrônimo em inglês para *Family With Sequence Similarity 91 Member A1*), *ATF1* (acrônimo em inglês para *Activating Transcription Factor 1*), *RDX* (acrônimo em inglês para *Radixin*), *GNAQ* (acrônimo em inglês para *G Protein Subunit Alpha Q*), *HSP90AA1* (acrônimo em inglês para *Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1*), *XPOT* (acrônimo em inglês para *Exportin For TRNA*), *CLTC* (acrônimo em inglês para *Clathrin Heavy Chain*), *ND6* (acrônimo em inglês para *NADH dehydrogenase subunit 6*), *OR56A1* (acrônimo em inglês para *Olfactory receptor family 56 subfamily A member 1*), *ID2B* (acrônimo em inglês para *Inhibitor of DNA binding 2B*), *OR10A2* (acrônimo em inglês para *Olfactory receptor family 10 subfamily A member 2*), *CYP2A6* (acrônimo em inglês para *Cytochrome P450 family 2 subfamily A member 6*), *LCE4A* (acrônimo em inglês para *Late cornified envelope 4<sup>a</sup>*), *HES1* (acrônimo em inglês para *Hes family bHLH transcription factor 1*), *ANKRD36B* (acrônimo em inglês para *Ankyrin repeat domain 36B*), *MS4A4A* (acrônimo em inglês para *Membrane spanning 4-domains A4A*) e *OR4N2* (acrônimo em inglês para *Olfactory receptor family 4 subfamily N member 2*)

A fim de identificar com quais vias de sinalização celular os genes diferencialmente expressos estavam relacionados, a partir do resultado obtido no microarranjo, foram feitas análises utilizando os bancos de dados KEGG, Reactome e *geneontology Cellular component*, na ferramenta online WebGestalt. Estas análises permitem realizar agrupamento gênico e identificar as vias celulares mais relacionadas com os genes diferencialmente expressos.

A análise do KEGG (figura 9) proporcionou a observação de agrupamentos dos genes regulados positivamente relacionados principalmente à regulação de citoesqueleto. Por outro lado, na análise do agrupamento de genes regulados negativamente, foram encontradas vias relacionadas a alcoolismo, ribossomo, lúpus eritematoso sistêmico e transdução olfativa.

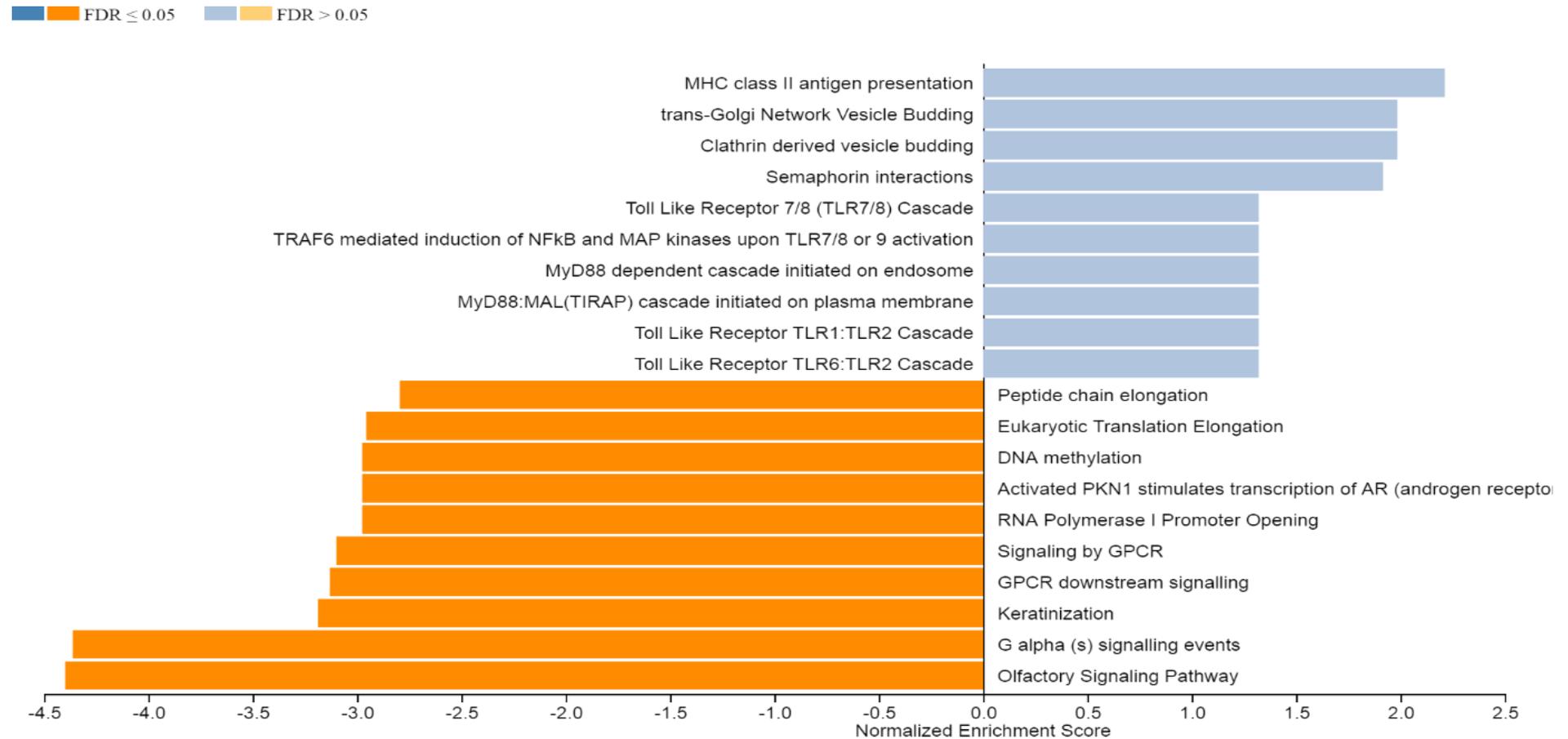
Figura 9 – Agrupamento do KEGG dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876



Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao  $FDR \leq 0,05$ .

A partir da análise utilizando o *Reactome* (figura 10), as vias alteradas a partir do agrupamento de genes superexpressos não mostraram alterações significativas. Para os agrupamentos de genes com expressão diminuída, as vias que apresentaram alterações significativas estão relacionadas com alongamento de cadeia peptídica, alongamento de tradução eucariótica, metilação de DNA, PNK1 ativado que estimula transcrição de receptor andrógeno, abertura do promotor de RNA polimerase 1, sinalização por GPCR, sinalização a jusante de GPCR, queratinização, eventos de sinalização G alfa, via de sinalização olfativa.

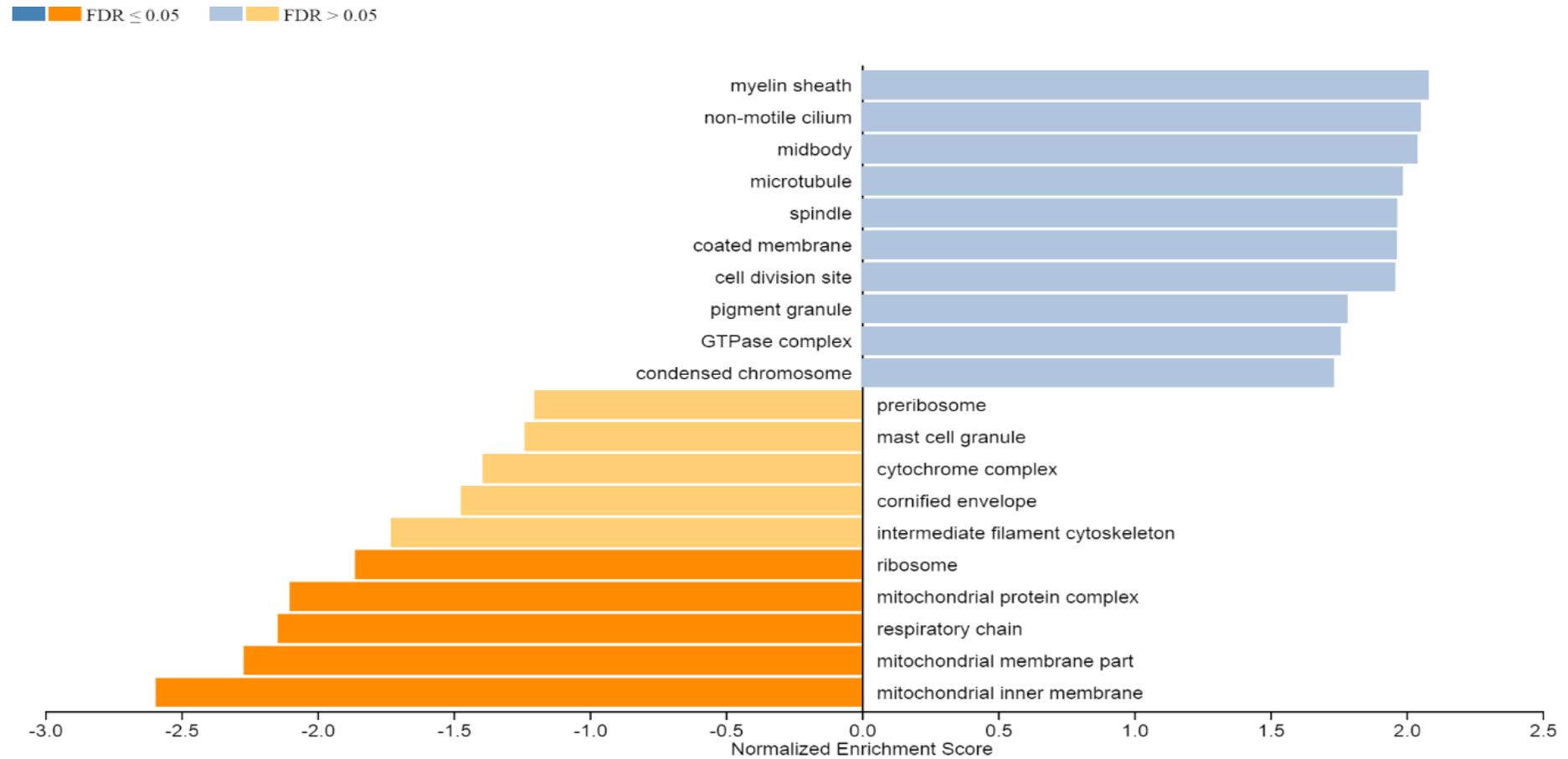
Figura 10 – Agrupamento do *Reactome* dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876



Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao FDR ≤ 0,05.

A análise a partir do *geneontology Cellular component* (figura 11) não apresentou modificações significativas em vias relacionadas aos agrupamentos de genes regulados positivamente. Entretanto, os agrupamentos de genes que tiveram expressão reduzida promoveram variações em vias relacionadas a ribossomo, complexo proteico mitocondrial, cadeia respiratória, parte da membrana mitocondrial e membrana mitocondrial interna.

Figura 11 – Agrupamento do *geneontology Cellular component* dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876

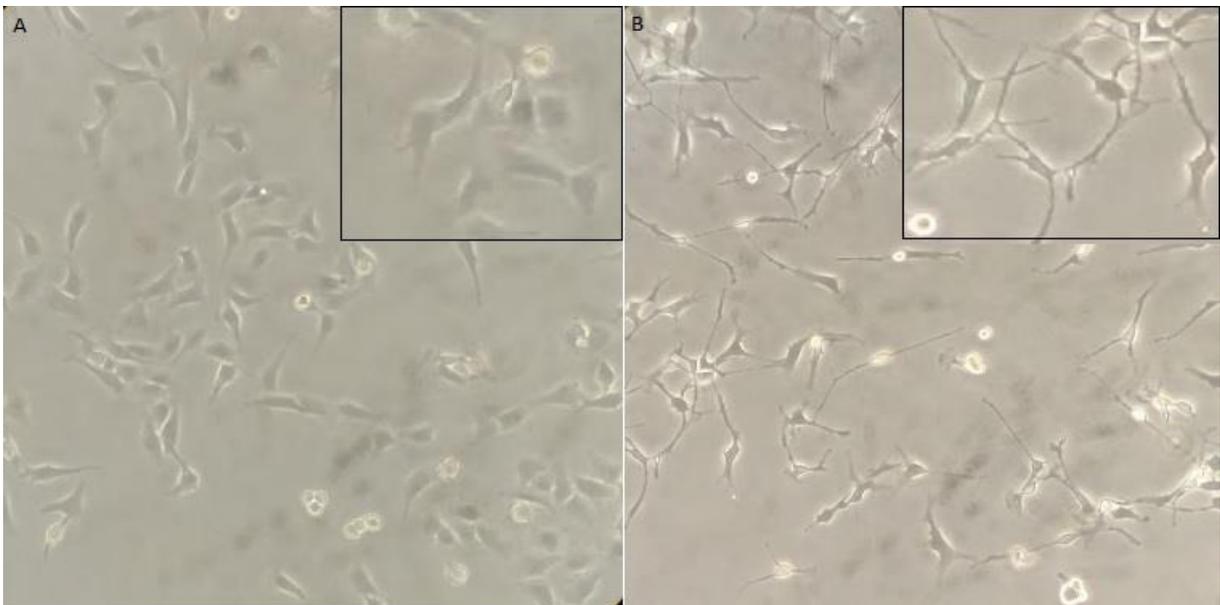


Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao  $FDR \leq 0,05$ .

#### 4.4 Avaliação da morfologia de células MDA-MB-231 e CRF-7 incubadas com CRT0044876

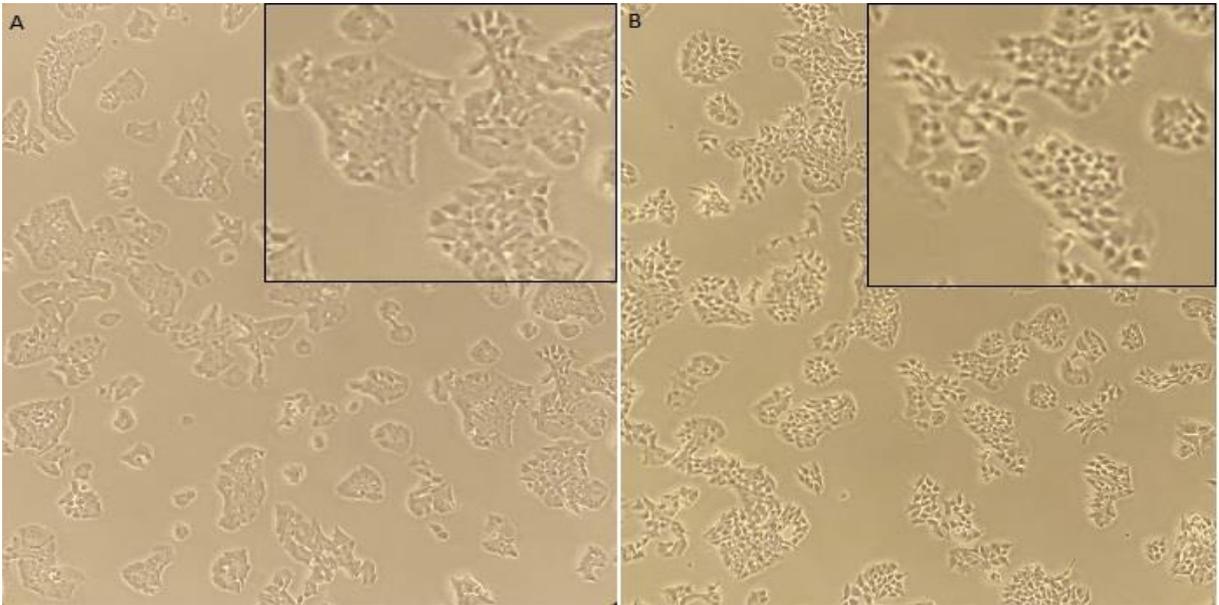
Na figura 12 estão apresentadas fotografias representativas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu$ M após o período de 6 h. A análise das fotografias sugere que após a inibição da função endonuclease de APE1 pode ser observada uma alteração morfológica nas células. Tal alteração, entretanto, não foi observada na em células MCF-7 (figura 13B), indicando ser uma particularidade da MDA-MB-231. Em seguida, na figura 14 pode-se observar fotografias de imunofluorescência da célula MDA-MB-231, após incubação com CRT0044876 nas mesmas condições anteriormente descritas, onde as análises das fotografias permitem observar a presença de fibras de estresse e lamelipódios. O objetivo desta análise era avaliar uma possível relação da alteração morfológica observada com modificações no citoesqueleto de actina da célula.. Desta forma, é possível observar, a partir do conjunto de dados, que o CRT0044876 promove alteração na morfologia da célula MDA-MB-231.

Figura 12– Fotografias representativas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876



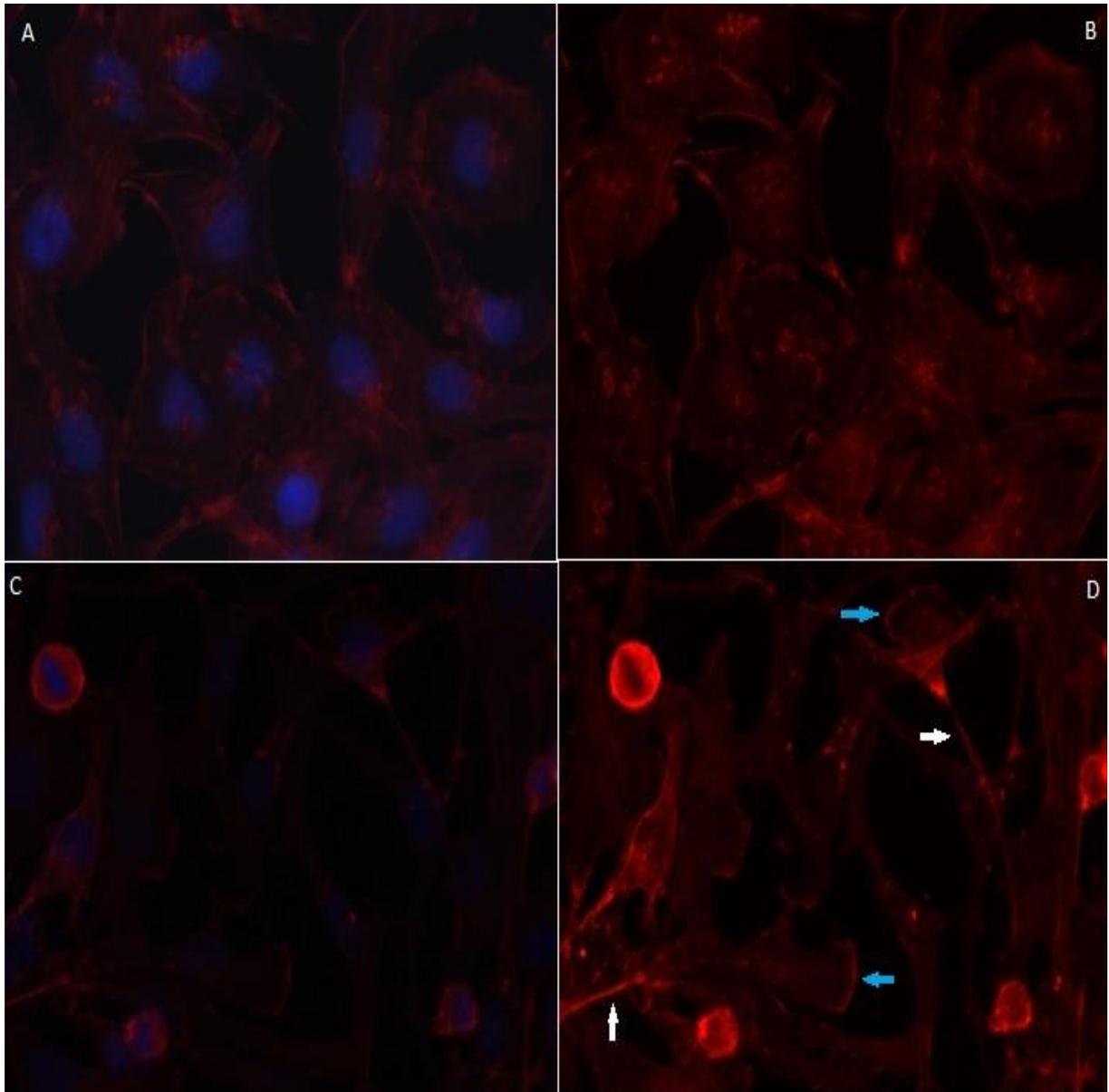
Legenda: Imagem obtida de microscópio invertido (A) da célula MDA-MB-231 incubada com DMSO pelo período de 6 h. (B) da célula MDA-MB-231 incubada com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu$ M pelo período de 6 h. Aumento de 200 $\times$ . DMSO: células tratadas com dimetilsulfóxido.

Figura 13- Fotografias representativas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876



Legenda: Imagem obtida de microscópio invertido (A) da célula MCF-7 incubada com DMSO pelo período de 6 h. (B) da célula MCF-7 incubada com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu$ M pelo período 6 h. Aumento de 200 $\times$ . DMSO: células tratadas com dimetilsulfóxido.

Figura 14- Fotografia da imunofluorescência do citoesqueleto de actina da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876



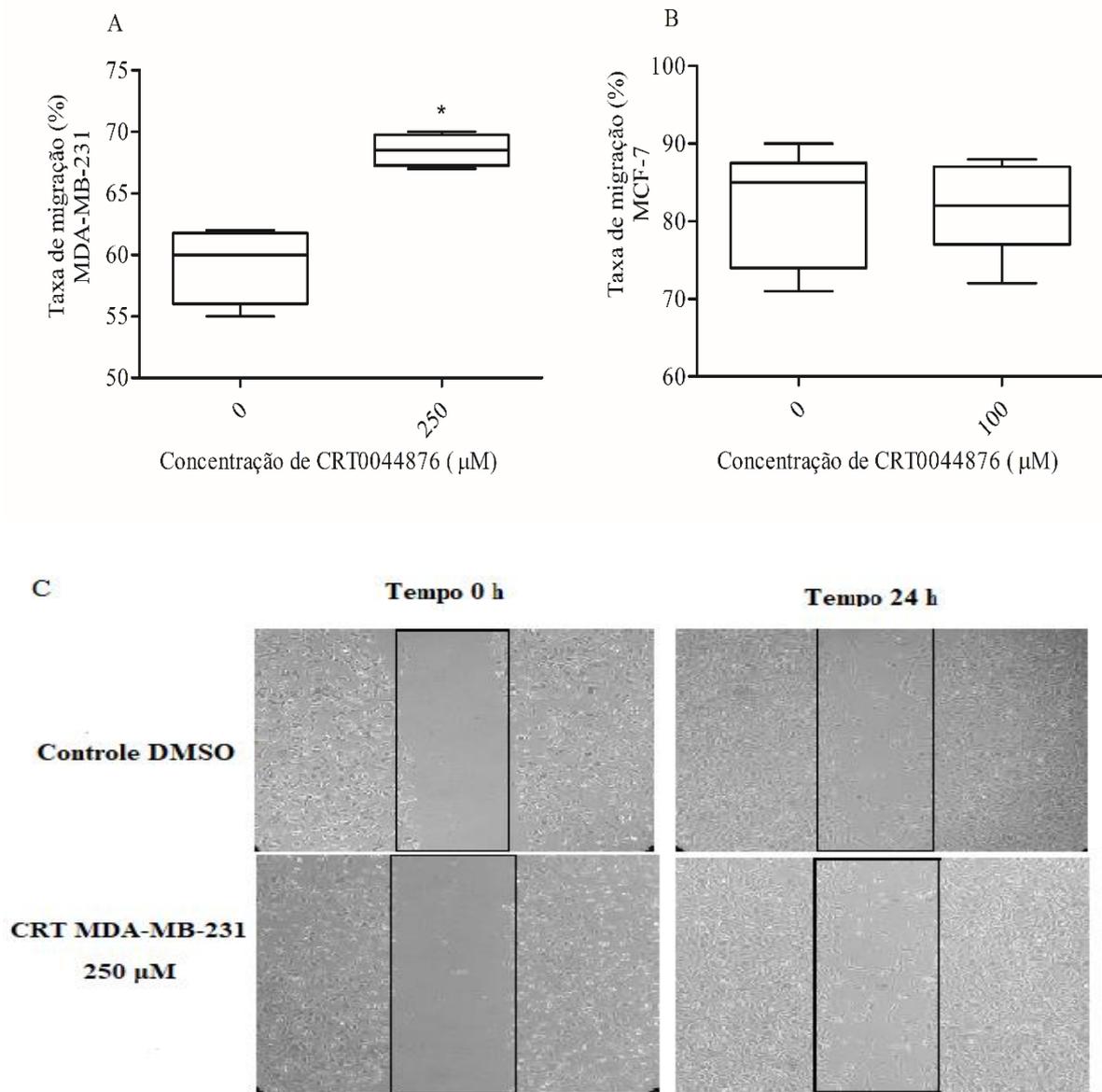
Legenda: Imagem obtida por microscopia de fluorescência, onde as células foram marcadas para actina com faloidina – TRITC (vermelho) e o núcleo foi marcado com DAPI (azul). (A) e (B) Célula MDA-MB-231 tratada com DMSO por 6 h. (C) e (D) Célula MDA-MB-231 incubada com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu$ M pelo período de 6 h. As setas brancas indicam fibras de stress e as setas azuis indicam formação de lamelipódios. DMSO: células tratadas com dimetilsulfóxido.

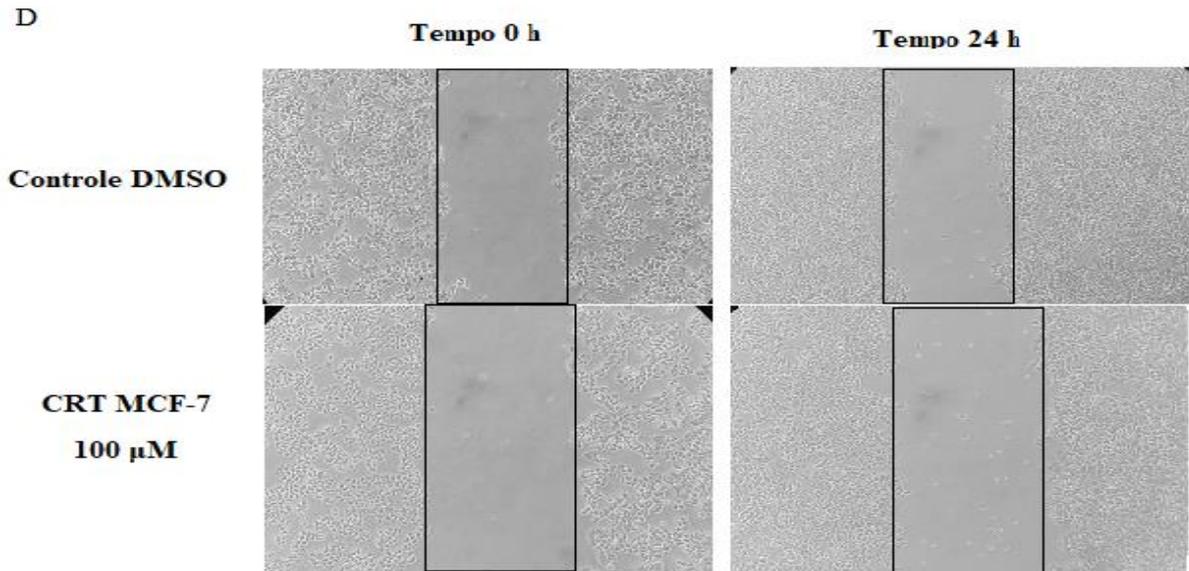
#### 4.5 Avaliação da migração celular de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876

Para avaliar o efeito da inibição da função endonuclease de APE1 na migração celular, as células MDA-MB-231 foram tratadas com CRT0044876 na concentração não letal de 250  $\mu\text{M}$ , e foi analisada a migração celular por ensaio de *wound healing* após 24h, enquanto as células MCF-7 foram tratadas com a dose não letal de 100  $\mu\text{M}$  e sua migração analisada.

Na figura 15A estão apresentados os valores da taxa de migração da célula MDA-MB-231, mostrando uma diferença de aproximadamente 10 % ( $\pm 0,5$  %) entre a taxa média de migração das células que foram incubadas com CRT0044876, em relação ao controle DMSO, bem como fotografias representativas da área percorrida pela célula MDA-MB-231 (figura 15C). Além disso, na figura 15B estão apresentados os valores da taxa de migração das células MCF-7, porém, não foi observado uma diferença significativa entre as taxas de migração das células incubadas com CRT0044876, quando comparadas com o controle DMSO. Na figura 15D é possível observar fotografias representativas que demonstram a mesma área percorrida entre as células MCF-7 que foram incubadas com CRT0044876 e com DMSO.

Figura 15 – Taxa de migração de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876





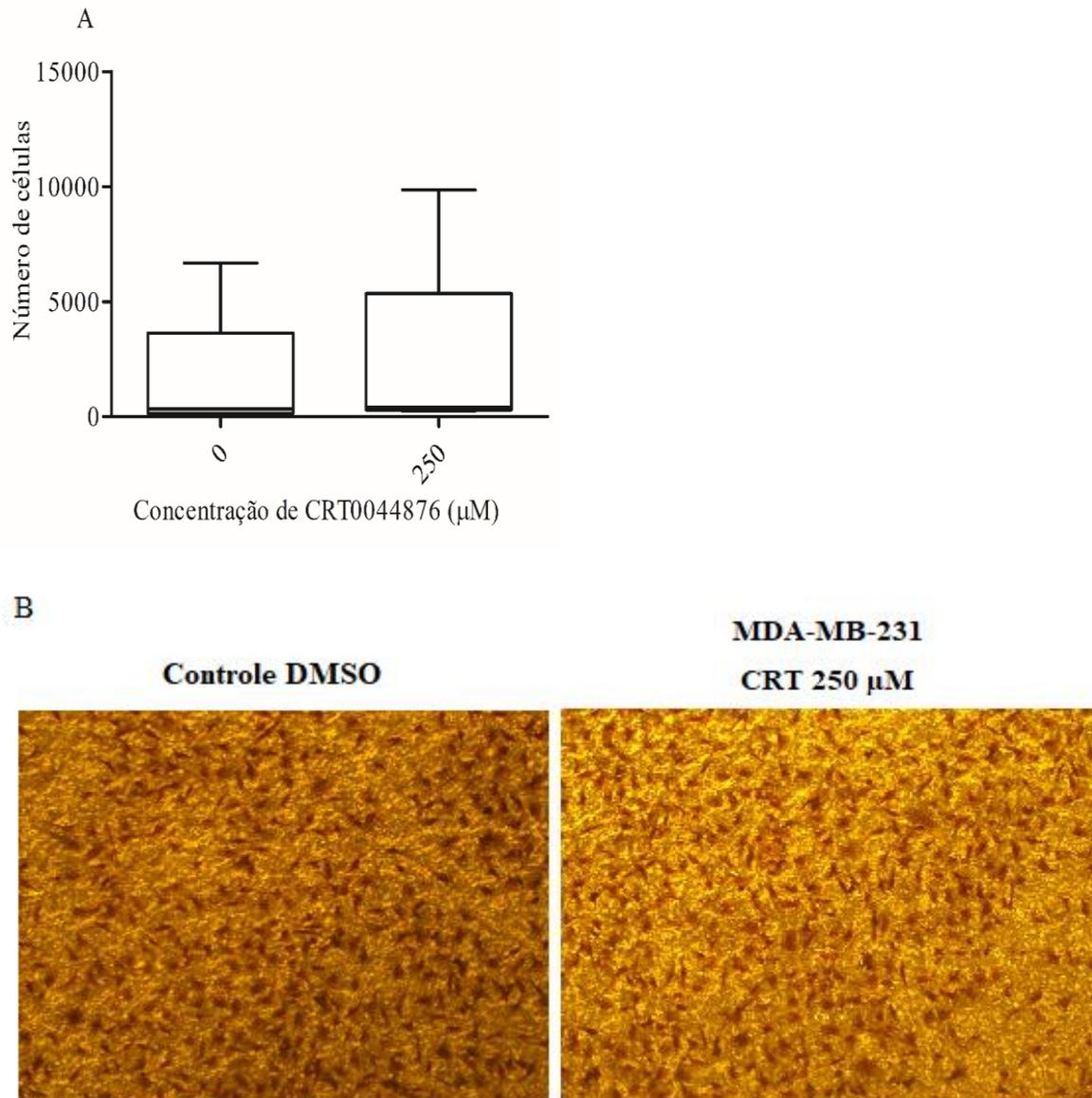
Legenda: Ensaio de migração das células MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com CRT0044876. As células MDA-MB-231 foi incubada com CRT0044876 na concentração, não letal, 250 µM pelo período de 24 h, quando foi realizada a captura das imagens do tempo final. As células MCF-7 foram incubadas com CRT0044876 na concentração, não letal, 100 µM pelo período total de 24 h, quando foi realizada a captura das imagens do tempo final. Os boxplots (A) e (B) representam as medianas e 1° e 3° quartis de pelo menos quatro experimentos individuais. Foto da migração celular no ponto inicial (0h) e após 24h (C e D). DMSO - células incubadas com dimetilsulfóxido. \* $p < 0,05$

#### 4.6 Avaliação da invasão de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876

Para avaliar o efeito da inibição da função endonuclease de APE1 na invasão celular, as células MDA-MB-231 foram incubadas com CRT0044876 na concentração não letal de 250 µM, e foi analisado seu efeito após 24 h por ensaio de invasão em *transwell* com matrigel.

Na figura 16A estão apresentados os valores da taxa de invasão das células MDA-MB-231 após inibição da função endonuclease da APE1 através da incubação das células com CRT0044876, a análise dos gráficos mostra que não houve uma alteração estatisticamente significativa na taxa de invasão celular das células MDA-MB-231, em adição, na figura 16B estão fotografias representativas que mostram a diferença na taxa de células incubadas com CRT0044876 que foram capazes de invadir a camada de matrigel, em comparação com as células incubadas com DMSO.

Figura 16 – Taxa de invasão de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876



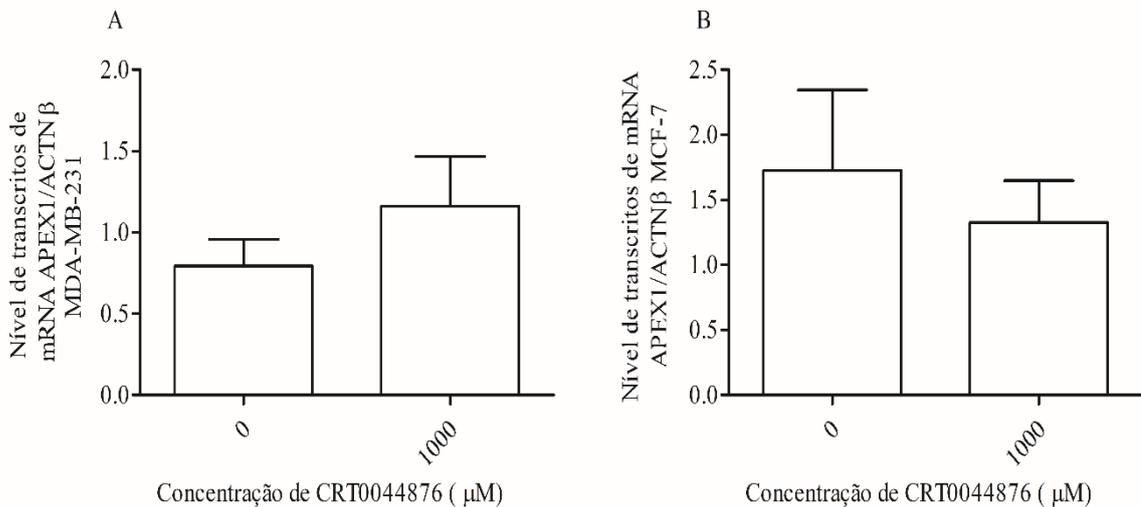
Legenda: Ensaio de invasão das células MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876 na concentração, não letal, 250 µM pelo período de 24 h, quando foram capturadas as fotografias ao final dos ensaios. Os boxplots (**A**) representam as medianas e 1º e 3º quartis de pelo menos quatro experimentos individuais.. Foto da invasão celular no ponto inicial (0h) e após 24h (B). DMSO - células tratadas com dimetilsulfóxido.

#### 4.7 Avaliação dos níveis de transcrito de *APEX1* em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876

Para investigar se a inibição da função de APE1 pelo composto CRT0044876 poderia interferir nos níveis de transcritos de *APEX1*, gene responsável pela síntese da proteína, foram realizados ensaios de PCR em tempo real para quantificação dos transcritos em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu\text{M}$  pelo período de 6 h.

A figura 17 apresenta a variação nos níveis de transcrito de *APEX1* após incubação das células com CRT0044876. As análises dos resultados mostraram que não houve alteração significativa nos níveis de mRNA nas células MDA-MB-231, como pode ser observado na figura 17A, e em células MCF-7, como pode ser observado na figura 17B, após tratamento com CRT0044876.

Figura 17– Nível de transcritos *APEX1* em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876



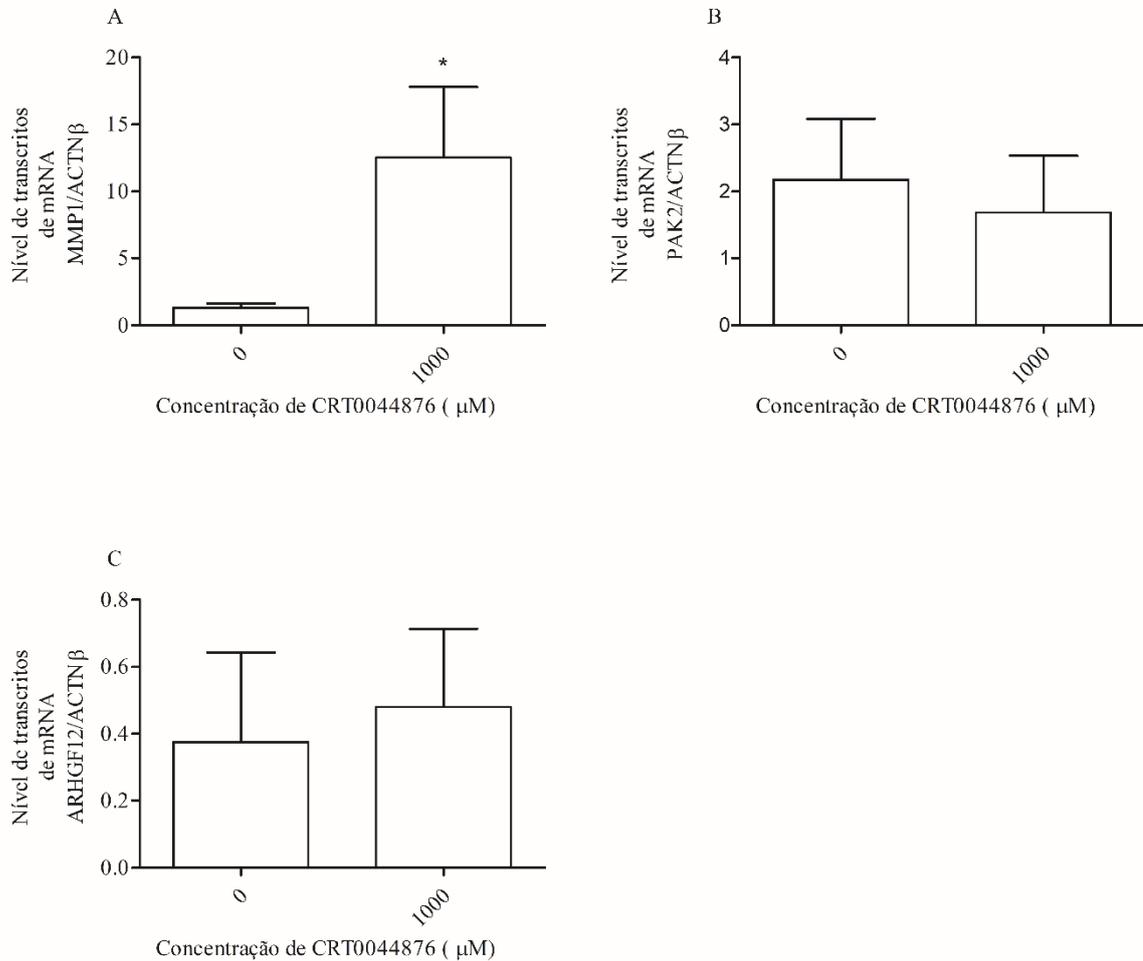
Legenda: Níveis de transcritos de *APEX1* em células MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com CRT0044876 na concentração 1000  $\mu\text{M}$  pelo período de 6 h. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão) dos níveis de transcrito de mRNA do *APEX1* de cinco experimentos individuais das linhagens MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B), após tratamento com CRT0044876. DMSO = Dimetilsulfóxido. *ACTN $\beta$*  foi usada como gene normalizador.

#### 4.8 Validação do microarranjo de células MDA-MB-231 por RT-qPCR

Para validação do microarranjo, foi realizada a técnica de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de transcritos de genes selecionados em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876. A escolha dos genes foi realizada com base na variação da expressão (*fold-change*) e a via de atuação do gene. Desta forma, o gene *MMP1* (*fold-change* = +8,25 vezes), envolvido no processo de invasão celular, e os genes *PAK2* e *ARHGEF12* (*fold-change* = +2,92 e +5,45 vezes, respectivamente), ambos relacionados com o processo de regulação de citoesqueleto de actina, foram os selecionados para desenho dos *primers*, e *ACTN $\beta$*  foi utilizado como gene normalizador.

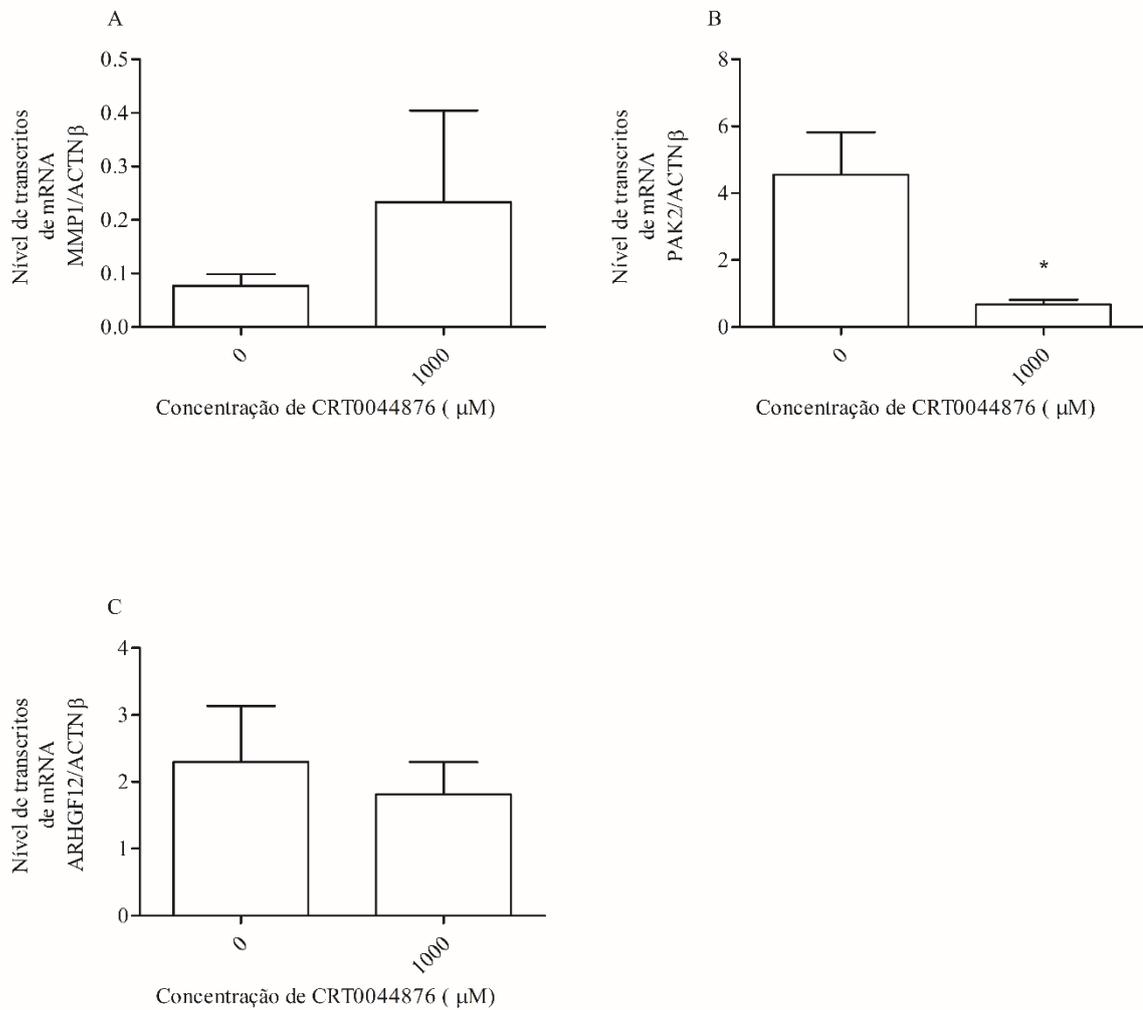
Na figura 18A está apresentado os níveis dos transcritos de *MMP1* em células MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876, e a análise dos resultados mostrou que houve um aumento de aproximadamente 11 vezes ( $\pm 4,3$ ) em comparação com o controle incubado com DMSO. Na figura 19 está apresentado os níveis de transcritos dos ensaios de PCR realizados em células MCF-7, e a análise da figura 19B permite observar que houve alteração significativa nos níveis de transcrito de *PAK2* (figura 19B), que apresentaram uma redução de aproximadamente 4 vezes ( $\pm 1,4$ ) nas células incubadas com CRT0044876 em comparação ao controle DMSO.

Figura 18 – Nível de transcritos *MMP1*, *PAK2* e *ARHGEF12* em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876



Legenda: Níveis de transcritos em células MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876 na concentração 1000 μM pelo período de 6 h. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão) dos níveis de transcrito de mRNA de *MMP1*, *PAK2* e *ARHGEF12* de cinco experimentos individuais em células MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876. DMSO = Dimetilsulfóxido. *ACTNβ* foi usada como gene normalizador. \* $p < 0,05$

Figura 19 – Níveis de transcritos *MMP1*, *PAK2* e *ARHGEF12* em células MCF-7 incubadas com CRT0044876



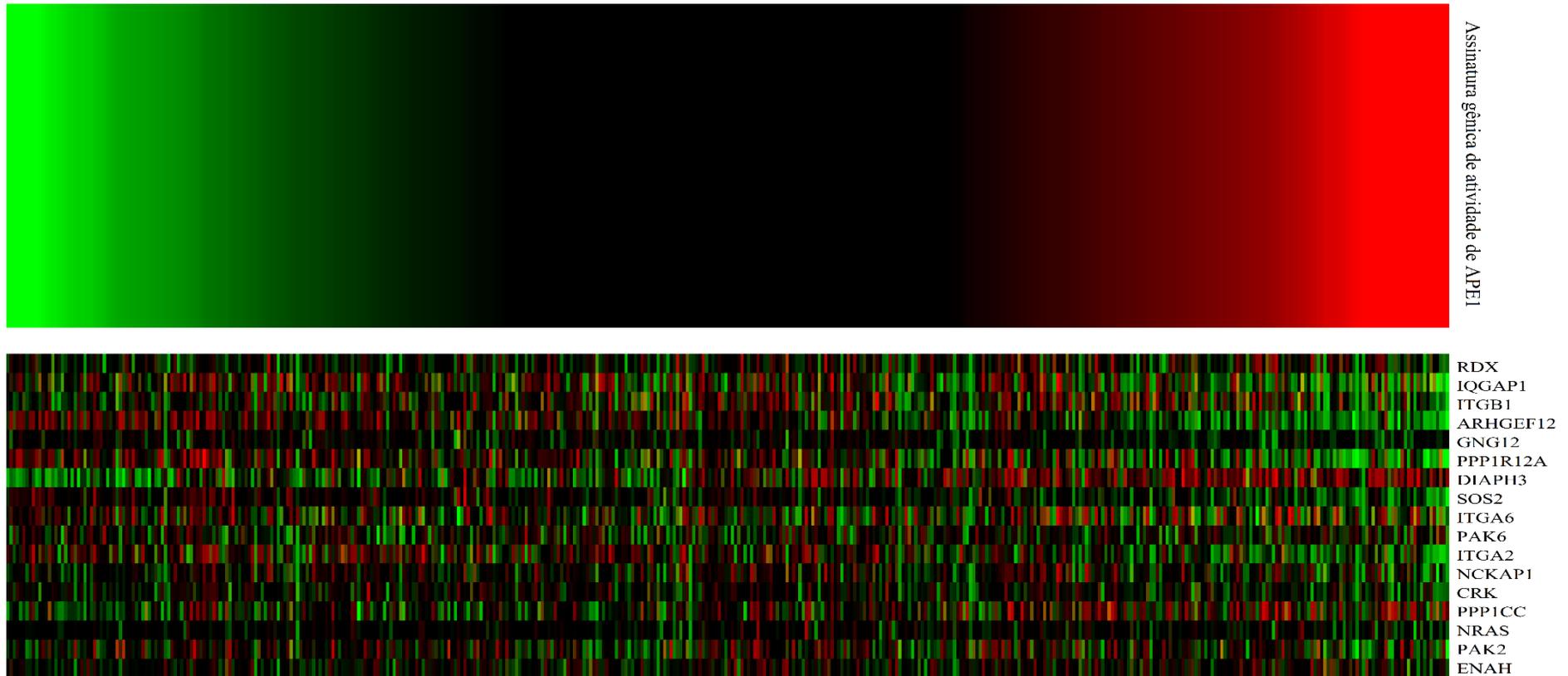
Legenda: Níveis de transcritos em células MCF-7 após incubação com CRT0044876 na concentração 1000 μM pelo período de 6 h. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão) dos níveis de transcrito de mRNA de *MMP1*, *PAK2* e *ARHGEF12* de cinco experimentos individuais em células MCF-7 após incubação com CRT0044876. DMSO = Dimetilsulfóxido. *ACTNβ* foi usada como gene normalizador. \* $p < 0,05$

#### 4.9 Análise *in silico* da correlação da assinatura de atividade de APE1 com a expressão dos genes de regulação de citoesqueleto de actina

De forma complementar aos achados nesse trabalho, foram realizadas análises de bioinformática em amostras de tumores de pacientes afim de avaliar uma possível correlação entre os níveis de expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina, encontrados alterados no microarranjo de RNA, e a variação da atividade da APE1. Para tal avaliação, as amostras foram selecionadas em função da assinatura gênica que indica a variação de atividade de APE1, na figura 20 está apresentado o *heatmap*, onde a região em vermelho indica uma elevada expressão dos genes da assinatura, apontando uma maior atividade de APE1, enquanto a região verde representa uma menor expressão, portanto uma menor atividade.

Na tabela 3 estão os valores das correlações encontradas para a expressão dos genes responsáveis pela regulação do citoesqueleto de actina, que se apresentaram alterados no microarranjo de DNA, e a assinatura gênica de APE1. Desta forma, foi possível observar que apenas *SOS2* apresenta correlação intermediária (Coeficiente de Spearman = -0.3898) com assinatura gênica de atividade de APE1, quando há atividade reduzida de APE1, enquanto os demais genes da via de regulação de citoesqueleto de actina apresentam uma baixa correlação com esta assinatura.

Figura 20 – *Heatmap* da correlação entre a assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão dos genes alterados da via de regulação de citoesqueleto de actina



Legenda: *Heatmap* mostrando níveis de mRNA de genes em tumores primários de mama do banco de dados TCGA feito através da plataforma online UCSC Xena. O *heatmap* mostra a correspondência entre a expressão da assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão dos genes alterados no microarranjo da via de regulação de citoesqueleto de actina. A coloração vermelha corresponde aos níveis elevados de expressão, enquanto a coloração verde corresponde aos níveis baixos. Os níveis de mRNA foram determinados a partir da análise de dados de RNASeq.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação entre a expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto e assinatura gênica da atividade de APE1

Genes Citoesqueleto	<i>Fold change</i> microarranjo	Coeficientes de correlação APE1 elevado		Coeficientes de correlação APE1 baixo	
		<i>r</i> Spearman	<i>p value</i>	<i>r</i> Spearman	<i>p value</i>
<i>RDX</i>	12.32	0,1445	0,081	0,0229	0,826
<i>IQGAP1</i>	5.87	0,0386	0,643	0,2217	0,031
<i>ITGB1</i>	5.54	-0,0954	0,250	0,1038	0,317
<i>ARHGEF12</i>	5.45	-0,2331	0,004	-0,1554	0,133
<i>GNG12</i>	4.83	-0,1513	0,067	0,0395	0,704
<i>PPP1R12A</i>	4.64	-0,0975	0,240	-0,1213	0,242
<i>DIAPH3</i>	4.36	0,1064	0,199	0,2954	0,004
<b><i>SOS2</i></b>	4.22	-0,0260	0,754	<b>-0,3898</b>	0,000
<i>ITGA6</i>	3.96	0,0722	0,385	-0,1398	0,177
<i>PAK6</i>	3.8	0,1040	0,210	0,0781	0,452
<i>ITGA2</i>	3.78	-0,1437	0,082	-0,0466	0,654
<i>NCKAP1</i>	3.59	0,0749	0,367	0,1325	0,200
<i>CRK</i>	3.49	-0,0971	0,242	0,0119	0,909
<i>PPP1CC</i>	3.26	-0,0592	0,477	0,1408	0,174
<i>NRAS</i>	3.17	0,0106	0,898	0,2443	0,017
<i>PAK2</i>	2.92	-0,1451	0,080	-0,0089	0,932
<i>ENAH</i>	2.88	0,1342	0,105	0,0361	0,728

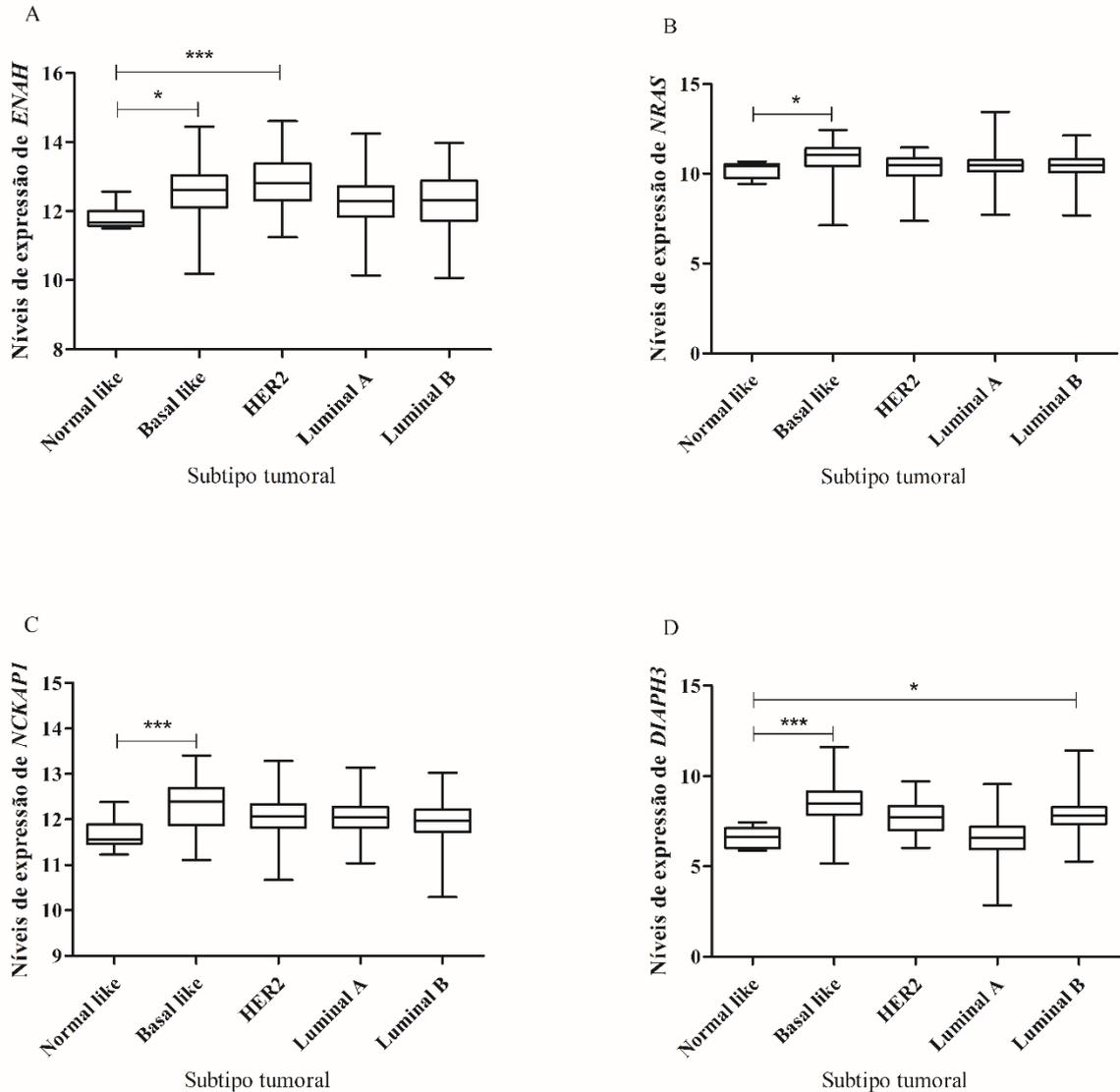
Legenda: Tabela dos coeficientes de correlação dos genes da via de regulação de citoesqueletos que obtiveram alteração no microarranjo e a assinatura gênica de atividade de APE1. *RDX* (do inglês: *radixin*), *IQGAP1* (do inglês: *IQ motif containing GTPase activating protein 1*), *ITGB1* (do inglês: *integrin subunit beta 1*), *ARHGEF12* (do inglês: *Rho guanine nucleotide exchange factor 12*), *GNG12* (do inglês: *G protein subunit gamma 12*), *PPP1R12A* (do inglês: *protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A*), *DIAPH3* (do inglês: *diaphanous related formin 3*), *SOS2* (do inglês: *SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2*), *ITGA6* (do inglês: *integrin subunit alpha 6*), *PAK6* (do inglês: *p21 (RAC1) activated kinase 6*), *ITGA2* (do inglês: *integrin subunit alpha 2*), *NCKAP1* (do inglês: *NCK associated protein 1*), *CRK* (do inglês: *CRK proto-oncogene, adaptor protein*), *PPP1CC* (do inglês: *protein phosphatase 1 catalytic subunit gamma*), *NRAS* (do inglês: *NRAS proto-oncogene, GTPase*), *PAK2* (do inglês: *p21 (RAC1) activated kinase 2*), *ENAH* (do inglês: *ENAH actin regulator*). Valores em negrito representam  $p < 0,05$ .

#### 4.10 Análise *in silico* dos subtipos tumorais e expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo

Para compreender se as expressões dos genes relacionados à regulação de citoesqueleto de actina variavam de acordo com o subtipo tumoral, foi realizada uma análise

*in silico* com as amostras do TCGA. Os subtipos avaliados foram Basal-like, HER2, luminal A e luminal B, e todos foram comparados com Normal-like. Foram selecionados 17 genes da via de regulação de citoesqueleto de actina que se encontravam alterados no ensaio de microarranjo. Dentre os genes avaliados, apenas quatro apresentaram diferença significativa entre as expressões de um ou mais subtipos e do tipo normal-like, esses genes foram: *ENAH*, que mostrou um nível de expressão  $1 (\pm 0,09)$  mais elevado nos subtipos basal-like e HER2 (figura 21A); *NRAS*, que apresentou um aumento significativo no nível de expressão de  $0,5 (\pm 0,09)$  no subtipo basal-like (figura 21B); *NCKAP1* apresentou uma maior expressão de  $1,3 (\pm 0,05)$  no subtipo basal-like (figura 21C) e *DIAPH3* que mostrou nível de  $2,2 (\pm 0,1)$  mais expresso no subtipo basal-like e  $1,2 (\pm 0,07)$  mais expresso no subtipo luminal B (figura 21D). Os demais genes não apresentaram diferença significativa entre normal-like e os subtipos (apêndice 1).

Figura 21 – Níveis de expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo de acordo com subtipos tumorais

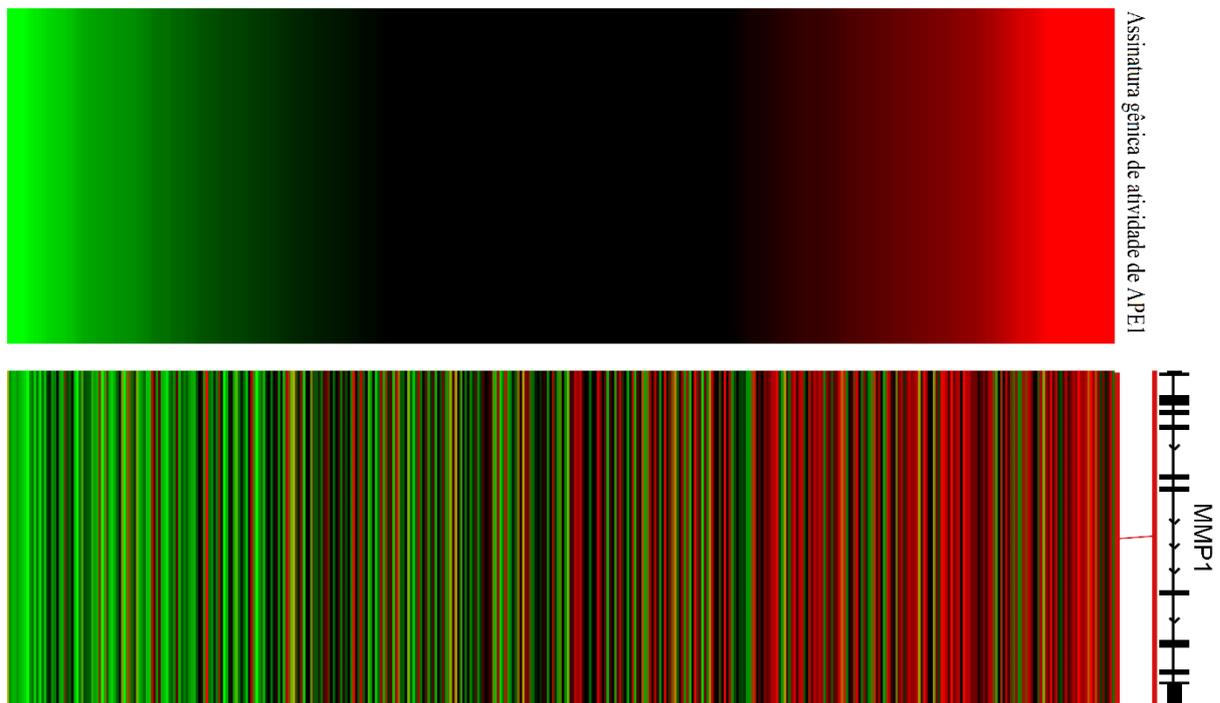


Legenda: Os boxplots representam as medianas e 1º e 3º quartis dos níveis de expressão de mRNA dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina de acordo com os subtipos tumorais. *ENAH* (acrônimo em inglês para *ENAH actin regulator*), *NRAS* (acrônimo em inglês para *NRAS proto-oncogene, GTPase*), *NCKAP1* (acrônimo em inglês para *NCK associated protein 1*), *DIAPH3* (acrônimo em inglês para *diaphanous related formin 3*). \* $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o controle (*normal like*).

#### 4.11 Análise *in silico* da correlação da expressão de *MMP1* com assinatura de APE1

A fim de avaliar uma possível correlação entre a assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão de *MMP1*, foi realizada uma análise de correlação através dos valores de  $\rho$  de Spearman. Na figura 22 está apresentado um *heatmap*, onde a região em vermelho indica uma elevada expressão dos genes da assinatura, apontando uma maior atividade de APE1, enquanto a região verde representa uma menor expressão, portanto uma menor atividade. A análise foi feita considerando apenas tumor primário e a tabela 4 mostra as correlações encontradas, onde é possível observar uma correlação intermediária entre os níveis de expressão de *MMP1* e a assinatura de atividade de APE1 (Coeficiente de Spearman = 0.3408), além disso, foi realizada uma avaliação da correlação nas amostras considerando os subtipos, e foi visualizado uma correlação intermediária entre a expressão de *MMP1* no subtipo luminal B, tanto considerando maior atividade de APE1 (Coeficiente de Spearman = 0.3614), quanto em relação a baixa atividade de APE1 (Coeficiente de Spearman = 0.3281). Por fim, no subtipo *basal-like* foi possível também observar uma correlação intermediária entre amostras com baixa expressão de assinatura gênica de APE1 e a expressão de *MMP1* (Coeficiente de Spearman = 0.4739). Nas demais comparações foram observadas apenas correlações mais baixas entre *MMP1* e a assinatura gênica de atividade de APE1 (tabela 4).

Figura 22 – *Heatmap* da correlação entre a assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão de *MMP1*



Legenda: O *heatmap* mostra a correspondência entre a expressão da assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão de *MMP1* a partir dos níveis de mRNA em tumores primários de mama do banco de dados TCGA feito através da plataforma online UCSC Xena. A coloração vermelha corresponde aos níveis elevados de expressão, enquanto a coloração verde corresponde aos níveis baixos. Os níveis de mRNA foram determinados a partir da análise de dados de RNASeq.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação entre *MMP1* e assinatura gênica da atividade de APE1

<i>MMP1</i>	<i>Fold change microarranjo</i>	Coeficientes de correlação APE1 elevado		Coeficientes de correlação APE1 baixo	
		r Spearman	p value	r Spearman	p value
Tumor primário		0,1582	0,001	<b>0,3408</b>	0,000
HER2		0,0408	0,795	0,1396	0,400
Luminal A	8,25	0,2417	0,054	0,2613	0,001
Luminal B		<b>0,3614</b>	0,008	<b>0,3281</b>	0,006
<i>Basal-like</i>		-0,1144	0,328	<b>0,4739</b>	0,022

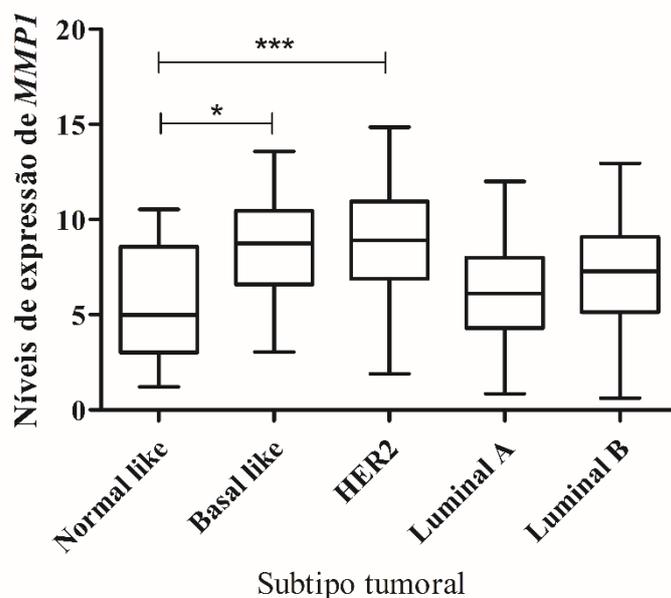
Legenda: Tabela dos coeficientes de correlação do gene *MMP1*, que obteve alteração no microarranjo, e a assinatura gênica de atividade de APE1. *MMP1* (do inglês: *matrix metallopeptidase 1*). Valores em negrito representam  $p < 0,05$  quando comparado com assinatura gênica de atividade de APE1.

#### 4.12 Análise *in silico* dos subtipos tumorais e expressão de *MMP1*

Além da avaliação de uma possível correlação da expressão *MMP1* em relação à atividade de APE1 em tumores de mama, foi investigada uma possível variação da expressão de *MMP1* de acordo com os subtipos tumorais de acordo com os dados de TCGA.

Na figura 23 está apresentada a variação nos níveis de expressão de *MMP1* nos diferentes subtipos de tumores primários, desta forma, foi possível observar que *MMP1* apresenta um aumento significativo nos níveis de expressão nos subtipos *basal-like*, de aproximadamente  $3,5 (\pm 0,26)$ , e *HER2*, de aproximadamente  $4 (\pm 0,35)$ , em relação do *normal-like*.

Figura 23 – Níveis de expressão de *MMP1 in silico* de acordo com subtipos tumorais.



Legenda: Níveis de expressão de *MMP1* em subtipos de tumores primários de mama, dados coletados no TCGA. Os boxplots representam as medianas e 1° e 3° quartis dos níveis de expressão de mRNA de *MMP1* de acordo com os subtipos tumorais. *MMP1* (acrônimo em inglês para *matrix metalloproteinase 1*). \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$

## 5 DISCUSSÃO

Apesar do avanço nas pesquisas, o câncer de mama ainda é o segundo tipo de câncer mais frequente em todo mundo, fazendo com que seja necessário sempre um melhor entendimento na biologia desses tumores. Alguns estudos mostram uma relação entre a atividade da enzima AP endonuclease 1 (APE1) e o câncer de mama (ANTONIALI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; GUERREIRO *et al.*, 2017). APE1 é uma proteína multifuncional que apresenta papel de endonuclease em 95 % das respostas no reparo por excisão de base (THAKUR *et al.*, 2014; GUERREIRO *et al.*, 2017), além disso, exibe atividade na porção redox da proteína funcionando como estímulo a ativação de vários fatores transcricionais, tais como NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , p53 e AP-1; co-regulador transcricional, entre outras funções (WOO *et al.*, 2014; LAEV *et al.*, 2017)

O CRT0044876 é um inibidor da função endonuclease da APE1 (MADHUSUDAN *et al.*, 2005), e foi usado para avaliar a importância de sua atividade de reparo em modelos de câncer de mama. No presente trabalho, o primeiro ensaio realizado foi o de viabilidade celular, o tratamento com CRT0044876 para as culturas de MDA-MB-231 e MCF-7, e os resultados mostraram que houve uma redução significativa da viabilidade a partir da concentração de 1000  $\mu$ M. Naidu e colaboradores (2010) mostraram que CRT0044876 apresenta ação radiosensibilizadora em células de glioma, porém de forma menos eficiente que o composto lucantona. Franchi e colaboradores (2020) mostraram que a inibição da porção redox de APE1 pelo inibidor E3330 combinado com terapia fotodinâmica apresentou resultado promissor em células de adenocarcinoma cervical, HeLa e adenocarcinoma de pulmão A549, enquanto a inibição com CRT0044876 não mostrou diferença na viabilidade celular ou em tratamento combinado. Chen e colaboradores (2017) mostraram que o silenciamento de APE1 em células da linhagem HCC1937 de câncer de mama, que apresenta mutação em *BRCA*, combinado com tratamento de Olaparib reduziu a viabilidade dessas células. Ma e colaboradores (2019) mostraram resultados semelhantes em células MCF-7. Em seguida, para entender o mecanismo de morte celular, foi realizado em células MDA-MB-231 o ensaio de apoptose/necrose por Anexina V/7-AAD, onde os resultados mostraram que o CRT0044876 induz apoptose e necrose de forma simultânea. Sun e colaboradores (2018) mostraram que o silenciamento de APE1 em células de carcinoma hepatocelular (Hep 3B) resultou em aumento significativo de apoptose. Cardoso e colaboradores (2012) mostraram que a inibição de APE1 usando o inibidor de sua função redox (E3330) não resultou em

apoptose quando aplicado sozinho, em culturas de células de linhagens de câncer de pâncreas (Panc-1, PaCa-2 e Panc10.05). O tratamento com CRT0044876 sugere que a função de reparo de APE1, e não a porção redox de APE1, é crucial para a viabilidade através de mecanismos relacionados com o processo de apoptose. Porém, para compreender de maneira global como a inibição da função endonuclease poderia interagir com outros processos celulares, foi realizado um ensaio de microarranjo após incubação com CRT0044876.

Os resultados do microarranjo mostraram uma regulação positiva de 2399 genes e uma regulação negativa na expressão de 496 genes, os quais foram agrupados e analisados em relação às vias em que se encontram envolvidos, através da ferramenta online WebGestalt e dos bancos de dados KEGG, *Reactome* e *Geneontology*. A partir da análise do banco de dados KEGG, a via que mostrou maior alteração do agrupamento positivo de genes foi relacionada à regulação do citoesqueleto de actina, onde diversos genes envolvidos na expressão as GTPases aparecem alterados de alguma forma. A organização do citoesqueleto se dá pelas vias de sinalização da família Rho-GTPases (acrônimo em inglês para *small G proteins Ras-like GTPases*), onde as proteínas mais bem caracterizadas talvez sejam as RhoA (acrônimo em inglês para *Ras homolog gene family*), Rac1 [acrônimo em inglês para *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac1)*] e Cdc42 (acrônimo em inglês para *Cell division cycle 42*) (RIDLEY e HALL, 1992). As vias de sinalização alteradas por Rho GTPases, efetores Rho GTPase e forminas ativas de Rho GTPases indicam uma forma de regulação na organização do citoesqueleto, que responde às GTPases como “interruptores celulares” dependendo da cascata de sinalização celular. Essas alterações estão relacionadas a capacidade celular de migrar e invadir, que nas células tumorais se encontra alterada. (MAYOR e CARMONA-FONTAINE, 2010). A partir da análise utilizando o *Reactome*, para os agrupamentos de genes com expressão diminuída, as vias que apresentaram alterações significativas estão relacionadas, aos processos de sinalização da família das GPCRs (acrônimo em inglês para *G protein-coupled receptor*) e vão desde vias de sinalização a jusante das GPCR aos eventos de sinalização G alfa, entre outras. Hilger e colaboradores (2018) mostraram a importância dos complexos de proteínas GPCR para o funcionamento das cascatas das Rho-GTPases sendo, portanto, possível observar uma relação das diferentes vias que se mostram alteradas após inibição de APE1. Finalmente, análise a partir do *geneontology* permitiram observar variações em vias relacionadas a ribossomo, complexo proteico mitocondrial, cadeia respiratória, parte da

membrana mitocondrial e membrana mitocondrial interna, a partir do agrupamento de genes com expressão diminuída. Alguns estudos mostram a relação entre a translocação de APE1 para mitocôndria e seu papel na proteção celular contra danos causados por estresse oxidativo (LI *et al.*, 2008; JOO *et al.*, 2014; CODRICH *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020), portanto, essa interferência da inibição de APE1 em vias relacionadas à cadeia mitocondrial poderia contribuir para uma sensibilização celular aos tratamentos geradores de estresse oxidativo.

Durante o ensaio de viabilidade, notou-se uma alteração morfológica em células MDA-MB-231, que não foi observada em células MCF-7, quando as culturas foram submetidas ao tratamento com CRT0044876. Para investigar melhor essa mudança na conformação das células MDA-MB-231 foi realizado um ensaio de imunofluorescência para análise do citoesqueleto de actina, onde pode-se observar a partir dos resultados obtidos, que o tratamento com CRT0044876 alterou a conformação do citoesqueleto das células MDA-MB-231, como observado também na via alterada após ensaio de microarranjo que teve como destaque a regulação de citoesqueleto de actina. Há formação de pontos de fibras de estresse e lamelipódios, indicando que a célula sofre uma alteração no citoesqueleto, e consequentemente, na sua capacidade migratória e invasiva. Oakes e colaboradores (2018) mostraram que lamelipódios agem como mecanosensores miosina-independentes em fibroblastos de tecidos com rigidez semelhante de um tecido muscular (aproximadamente 8 kPa), portanto, o que sugere que o processo cinético de migração e invasão celular se baseia na polimerização de actina e formação de lamelipódios. De maneira adicional, Dai e colaboradores (2020) demonstraram que, em substrato com altos níveis de desordem, a velocidade e direção da migração celular de células MDA-MB-231 é regulada pela formação de lamelipódios e filopódios.

De forma complementar, para avaliar se as alterações relacionadas à via de citoesqueleto proporcionavam uma maior capacidade de migração e invasão, foram realizados os ensaios de *Wound healing* e invasão em *transwell* com matrigel de células MDA-MB-231, e para células MCF-7 foi realizado ensaio de *Wound healing* para comparação da capacidade de migração celular, após tratamento com CRT0044876. Foi observado aumento na capacidade migratória de células MDA-MB-231, que apresentaram uma diferença significativa em relação ao controle, no entanto não houve alteração na taxa de migração de células MCF-7. Todavia, o ensaio de invasão em *transwell* com matrigel não apresentou diferença significativa entre a quantidade de invasão de células tratadas quando comparado ao

controle. Até o presente momento, só havia sido observada alteração de migração e invasão em células tumorais com a inibição da porção redox da proteína. Wei e colaboradores (2016) mostraram que o silenciamento de APE1 e o tratamento com o composto AT101, inibidor da função redox de APE1, resultaram na redução das propriedades de transição epitélio-mesenquimal de células de pulmão (A549). Guerreiro e colaboradores (2017) mostraram que a inibição da função redox de APE1 com o E3330 também reduziu a capacidade de migração e invasão de células MDA-MB-231. Os resultados deste trabalho demonstram, desta forma, que a inibição da atividade endonuclease de APE1 interfere, de forma direta ou indireta, na regulação dos componentes responsáveis pelo controle da migração de células MDA-MB-231.

Por conseguinte, para validação do ensaio de microarranjo, foram realizadas PCRs tempo real para quantificar genes escolhidos de acordo com seus níveis de alteração e em relação à via em que atuavam. Vascotto e colaboradores (2009) mostraram uma influência do silenciamento de APE1 sobre o citoesqueleto de células tipo HeLa. Portanto, foram escolhidos os genes que mais se encontravam alterados, relacionados à via de citoesqueleto de actina, estes foram *PAK2* e *ARHGEF12*, que são genes envolvidos no processo de migração celular, e *MMP1*, envolvido na invasão. Em células MDA-MB-231 pôde-se observar um aumento significativo na expressão dos transcritos de *MMP1*, condizente com o resultado encontrado no microarranjo que também mostrou níveis de expressão de *MMP1* aumentados. Köhrmann e colaboradores (2009) mostraram uma alta expressão da proteína e mRNA *MMP1* em tecido tumoral, e que o nível da expressão está diretamente relacionado ao nível de agressividade do tumor. Em adição, o trabalho de Eiro e colaboradores (2020) demonstrou a importância da avaliação dos níveis de *MMP1*, visto que poderia contribuir para uma predição do estágio de invasão do tumor de mama e a capacidade metastática e de resistência. Apesar de não realizarmos o microarranjo em células MCF-7, a PCR tempo real foi performada com o objetivo de responder se há diferença entre estas células e células MDA-MB-231 quando a porção nucleasa de APE1 é inibida. Conforme os resultados da PCR, foi possível observar que em células MCF-7 não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle, nas expressões de *MMP1* e *ARHGEF12*. Contudo, houve uma redução significativa nos níveis de transcrito de *PAK2* em células incubadas com o inibidor de APE1. Dang e colaboradores (2020) mostraram que há uma superexpressão de *PAK2*, mRNA e proteína em

tecido tumoral de mama, porém não há uma correlação dos níveis de *PAK2* com o prognóstico e sobrevida dos pacientes.

Resolvemos, então, avaliar os níveis de transcritos de *APEX1* após o tratamento com CRT0044876. Os resultados encontrados mostraram que não há efeito da inibição da APE1 nos níveis de mRNA de *APEX1*. Atualmente, não há trabalhos que mostrem uma associação entre a inibição de APE1 e os níveis de expressão de *APEX1*.

Por fim, decidimos investigar, através da análise de bioinformática do TCGA, a expressão dos genes de regulação do citoesqueleto que se mostraram alterados no ensaio de microarranjo, a partir da assinatura de atividade de APE1. A análise utilizando o TCGA proporciona um panorama dos níveis desses genes em amostras de pacientes, concedendo desta forma, informações mais próximas ao que poderá ser encontrado *in vivo*. A assinatura da atividade de APE1 foi generosamente cedida pelo autor Emiliano Dalla, e foi proposta por seu grupo após um trabalho onde mostraram a capacidade de regulação dos genes que compõem a assinatura, apenas na presença de APE1 ativo (AYYILDIZ *et al.*, 2020). Após a avaliação *in silico* da correlação da expressão gênica da assinatura de atividade de APE1 e os genes de regulação de citoesqueleto, pôde-se observar que houve apenas uma correlação intermediária entre a atividade de APE1 e os níveis de expressão de *SOS2*, responsável pela regulação positiva das proteínas RAS, uma das componentes da família das GTPases, que estão diretamente relacionadas à regulação do citoesqueleto de actina. Banyś-Paluchowski e colaboradores (2019) mostraram, depois de avaliarem a importância dos componentes da família RAS em pacientes de câncer de mama, que N-RAS é a única que apresenta associação com mau prognóstico e malignidade dos tumores de mama, geralmente relacionado a expressão de HER2 e o estágio de infiltração tumoral. Os demais genes de regulação de citoesqueleto de actina não apresentaram correlação intermediária ou forte, indicando que não há uma dependência da atividade de APE1 para tal expressão, e posterior regulação da conformação do esqueleto de actina em células de tumores de mama. Não há, porém, dados na literatura científica que demonstrem uma correlação de atividade de APE1 e expressão de genes reguladores de citoesqueleto de actina.

Em seguida, foi avaliada uma possível variação na expressão dos níveis destes mesmos genes, da via de regulação de citoesqueleto de actina, de acordo com os subtipos tumorais. Assim, os resultados encontrados revelaram que dos dezessete genes avaliados, apenas quatro demonstraram diferença significativa entre a expressão de um subtipo tumoral

comparado ao tipo *normal-like*. Foram os genes *ENAH*, *NRAS*, *NCKAP1* e *DIAPH3*, onde todos apresentaram diferença notável no subtipo *basal-like*, que representa uma maior associação a maior capacidade de metástase e pior prognóstico, frequentemente relacionados à regulação da via de citoesqueleto celular, devido uma desregulação dos níveis de e-caderina (KOVAC; MÄKELÄ; VALLENIUS, 2018). Zheng e colaboradores (2015) mostraram que há uma superexpressão de *NRAS* do tipo selvagem predominante em mulheres com câncer de subtipo *basal-like* que não é encontrado em mulheres com outros subtipos. Há ainda uma maior associação entre as principais vias responsáveis por produzir e regular o citoesqueleto de actina e os genes envolvidos nestas vias, como o trabalho onde Privat e colaboradores (2020) demonstram a variação da expressão de RhoA/RhoB e a capacidade migratória das células tumorais. Porém, uma observação conjunta de diferentes mecanismos que estejam associados à morfologia e citoesqueleto celular poderia contribuir para compreensão de novas perspectivas sobre adaptações celulares em relação à evolução dos tumores.

Em adição, decidimos avaliar a expressão de *MMP1* de correlacionando com a atividade de APE1, através de sua assinatura gênica. Os resultados encontrados mostraram que há uma correlação intermediária significativa quando há menor atividade de APE1, principalmente em relação aos subtipos luminal B e *basal-like*, este último é coerente com o perfil mesenquimal encontrado neste subtipo tumoral (DAI *et al.*, 2017). No entanto, Boström e colaboradores (2011) mostraram que em células estromais de tumores do subtipo luminal B, há uma maior expressão de *MMP1*, inclusive se comparado a tumores do subtipo *basal-like*. Este resultado indica uma ação de APE1 na capacidade invasiva tumoral, como já foi demonstrado por alguns autores (SHAH *et al.*, 2017; CASTON *et al.*, 2021). Por fim, foi realizada uma avaliação dos níveis variação de expressão de *MMP1* de acordo com os subtipos tumorais, onde foi observada uma diferença significativa entre amostras do subtipo *basal-like* e HER2. Como discutido anteriormente, há uma indicação para importância da utilização de *MMP1* a fim de identificar previamente a capacidade de invasão, progressão e metástase do tumor (XUAN *et al.*, 2015; EIRO *et al.*, 2020), portanto, essas alterações demonstram a necessidade de se aprofundar e compreender melhor o papel de *MMP1* em tumores de subtipos mais agressivos de mama.

Como discutido neste e em outros trabalhos, APE1 apresenta importância fundamental para as linhagens tumorais. Alguns trabalhos mostram a relação entre a superexpressão de APE1 e o prognóstico ruim em relação a sobrevida de pacientes diagnosticados com câncer de

mama além do papel desta proteína na agressividade e progressão do tumor, incluindo através do processamento de miRNAs (WOO *et al.*, 2014; ANTONIALI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017). Neste trabalho buscamos contribuir com o aumento da compreensão da atuação de APE1 nos diferentes processos celulares em modelos de câncer de mama, porém, ainda se faz necessário um aprofundamento sobre papel de APE1 nos diferentes tumores, sempre em busca de novas propostas terapêuticas e de novos biomarcadores, além de aperfeiçoar as aplicações das terapias já existentes, para tal conhecimento possa contribuir para prognósticos mais benéficos e melhores condições de vida para os pacientes de câncer.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in silico* sugerem que:

- a) A inibição da função endonuclease de APE1 reduz a viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 e MCF-7.
- b) A inibição da endonuclease APE1 altera a morfologia celular e o citoesqueleto de actina em células MDA-MB-231;
- c) A inibição da endonuclease APE1 não altera na morfologia de células MCF-7;
- d) A inibição da endonuclease APE1 aumenta a capacidade de migração de células MDA-MB-231;
- e) As principais alterações dos níveis de mRNAs devido à inibição de APE1 estão relacionadas a vias de regulação do citoesqueleto e dos processos mitocondriais.
- f) A inibição da endonuclease APE1 aumenta os níveis de transcrito do *MMP1* em células MDA-MB-231 e diminui a expressão de transcrito do *PAK2* em células MCF-7.
- g) A inibição da endonuclease APE1 não altera os níveis de expressão de *APEX1* em células MDA-MB-231 e MCF-7.
- h) Não há correlação entre a atividade de APE1 e a expressão de genes de regulação de citoesqueleto de actina em tumores primários de mama.
- i) Há uma correlação média entre atividade de APE1 e a expressão de *MMP1* em tumores primários de mama.
- j) No subtipo *basal-like* há maior expressão de *ENAH*, *NRAS*, *NCKAP1*, *DIAPH3* e *MMP1* em tumores primários de mama.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTTS, R.; MADHUSUDAN, S. Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer. **Cancer Treat Rev.** v. 36, n. 5, p. 425–435, 2010. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.12.006
- ABDEL-FATAH, T.M.A. et al. Is There a Role for Base Excision Repair in Estrogen/Estrogen Receptor-Driven Breast Cancers?, *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 21, n. 16, p. 2262–2268, 2014. DOI: 10.1089/ars.2014.6077
- ABDULSALAM, S. F.; THOWFEIK, F. S.; MERINO, E. J. Excessive reactive oxygen species and exotic DNA lesions as an exploitable liability. *Biochemistry*, v. 55, n. 38, p. 5341–5352, 2016. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00703
- ALEKSEEVA, I.V. et al. The impact of single-nucleotide polymorphisms of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 on specific DNA binding and catalysis, *Biochimie*, v. 163, p. 73–83, 2019. doi: 10.1016/j.biochi.2019.05.015
- ALI, R. et al. DNA damage repair in breast cancer and its therapeutic implications. *Pathology*, p. 1–10, 2016. doi: 10.1016/j.pathol.2016.11.002
- ALMUTAIRI, F. et al. Association of DNA Repair Gene APE1 Asp148Glu Polymorphism with Breast Cancer Risk. *Dis Markers*. v. 2015, n. 869512, 2015. doi: 10.1155/2015/869512
- AL-TASSAN, N. et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C>T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* v 30, n 2, p. 227–232, 2002. doi: 10.1038/ng828
- ANTONIALI, G. et al. Mammalian APE1 controls miRNA processing and its interactome is linked to cancer RNA metabolism. *Nat Commun*, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-00842-8
- ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, v. 25, p. 25–29, 2000.
- AYYILDIZ, D. et al. Architecture of The Human Ape1 Interactome Defines Novel Cancers Signatures. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 28, 2020. doi: 10.1038/s41598-019-56981-z
- BANYS-PALUCHOWSKI, M. et al. Clinical relevance of H-RAS, K-RAS, and N-RAS mRNA expression in primary breast cancer patients, *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 179, n. 2, p. 403–414, 2020. doi: 10.1007/s10549-019-05474-8

- BAPAT, A., FISHEL, M.L., KELLEY, M.R. Going ape as an approach to cancer therapeutics, *Antioxid. Redox Signaling*, v. 11, n. 3, p. 651–668, 2009. doi: 10.1089/ARS.2008.2218
- BARNUM, K.J.; O'CONNELL, M.J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol.* v. 1170, p. 29–40, 2014. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2\_2
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, v. 3, n. 8–9, p. 1109–1115, 2004. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.002
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1340–1344, 2006. doi: 10.1590/S0100-40422006000600032
- BOERSMA, H.H. et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med.* v. 46, n. 12, p. 2035 – 2050, 2005.
- BOURGEAIS, J.; GOUILLEUX-GRUART, V.; GOUILLEUX, F. Oxidative metabolism in cancer: A STAT affair?, *Jak-Stat*, v. 2, n. 4, p. e25764, 2013. doi: 10.4161/jkst.25764.
- BOSTRÖM, P. et al. MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer, *BMC Cancer*, v. 11, n. 1, p. 348, 2011. doi: 10.1186/1471-2407-11-348
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, v. 25, n. 2, p. 169–93, 2000.
- CARBON, S. et al. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*, v. 25, n. 2, p. 288-9, 2009.
- CARBON, S. et al. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D330–D338, 2019.
- CARDANO, M.; TRIBIOLI, C.; PROSPERI, E. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as an Effective Strategy to Inhibit Tumor Cell Proliferation, *Curr Cancer Drug Targets*, v. 20, n. 4, p. 240 – 252, 2020. doi: 10.2174/1568009620666200115162814
- CARDOSO, A.A. et al. APE1/Ref-1 Regulates STAT3 Transcriptional Activity and APE1/Ref-1-STAT3 Dual-Targeting Effectively Inhibits Pancreatic Cancer Cell Survival. *PLoS ONE*. v. 7, n. 10, e47462, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0047462
- CASTON, R.A. et al. The multifunctional APE1 DNA repair–redox signaling protein as a drug target in human disease, *Drug Discovery Today*, v. 26, n. 1, p. 218–228, 2021. doi: 10.1016/j.drudis.2020.10.015
- CESARATTO, L. et al. Specific Inhibition of the Redox Activity of Ape1/Ref-1 by E3330 Blocks Tnf-A-Induced Activation of Il-8 Production in Liver Cancer Cell Lines, *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070909

- CHEN, T. et al. The expression of APE1 in triple-negative breast cancer and its effect on drug sensitivity of olaparib. *Tumor Biol.* v. 39, n. 10, p. 1–9, 2017. doi: 10.1177/1010428317713390
- CHOI, S.; JOO, H.K.; JEON, B.H. Dynamic Regulation of APE1/Ref-1 as a Therapeutic Target Protein. *Chonnam Med J*, v. 52, n. 2, p. 75, 2016. doi: 10.4068/cmj.2016.52.2.75
- CODRICH, M. et al. Inhibition of APE1-endonuclease activity affects cell metabolism in colon cancer cells via a p53-dependent pathway, *DNA Repair (Amst)*, v. 82, 2019. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102675
- COOKE, M.S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* v. 17, n. 10, p. 1195-214. 2003. doi: 10.1096/fj.02-0752rev
- COSKUN, E. et al. Extreme Expression of DNA Repair Protein Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1) in Human Breast Cancer as Measured by Liquid Chromatography and Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry, *Biochemistry*, v. 54, n. 38, p. 5787–5790, 2015. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00928
- CREE, I.A.; CHARLTON, P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer*, v. 17, n. 10, 2017. doi 10.1186/s12885-016-2999-1
- DAI, J. et al. Biointerface anisotropy modulates migration of breast cancer cell, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 190, n. November 2019, p. 110973, 2020. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110973
- DANG, Y. et al. Systemic analysis of the expression and prognostic significance of PAKs in breast cancer, *Genomics*, v. 112, n. 3, p. 2433–2444, 2020. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.01.016
- DIAS, K. et al. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS ONE*, v. 12, n. 1, p. e0168669, 2017
- DYRKHEEVA, N.S.; LEBEDEVA, N.A.; LAVRIK, O.I. Genomic DNA – the major carrier of genetic inforr, *Biochemistry (Moscow)*, v. 81, n. 9, 2016. doi: 10.1134/S0006297916090042
- EIRO, N. et al. MMP1 and MMP11 expression in peripheral blood mononuclear cells upon their interaction with breast cancer cells and fibroblasts, *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2021. doi: 10.3390/ijms22010371
- ESPINOSA-DIEZ, C. et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, v. 6, p. 183–197, 2015. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.008
- FAN, J.; WILSON, D.M. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. *Free radical biology & medicine*, v. 38, n. 9, p. 1121–38, 2005. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.012

- FRANCHI, L.P. et al. The redox function of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 as key modulator in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 211, n. August, p. 111992, 2020. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111992
- FISHEL, M.L.; KELLEY, M.R. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target, *Molecular Aspects of Medicine*, v. 28, n. 3–4, p. 375–395, 2007. doi: 10.1016/j.mam.2007.04.005
- FISHEL, M.L. et al. Impact of APE1/Ref-1 Redox Inhibition on Pancreatic Tumor Growth, *Mol Cancer Ther.*, v. 10, n. 9, p. 1698–1708, 2011. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0107
- GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* v. 19, n. 1, p. 107 – 120, 2012. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- GOLDMAN, M.J. et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology*, v. 38, p. 675–678, 2020.
- GU, D. et al. The DNA repair gene APE1 T1349G polymorphism and cancer risk: A meta-analysis of 27 case-control studies, *Mutagenesis*, v. 24, n. 6, p. 507–512, 2009. doi: 10.1093/mutage/geb036
- GUERREIRO, P.S. et al. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 757, n. 2, p. 140–147, 2013. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.08.003
- GUERREIRO, P.S. et al. Structure-based virtual screening toward the discovery of novel inhibitors of the DNA repair activity of the human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 88, n. 6, p. 915–925, 2016. doi: 10.1111/cbdd.12826
- GUERREIRO, P.S. et al. The APE1 redox inhibitor E3330 reduces collective cell migration of human breast cancer cells and decreases chemoinvasion and colony formation when combined with docetaxel. *Chem Biol Drug Des.*, v. 90, n. 4, p. 561–571, 2017. doi: 10.1111/cbdd.12979
- GURER-ORHAN, H. et al. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 33, p. 4084–4101, 2017. doi: 10.2174/0929867324666170711114336
- HILGER, D.; MASUREEL, M.; KOBILKA, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes, *Nat Struct Mol Biol*, v. 25, n. 1, p. 4–12, 2018. doi: 10.1038/s41594-017-0011-7

- HONG, J. et al. APE1-mediated DNA damage repair provides survival advantage for esophageal adenocarcinoma cells in response to acidic bile salts. *Oncotarget*, v. 7, n. 13, p. 16688–16702, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.7696
- HUNG, R.J. et al. Genetic Polymorphisms in the Base Excision Repair Pathway and Cancer Risk: A HuGE Review, *American Journal of Epidemiology*, v. 162, n. 10, p. 925–942, 2005. doi: 10.1093/aje/kwi318
- HSIEH, W.C. et al. Genetic polymorphisms in APE1 Asp148Glu(rs3136820) as a modifier of the background levels of abasic sites in human leukocytes derived from breast cancer patients and controls. *Breast Cancer*. v. 24, n. 3, p. 420–426, 2017. doi: 10.1007/s12282-016-0719-y
- JOO, H.K. et al. Mitochondrial APE1/Ref-1 suppressed protein kinase C-induced mitochondrial dysfunction in mouse endothelial cells, *Mitochondrion*, v. 17, p. 42–49, 2014. doi: 10.1016/j.mito.2014.05.006
- JURÍKOVÁ, M. et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer, *Acta Histochemica*, v. 118, n. 5, p. 544–552, 2016. doi: 10.1016/j.acthis.2016.05.002
- KÖHRMANN, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature, *BMC Cancer*, v. 9, p. 1–20, 2009. doi: 10.1186/1471-2407-9-188
- KOVAC, B., MÄKELÄ, T.P., VALLENIUS, T. Increased  $\alpha$ -actinin-1 destabilizes e-cadherin-based adhesions and associates with poor prognosis in basal-like breast cancer, *PLoS ONE*, v. 13, n. 5, p. 6–8, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0196986
- KROKAN, H.E. e BJØRÅS, M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. v5, n. 4, p. a012583, 2013. doi: 10.1101/cshperspect.a012583
- KUMAR, A. et al. Aberrant DNA Double-strand Break Repair Threads in Breast Carcinoma: Orchestrating Genomic Insult Survival. *Journal of Cancer Prevention*, v. 21, n. 4, p. 227-234. 2016. doi:10.15430/jcp.2016.21.4.227. doi: 10.15430/jcp.2016.21.4.227
- LAEV, S.S.; SALAKHUTDINOV, N.F.; LAVRIK, O.I. Inhibitors of nuclease and redox activity of apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox effector factor 1 (APE1/Ref-1). *Bioorganic Med Chem*. v. 25, n. 9, p. 2531–2544, 2017. doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.028
- LEYNS, L.; GONZALEZ, L. Genomic Integrity of Mouse Embryonic Stem Cells. In: *Embryogenesis*, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.) p: 333 – 358, 2012.
- LI, M.X. et al. Targeting truncated APE1 in mitochondria enhances cell survival after oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, n. 5, p. 592–601, 2008. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.007

- LI, M.; WILSON, D.M. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. *Antioxid Redox Signal.* v. 20, n. 4, p. 678–707, 2013. doi: 10.1089/ars.2013.5492
- LIAO, Y. et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. W1, p. W199–W205, 2019.
- LIRUSSI, L. et al. APE1 polymorphic variants cause persistent genomic stress and affect cancer cell proliferation. *Oncotarget*, v. 7, n. 18, p. 26293–26306, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.8477
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.
- MA, X. et al. Downregulation of APE1 potentiates breast cancer cells to olaparib by inhibiting PARP-1 expression. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2019. doi: 10.1007/s10549-019-05189-w
- MADHUSUDAN, S. et al. Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. 15, p. 4711–4724, 2005. doi: 10.1093/nar/gki781
- MASHAYEKHI, F. et al. The association of ApE1 -656T>G and 1349T>G polymorphisms with breast cancer susceptibility in northern Iran. *Cell Mol Biol.* v. 61, n. 4, p. 70 – 74. 2015.
- MAYOR, R.; CARMONA-FONTAINE, C. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol.* v. 20, n. 6, p. 319 – 328, 2010. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.005
- NAIDU, M.D. et al. Radiation Resistance in Glioma Cells Determined by DNA Damage Repair Activity of Ape1/Ref-1, *Journal of Radiation Research*, v. 51, n. 4, p. 393–404, 2010. doi: 10.1269/jrr.09077
- NARAYAN, S. et al. Interaction between APC and Fen1 during breast carcinogenesis, *DNA Repair (Amst.)*, v. 41, p. 54 – 62, 2016. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.003
- NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/328>. Acessado em 05 de junho de 2021.
- NILSEN, H. et al. Gene-targeted mice lacking the Ung uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas. *Oncogene*. v. 22, n. 35, p. 5381–5386, 2003. doi: 10.1038/sj.onc.1206860
- OAKES, P.W. et al. Lamellipodium is a myosin-independent mechanosensor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 11, p. 2646–2651, 2018. doi: 10.1073/pnas.1715869115

OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.

PARK, J.S. et al. Human AP Endonuclease 1: A Potential Marker for the Prediction of Environmental Carcinogenesis Risk. *Oxid Med Cell Longev*. v. 2014, p. 1–15, 2014. doi: 10.1155/2014/730301

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. v. 406, n. 6797, p. 747 – 752, 2000. doi: 10.1038/35021093

PRIVAT, M. et al. A high expression ratio of RhoA/RhoB is associated with the migratory and invasive properties of basal-like breast tumors, *International Journal of Medical Sciences*, v. 17, n. 17, p. 2799–2808, 2020. doi: 10.7150/ijms.43101

RIDLEY, A.J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. v. 70, n. 3, p. 389 – 399, 1992.

ROYCHOUDHURY, S. et al. Human AP-endonuclease (APE1) is acetylated at DNA damage sites in chromatin and acetylation modulates its DNA repair activity. *Mol. Cell. Biol*, v. 37, n. 6, p. e00401-16, 2016. doi:10.1128/mcb.00401-16

RUSSO, M.T. et al. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res*. v. 64, n. 13, p. 4411-4414, 2004. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-0355

SENGUPTA, S. et al. Elevated level of acetylation of APE1 in tumor cells modulates DNA damage repair. *Oncotarget*, v. 7, n. 46, p. 75197-75209, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12113

SHAH, F. et al. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. *Precis Oncol*. v. 1, n. 1, p. 1–18, 2017. doi: 10.1038/s41698-017-0023-0

SUBIK, K. et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, v. 4, p. 35–41, 2010.

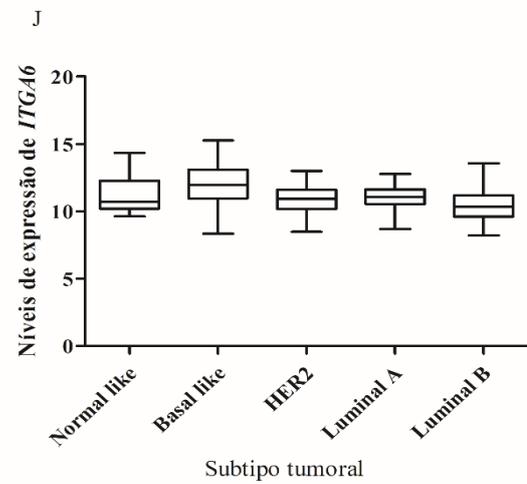
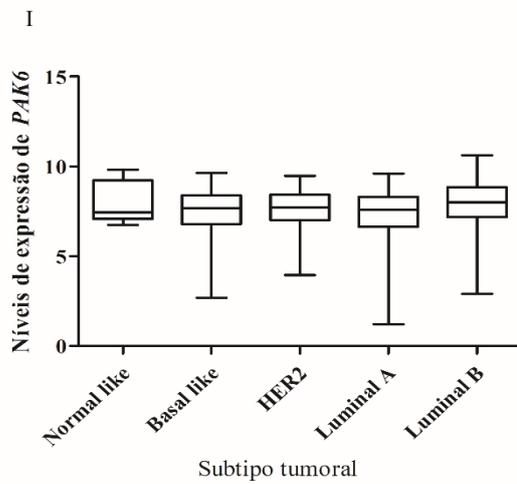
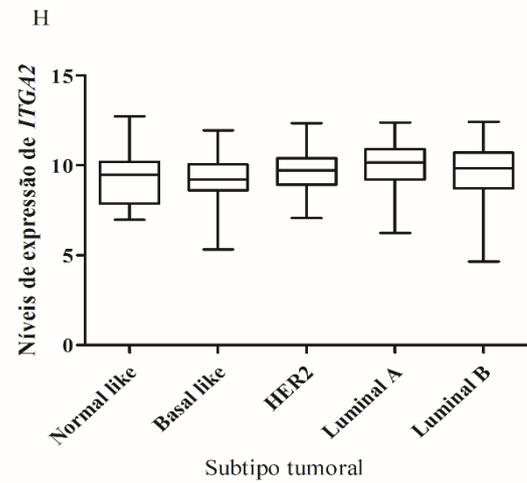
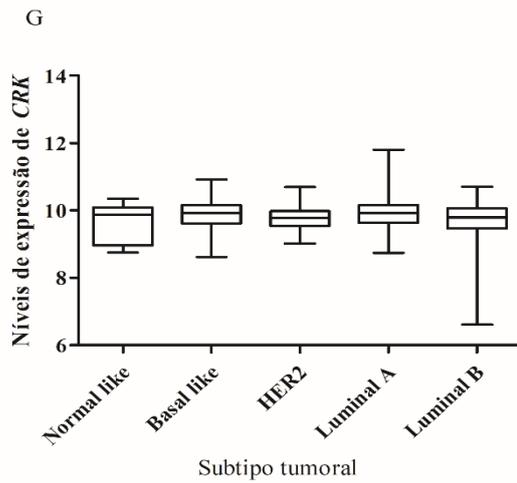
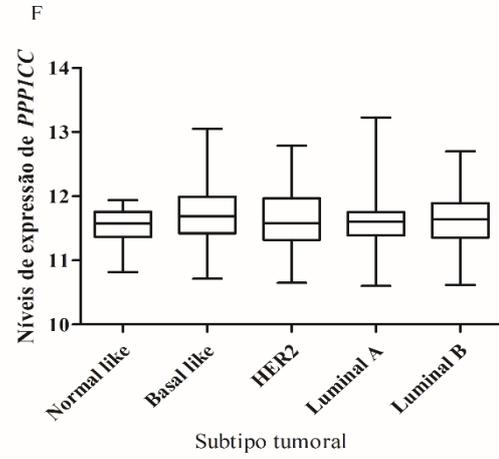
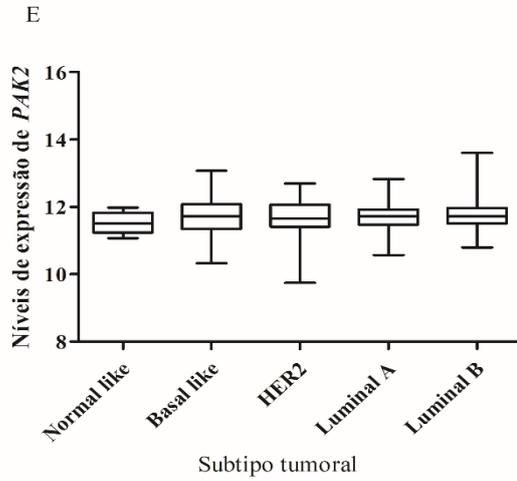
SUN, Z. et al. Differential expression of APE1 in hepatocellular carcinoma and the effects on proliferation and apoptosis of cancer cells, *BioScience Trends*, v. 12, n. 5, p. 456–462, 2018. doi: 10.5582/bst.2018.01239

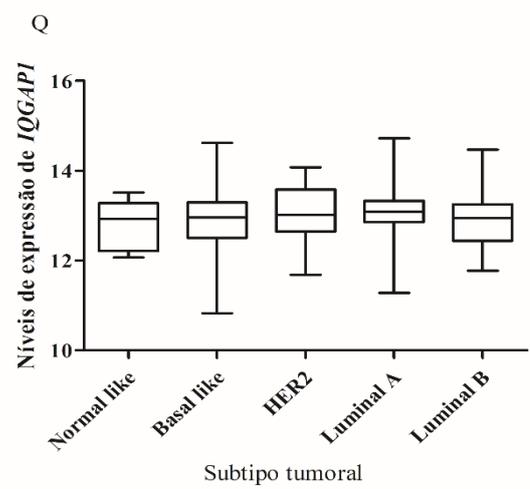
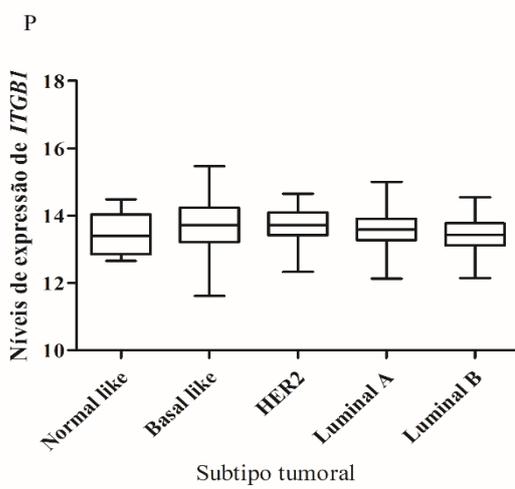
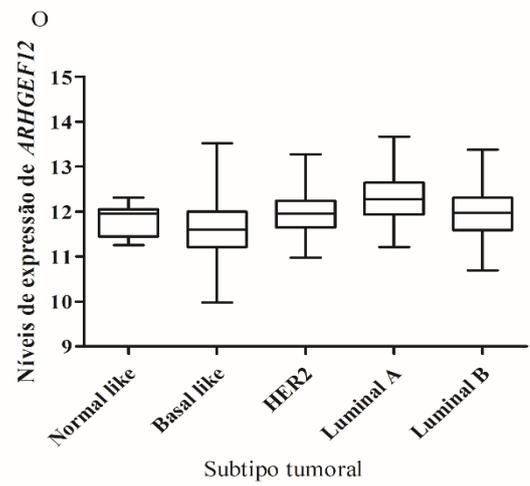
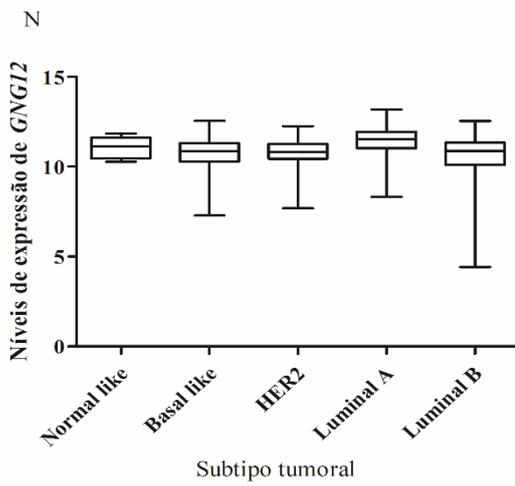
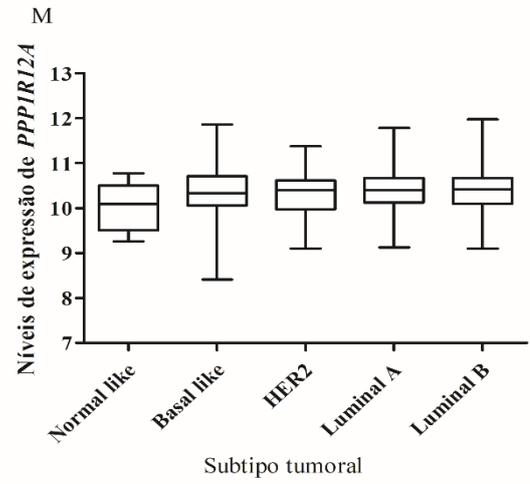
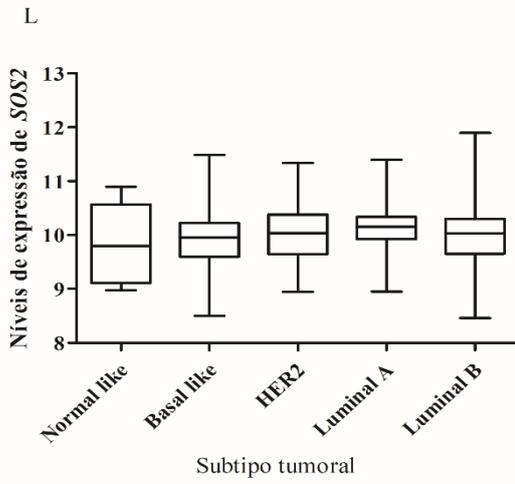
TELL, G. et al. The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme. *Antioxid Redox Signal*. v. 11, n. 3, p. 601–619, 2009. doi: 10.1089/ars.2008.2194

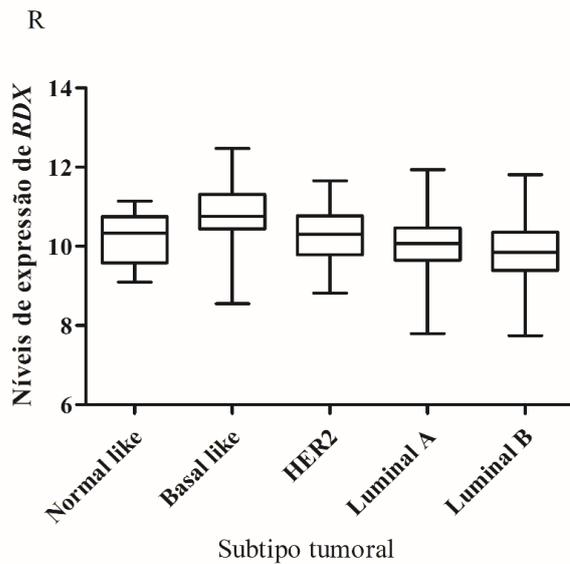
THAKUR, S. et al. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: Phytochemical modulation of its functions. *Exp Mol Med*. v. 46, n. 7, p. 106-121, 2014 doi: 10.1038/emm.2014.42

- TOMCZAK, K.; CZERWIŃSKA, P.; WIZNEROWICZ, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge, *Wspolczesna Onkologia*, v. 1A, p. A68–A77, 2015. doi: 10.5114/wo.2014.47136
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* v. 160, n. 1, p. 1 – 40. 2006. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009
- VASCOTTO, C. et al. Genome-wide analysis and proteomic studies reveal APE1/Ref-1 multifunctional role in mammalian cells, *Proteomics*, v. 9, n. 4, p. 1058–74, 2009. doi: 10.1002/pmic.200800638
- WANG, S.C. PCNA: A silent housekeeper or a potential therapeutic target?, *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 35, n. 4, p. 178–186, 2014. doi: 10.1016/j.tips.2014.02.004
- WANG, J. et al. WebGestalt 2017: A more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. W1, p. W130–W137, 2017.
- WEI, X. et al. Prediction of survival prognosis of non-small cell lung cancer by APE1 through regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget.* v. 7, n. 19, p. 28523 – 28539, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.8660
- WHITAKER, A.M.; FREUDENTHAL, B.D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon. *DNA Repair.* v. 71, p. 93 – 100, 2018. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.012
- WOO, J. et al. Prognostic Value of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1) Expression in Breast Cancer. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, e99528, 2014 doi:10.1371/journal.pone.0099528
- WU, B. et al. Lack of an Association between Two BER Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, v.7, n. 12, e50857, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050857
- XUAN, J. et al. Matrix metalloproteinase-1 expression in breast cancer and cancer-adjacent tissues by immunohistochemical staining, *Biomedical Reports*, v. 3, n. 3, p. 395–397, 2015. doi: 10.3892/br.2015.420
- ZHANG, Y. et al. Arginine methylation of APE1 promotes its mitochondrial translocation to protect cells from oxidative damage, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 158, n. June, p. 60–73, 2020. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.027
- ZHENG, Z. et al. Wild type N-Ras, overexpressed in basal-like breast cancer, promotes tumor formation by inducing IL8 secretion via JAK2 activation, *Cell Rep.* v. 12, n. 3, p. 511 – 524, 2015. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.044

**APÊNDICE A-** Expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo de acordo com subtipos tumorais







Legenda: [Continuação] Os boxplots representam as medianas e 1º e 3º quartis dos níveis de expressão de mRNA dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina de acordo com os subtipos tumorais. *PAK2* (acrônimo em inglês para *p21 (RAC1) activated kinase 2*), *PPP1CC* (acrônimo em inglês para *protein phosphatase 1 catalytic subunit gamma*), *CRK* (acrônimo em inglês para *CRK proto-oncogene, adaptor protein*), *ITGA2* (acrônimo em inglês para *integrin subunit alpha 2*), *PAK6* (acrônimo em inglês para *p21 (RAC1) activated kinase 6*), *ITGA6* (acrônimo em inglês para *integrin subunit alpha 6*), *SOS2* (acrônimo em inglês para *SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2*), *PPP1R12A* (acrônimo em inglês para *protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A*), *GNG12* (acrônimo em inglês para *G protein subunit gamma 12*), *ARHGEF12* (acrônimo em inglês para *Rho guanine nucleotide exchange factor 12*), *ITGB1* (acrônimo em inglês para *integrin subunit beta 1*), *IQGAP1* (acrônimo em inglês para *IQ motif containing GTPase activating protein 1*), *RDX* (acrônimo em inglês para *radixin*)