



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Priscyanne Barreto Siqueira

**Avaliação da relação entre APE1 e NF- κ B na regulação de genes da
transição epitélio-mesenquimal (EMT) em modelos de câncer de mama**

Rio de Janeiro

2021

Priscyanne Barreto Siqueira

**Avaliação da relação entre APE1 e NF- κ B na regulação de genes da transição
epitélio-mesenquimal (EMT) em modelos de câncer de mama**

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

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Coorientador: Dr. Bruno Ricardo Barreto Pires

Rio de Janeiro

2021

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

S618 Siqueira, Priscyane Barreto.
Avaliação da relação entre APE1 e NF- κ B na regulação de genes da transição epitélio-mesenquimal (EMT) em modelos de câncer de mama / Priscyane Barreto Siqueira. - 2021.
83f.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha
Coorientador: Prof. Dr. Bruno Ricardo Barreto Pires

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

1. Mamas - Câncer – Teses. 2. Transição Epitelial-Mesenquimal 3. NF-kappa B. I. Mencialha, Andre Luiz. II. Pires, Bruno Ricardo Barreto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Priscyenne Barreto Siqueira

**Avaliação da relação entre APE1 e NF- κ B na regulação de genes da transição
epitélio-mesenquimal (EMT) em modelos de câncer de mama**

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

Aprovada em 22 de março de 2021.

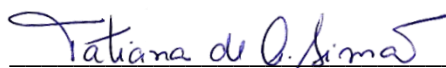
Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Ricardo Barreto Pires

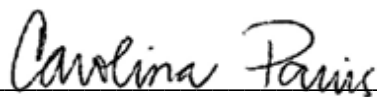
Children's Hospital of Eastern Ontario

Banca Examinadora:



Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



Prof.^a Dra. Carolina Panis

Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que sempre esteve ao meu lado, sempre se mostrando presente em minha vida.

Agradeço aos meus pais Mara Siqueira e Elcio Siqueira e à minha irmã Priscila Siqueira por todo amor, apoio e compreensão. À minha Tia Viviane Barreto e à Dinda Lília Oliveira, agradeço por todo apoio, sem a ajuda de vocês eu não chegaria até aqui.

Às minhas irmãs Gabriela e Luciana Figoly, por sempre estarem presentes em todos os momentos, vocês são meu porto seguro. Aos Tios/Pais Marina Figoly e William Jordão por sempre me incentivarem e nunca me deixarem desistir.

Aos amigos do laboratório 7 e 8, principalmente Ísis Salviano, Juliana Rodrigues, Keila Canuto, Mariana Moreno, Matheus Oliveira, Diego Sá e ao Professor Dr. Adenilson Fonseca por todos os momentos descontraídos, os sorvetes, pizzas, coxinhas e cafés! Obrigada principalmente por terem me recebido tão bem e por todo o apoio na bancada. Vocês são pessoas incríveis, meu muito obrigada.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Bruno Pires por acreditar e enxergar em mim um potencial para desenvolver este trabalho e por estar sempre solícito a me ajudar seja no que for.

Ao meu orientador Professor Dr. Andre Mencialha por me receber em seu laboratório e me ensinar tanto durante todo o mestrado. Agradeço por ser sempre tão solícito e dedicado aos seus alunos. Muito obrigada.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociência (PPGB) por todo suporte.

Por vezes sentimos que
aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

SIQUEIRA, Priscyane Barreto. **Avaliação da relação entre APE1 e NF- κ B na regulação de genes da transição epitélio-mesenquimal (EMT) em modelos de câncer de mama.**

2021. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres de todo mundo. Esta neoplasia vem apresentando um aumento da taxa de mortalidade anual, o que tem sido relacionado à detecção tardia que está diretamente relacionada a ocorrência de metástase. Nesse estágio, as células tumorais apresentam maior resistência ao tratamento, sendo necessárias estratégias para sensibilizar as células tumorais à quimioterapia. Nesse contexto, a inibição de AP-endonuclease 1 (APE1) tem sido proposta como uma possível estratégia contra a resistência aos quimioterápicos. APE1 é uma das proteínas centrais da via de reparo por excisão de base e, através do seu domínio redox, atua na modulação de fatores de transcrição, apresentando um papel fundamental no desenvolvimento do câncer. Um desses fatores de transcrição é o NF- κ B que é conhecido por atuar diretamente na promoção do fenótipo agressivo de células de câncer de mama por meio da ativação transcricional de genes reguladores da transição epitélio-mesenquimal (EMT). A EMT é considerada um dos principais mecanismos da metástase de tumores sólidos, levando as células tumorais a apresentarem um comportamento invasivo e migratório. Este trabalho tem como proposta investigar o papel de APE1 na agressividade de células de câncer de mama. Nossos resultados sugerem que o tratamento com o inibidor do domínio redox de APE1 (APX2009) é capaz de diminuir a proliferação celular, assim como a formação de colônias em duas linhagens celulares de câncer de mama com diferentes características de agressividade. Da mesma forma, o potencial de invasão de células com alto perfil de agressividade também foi reduzido após tratamento para inibição redox de APE1. Além disso, APE1 se mostrou um regulador dos níveis de mRNA de um fator de transcrição (*SNAI1*) e de marcadores clássicos do processo de EMT (*CDH2*, *FN1* e *CDH1*) e também de metaloproteinases de matriz (*MMP1* e *MMP9*), através da atividade de NF- κ B, pela análise *in silico* de dados de pacientes de câncer de mama. Com isso, esses dados reforçam para APE1 como possível foco no desenvolvimento de novas drogas anticâncer, através da utilização de inibidores da função redox.

Palavras-chave: APE1. Câncer de mama. NF- κ B. EMT.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Priscyane Barreto. **Evaluation of the relation between APE1 and NF- κ B regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) genes in breast cancer models.**

2021. 81f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. This neoplasm presents an increase in the annual mortality rate, which has been related to late detection, which is directly related to metastasis. At this stage, strategies are needed to sensitize tumor cells to chemotherapy, and AP-endonuclease 1 (APE1) is pointed out as a therapeutic target against breast cancer. Its inhibition has been proposed as a possible strategy against resistance to chemotherapy. APE1 is one of the central proteins of the repair route by base excision. Through its redox domain, it acts in the modulation of transcription factors, playing a fundamental role in cancer development. One of these transcription factors is NF- κ B, which is known to directly promote the aggressive phenotype of breast cancer cells through the transcriptional activation of genes regulating the epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT is considered one of the main mechanisms of metastasis of solid tumors, leading tumor cells to present an invasive and migratory behavior. Thus, this work investigates the role of APE1 in the aggressiveness of breast cancer cells and the correlation of APE1 and NF- κ B in the regulation of EMT genes through the TCGA-BRCA database. Our results suggest that treatment with the APE1 redox domain inhibitor (APX2009) can decrease cell proliferation, as well as the formation of colonies in two breast cancer cell lines with different aggressiveness characteristics. The invasion potential of cells with a high aggressiveness profile was reduced after treatment for APE1 redox inhibition. In addition, APE1 proved to be a regulator of the mRNA levels of a transcription factor and classic markers of the EMT process and also of matrix metalloproteinases, through NF- κ B activity by *in silico* analysis of breast cancer patient data. With that, these data reinforce APE1 as a possible focus on the development of new anticancer drugs through redox function inhibitors.

Keywords: APE1. Breast cancer. NF- κ B. EMT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Os domínios da proteína APE1	20
Figura 2 - A dupla função de APE1	21
Figura 3 - Metabolismo Redox de APE1.....	22
Figura 4 - As vias de sinalização de NF- κ B	27
Figura 5 - Estrutura química e subestrutura do APX2009.	34
Tabela 1 - Sequências dos iniciadores desenhados, mostrando as sequências forward e reverse de cada um deles.....	40
Figura 6 - Heatmap da assinatura gênica de atividade de APE1comparado com amostras de tumor primário de mama e amostras não tumorais.	43
Figura 7 - Correlação entre as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF- κ B.....	45
Figura 8 - Subtipos tumorais em pacientes com alta (high) e baixa (low) expressão das assinaturas gênicas de atividade APE1 e da via de NF- κ B	46
Figura 9 - Grau tumoral em pacientes com alta (high) e baixa (low) expressão das assinaturas gênicas de atividade APE1 e da via de NF- κ B	47
Figura 10 - Correlação da expressão das assinaturas gênicas de atividade APE1 e da via de NF- κ B com genes EMT	49
Figura 11 - Níveis de mRNA de fatores de transcrição da EMT em pacientes com assinaturas gênicas de APE1 e NF- κ B alta (high) vs baixa (low).....	51
Figura 12 - Níveis de mRNA de marcadores clássicos da EMT em pacientes com assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF- κ B alta (high) vs baixa (low).....	52
Figura 13 - Níveis de mRNA de metaloproteinases de matriz em pacientes com assinaturas gênicas de APE1 e NF- κ B alta (high) vs baixa (low).....	53
Figura 14 - Proliferação celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após tratamento com APX2009 por WST1.	54
Figura 15 - Ensaio de formação de colônia por ancoragem após tratamento com APX2009 em células MDA-MB-231	56
Figura 16 - Ensaio de formação de colônia por ancoragem após tratamento com APX2009 em células MCF-7.....	57
Figura 17 - Ensaio de migração celular por Wound Healing após tratamento com APX2009 em células MDA-MB-231	58

Figura 18 - Ensaio de migração celular por Wound Healing após tratamento com APX2009 em células MCF-7.....	59
Figura 19 - Ensaio de invasão celular por Matrigel Transwell após tratamento com APX2009 em células MDA-MB-231	60
Figura 20 - Níveis de mRNA de APEX1 após tratamento com o inibidor APX2009 na linhagem MDA-MB-231 e MCF-7.....	62
Figura 21 - Comparação dos níveis de mRNA de APEX1 entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	63
Figura 22 - Níveis de mRNA dos marcadores CDH2 na linhagem MDA-MB-231 e CDH1 na linhagem MCF-7 após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1.....	64
Figura 23 - Níveis de mRNA de MMP1 e MMP9 após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1 na linhagem MDA-MB-231.....	66
Figura 24 - Níveis de mRNA de MMP1 e MMP9 após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1 na linhagem MCF-7.	67
Figura 25 - Ilustração esquemática dos principais resultados.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTNB	<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>
DEPC	<i>Diethylpirocarbonato</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
dNTPs	<i>Desoxirribonucleotideos fosfatados</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i>
LumA	<i>Luminal A</i>
LumB	<i>Luminal B</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NF κ -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>
PR	<i>Progesterone Receptor</i>
Ref-1	<i>Redox factor 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
TCGA-BRCA	<i>The Cancer Genomic Atlas cohort breast cancer</i>
TM	<i>Temperatura de Melt</i>
TN	<i>Triplo-negativo</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
κ	kappa
<	menor que
>	maior que
CO ₂	gás carbônico
mg/mL	miligrama por mililitro
%	por cento
U/mL	unidade por mililitro
h	hora
±	mais ou menos
°C	graus Celsius
cm ²	centímetro ao quadrado
bp	base pair
min	minuto
μM	micromolar
mM	milimolar
μg	micrograma
μM	micomolar
mA	miliAmpére
rpm	rotação por minuto
μL	microlitro
mL	mililitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1. REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1. O câncer de mama	16
1.1.1 <u>Os subtipos moleculares do câncer de mama</u>	17
1.2. APE1 (AP-endonuclease 1)	19
1.2.1. <u>O metabolismo redox e os fatores de transcrição</u>	22
1.2.2. <u>APE1 e o câncer de mama</u>	23
1.2.3. <u>Moléculas inibidoras da proteína APE1</u>	24
1.3. Fator Nuclear- κ B (NF- κ B)	25
1.4. A Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT)	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo principal	30
2.2. Objetivos secundários	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. The Cancer Genome Atlas (TCGA)	31
3.2. Linhagens celulares e cultura	33
3.3. Tratamento com o inibidor da porção redox de APE1 - APX2009	34
3.4. Avaliação da proliferação celular	35
3.4.1. <u>WST1 (do inglês water soluble tetrazolium)</u>	35
3.4.2. <u>Ensaio de formação de colônias dependente de ancoragem</u>	36
3.5. Ensaio de Migração <i>Wound Healing</i>	36
3.6. Ensaio de invasão	37
3.7. Elaboração de iniciadores	38
3.8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)	39
3.8.2. <u>Tratamento com DNase</u>	39
3.8.3. <u>Síntese de cDNA</u>	40
3.8.4. <u>RT-qPCR</u>	40
3.9. Análises estatísticas	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Análise <i>in silico</i> da expressão da assinatura gênica de APE1 em amostras não-tumorais e de tumor primário de mama, através do banco de dados TCGA-BRCA	42

4.2. Análise <i>in silico</i> da relação de APE1 e NF-κB e a regulação da EMT em câncer de mama através do banco de dados TCGA-BRCA.	43
4.2.1. <u>Análise <i>in silico</i> de correlação entre as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF-κB.</u>	44
4.2.2. <u>Análise <i>in silico</i> dos subtipos tumorais e grau tumoral em pacientes com alta (high) e baixa (low) expressão das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB.</u>	45
4.2.3. <u>Correlação das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB com fatores de transcrição, marcadores clássicos e metaloproteínas de matriz envolvidos no processo da EMT. análise <i>in silico</i></u>	47
4.2.4. <u>Análise <i>in silico</i> dos níveis de mRNA de genes da EMT em pacientes com assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF-κB alta (high) vs baixa (low)</u>	50
4.3. Análise de proliferação celular das células de câncer de mama tratadas com APX2009 por WST1	53
4.4. Análise do potencial de formação de colônias de células após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1	55
4.5. Análise de migração celular em linhagens de câncer de mama após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1	58
4.6. Análise do potencial de invasão celular da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1	59
4.7. Análises dos níveis de mRNA de <i>APEX1</i> em células MDA-MB-231 e MCF-7	61
4.8. Análise dos níveis de mRNA do marcador epitelial <i>CDH1</i> e do marcador mesenquimal <i>CDH2</i> nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.	63
4.9. Análise dos níveis de mRNA das metaloproteínas de matriz (<i>MMPs</i>) nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7	65
5. DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO

Entre os recentes alvos descritos para o tratamento do câncer, AP-endonuclease 1 (APE1, do inglês: *apurinic/apyrimidnic endonuclease 1*) tem sido descrita como um candidato promissor no tratamento de cânceres metastáticos (CASTON et al., 2020; LOGSDON et al., 2018). APE1 é uma das proteínas centrais da via de reparo por excisão de base, atuando na remoção da base nitrogenada danificada, gerando um sítio abásico. Por outro lado, a proteína APE1 também apresenta um papel relevante na modulação de importantes fatores de transcrição mediada pelo domínio redox de APE1, como a Proteína ativadora-1 (AP-1), o Fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *Nuclear Factor kappa B*), p53, o Fator induzível por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α , do inglês, *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) e o Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3, do inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*). Consequentemente, APE1 promove a expressão de genes que implicam na sobrevivência, proliferação, migração/invasão, angiogênese e metástase de células tumorais (GUERREIRO et al., 2017; ROYCHOUDHURY et al., 2017).

A superexpressão de APE1 vem sendo descrita em diversos tumores como pulmão, colón, ovário, próstata e mama, mostrando relação com a agressividade e a resistência a tratamentos contra esses cânceres (CODRICH et al., 2019; GUERREIRO et al., 2017; MCILWAIN et al., 2018; WANG et al., 2009; WEN et al., 2016). Além disso, polimorfismos foram relatados no gene de APE1 (*APEX1*) e são associados a um maior risco de câncer de mama. Assim, APE1 tem se mostrado um alvo molecular promissor no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de câncer de mama (HSIEH et al., 2017; MASHAYEKHI et al., 2015).

A família NF- κ B tem sido descrita como reguladora crítica de um grande número de processos biológicos, e atua diretamente na promoção do fenótipo agressivo de células de câncer de mama por meio da ativação transcricional de genes reguladores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) (PIRES et al., 2017). A EMT é considerada um dos principais mecanismos envolvidos na metástase de tumores sólidos, levando as células tumorais a apresentarem um comportamento invasivo e migratório (GOOSSENS et al., 2017; MATYSIAK et al., 2017).

Considerando que estudos de microarranjo de DNA realizados anteriormente pelo nosso grupo, demonstraram que a inibição de APE1 modifica vias de sinalização relacionadas à adesão e também que NF- κ B tem um papel fundamental na EMT, este trabalho tem como proposta investigar o papel de APE1 na agressividade de células de câncer de mama, fazendo uma comparação entre um subtipo mais agressivo e um menos agressivo e também, a correlação

de APE1 e NF- κ B na regulação de genes da EMT, usando dados públicos de pacientes de câncer de mama disponíveis no banco de dados TCGA-BRCA.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. O câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de neoplasia que mais acomete as mulheres ao redor do mundo e é considerado um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Apenas no ano de 2020, ocorreram aproximadamente 2,2 milhões de novos casos representando 24,5% do total de cânceres estimados (WHO, 2020). Países como Austrália e Nova Zelândia apresentaram as maiores taxas de incidências dessa doença no ano de 2018 (INCA, 2020).

No Brasil, excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres em todas as regiões do país, sendo estimados 66.280 novos casos para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2021). O câncer de mama representa a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres brasileiras, com 14,23 óbitos por 100.000 mulheres em 2019. As regiões que apresentam maiores taxas de mortalidade são o Sudeste e o Sul do país, com respectivamente 16,14 e 15,08 óbitos por 100.000 mulheres em 2019 (INCA, 2020).

Diversos são os fatores de risco que estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama, como fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários. Entretanto, o mais importante deles é a idade pois a ocorrência desse tipo de câncer tende a crescer progressivamente em mulheres, a partir dos 50 anos. Além disso, o risco de mortalidade aumenta 10 vezes a partir dos 60 anos (INCA, 2020).

Embora existam políticas públicas de incentivo ao diagnóstico precoce do câncer de mama, no Brasil é observado um aumento anual da taxa de mortalidade por este câncer entre mulheres. Essa alta mortalidade tem sido relacionado à detecção tardia, onde o câncer se apresenta, na maioria das vezes, em estágios avançados aumentando a possibilidade da ocorrência de metástase (OHL *et al.*, 2016). Nessa etapa mais agressiva da doença, as células tumorais apresentam maior resistência aos tratamentos, diminuindo as chances de recuperação e a sobrevivência dos pacientes.

Os tumores de mama podem evoluir por diferentes formas, onde cada tumor apresenta características próprias. Assim, eles foram classificados em subtipos de acordo com suas características clínicas e moleculares.

1.1.1. Os subtipos moleculares do câncer de mama

O câncer de mama se apresenta de forma heterogênea e com comportamento clínico altamente variável. Sendo assim, compreender seu comportamento pode aumentar as alternativas de tratamento. Com isso, os tumores de mama foram classificados em subtipos de acordo com a expressão de marcadores moleculares e com perfil de expressão gênica. Essa classificação molecular subdivide os tumores de mama em três grupos: receptor de estrógeno (ER) e/ou progesterona (PR) positivos; HER2 (do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) positivo (HER2-positivo); e os triplo negativos (TN), que não apresentam expressão de nenhum dos três marcadores anteriores. Essa separação em grupos que expressam ou não os marcadores citados permite uma classificação de prognóstico bom ou ruim, sendo altamente relevante no ponto de vista clínico, considerando que as terapias atuais são centradas na terapia antiestrogênica, quimioterapia e agentes direcionados a HER2 (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018).

A partir dessa subdivisão de grupos, a classificação molecular mais atual subdivide os tumores de mama em seis categorias, sendo elas: Luminal A (LumA), Luminal B (LumB), HER2, *Basal-like*, *Normal-like* e *Claudin-low*.

O subtipo LumA é caracterizado pela expressão positiva de ER e/ou de PR, ausência da expressão do receptor HER2 (HER2-negativo) e baixa expressão do marcador de proliferação Ki-67. Esse subtipo é considerado de bom prognóstico e apresenta uma frequência de 30-40% dos casos (GAO; SWAIN, 2018). Por expressar positivamente os receptores de estrógeno e progesterona, os tumores luminais A podem ser tratados adequadamente com terapia hormonal (DAI *et al.*, 2015)

O LumB é um subtipo considerado de prognóstico intermediário pois também apresenta expressão positiva de ER, tem baixa expressão de PR, é HER2-negativo e expressa um nível mais alto do marcador de proliferação Ki-67 quando comparado com o subtipo LumA. Além disso, alguns tumores LumB podem apresentar expressão positiva para o receptor HER2 (LI, Z. *et al.*, 2016). De acordo com o Consenso de St Gallen de 2013, o subtipo LumB foi responsável por quase 40% de todos os cânceres de mama (METZGER-FILHO *et al.*, 2013). A combinação de quimioterapia e tratamento hormonal pode ser a melhor estratégia terapêutica para os tumores desse subtipo (DAI *et al.*, 2015).

A outra categoria é a do subtipo HER2, que é caracterizado por apresentar expressão positiva exclusiva de HER2, sendo negativo para ER e PR. Sua prevalência ocorre em torno de

10-15% e é considerado de pior prognóstico (RUSSNES *et al.*, 2017). Embora os tumores de mama HER2-positivo tenham um prognóstico ruim, eles são sensíveis as quimioterapias convencionais, com resposta patológica completa significativamente maior do que os tumores de mama luminais (DAI *et al.*, 2015).

O *Basal-like* é um subtipo considerado de pior prognóstico e que apresenta frequência de 15-25% dos casos de câncer de mama. É caracterizado pela ausência da expressão dos marcadores ER, PR e HER2, fazendo parte do grupo TN. No entanto, esse subtipo apresenta expressão aumentada de marcadores basais como citoqueratinas (CK5/6, CK14 e CK17) e EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) (MILIOLI *et al.*, 2017). Considerando o status de tumor TN, o subtipo basal-like não é receptivo às terapias convencionais direcionadas ao câncer de mama, deixando a quimioterapia como única opção no arsenal terapêutico.

Já o subtipo *Normal-like* apresenta controvérsias em relação a sua classificação, pois possui similaridades de expressão com células normais e não apresenta marcadores tumorais em quantidades consideráveis. Acredita-se que esse subtipo represente uma contaminação com amostras de mama não tumoral, ocorrida durante as análises para sua caracterização. Com isso, esse subtipo não tem sido utilizado em estudos recentes (DAI *et al.*, 2015; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018; YERSAL, 2014)

Por fim, o *Claudin-low* foi um subtipo descrito pela primeira vez no ano de 2007 por Herschkowitz *et al.* (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007) e também faz parte do grupo TN não expressando nenhum dos marcadores utilizados nas classificações anteriores. Desde a sua descrição, esse subtipo indicou uma prevalência de 7-14% de todos tumores de mama invasivos, sendo considerado de pior prognóstico entre todos os subtipos (DIAS *et al.*, 2017). O *Claudin-low* é caracterizado por apresentar alta expressão de genes associados à EMT e baixa expressão de claudinas 3, 4 e 7, que são genes de adesão célula-célula, e também de ocludinas e E-caderina (DIAS *et al.*, 2017). Além disso, esse subtipo possui alta expressão de marcadores de células endoteliais e linfócitos, além de células frequentes observadas no tecido tumoral mamário residual após terapia hormonal ou quimioterapia (SABATIER *et al.*, 2014).

Dentre os subtipos de pior prognóstico, há a ocorrência de resistência aos quimioterápicos convencionais do tratamento contra o câncer de mama. Com isso, são necessárias estratégias para sensibilizar as células tumorais à quimioterapia. Pesquisas apontam a proteína APE1 é como um alvo terapêutico contra o câncer de mama, e sua inibição tem sido apontada como uma possível estratégia contra a resistência aos quimioterápicos (FISHEL; KELLEY, 2007; TELL; FANTINI; QUADRIFOGLIO, 2010).

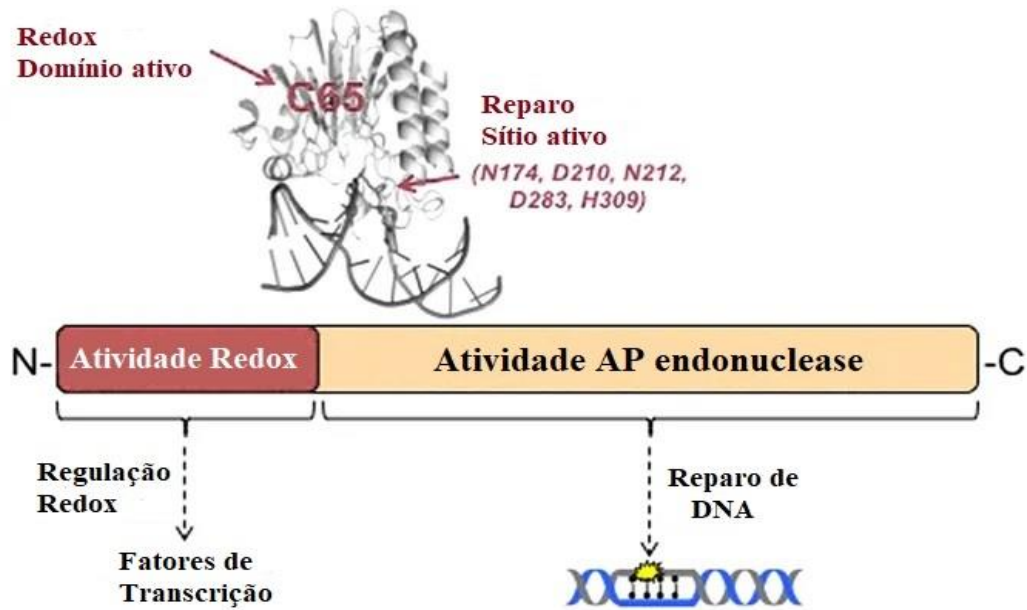
1.2. APE1 (AP-endonuclease 1)

APE1, também conhecida como APE1/Ref-1 (Ref-1 do inglês, *redox fator 1*), é o ortólogo mamífero de *Escherichia coli Xth* (exonuclease III), sendo uma proteína multifuncional codificada pelo gene *APEX1* (do inglês: apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1) (HGNC, 2020). Esse gene está localizado no cromossomo 14 q11.2-12 e consiste em quatro íntrons e cinco exons, e codifica uma proteína de 318 aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 35 kDa (CHOI; JOO; JEON, 2016).

APE1 apresenta dois domínios em sua conformação (Figura 1). O primeiro é o domínio C-terminal que é essencial para a sua atividade no reparo do DNA, se ligando diretamente a fita de DNA danificada e deslizando em busca de sítios AP (WHITAKER; FREUDENTHAL, 2018). O outro domínio é o N-terminal, que apresenta uma região de sinal de localização nuclear, e vai apresentar uma funcionalidade importante na atividade redox de APE1 (ABBOTTS; MADHUSUDAN, 2010).

A proteína APE1 possui sete resíduos de cisteína em sua estrutura, onde três estão localizados no domínio redox N-terminal (Cys65, Cys93 e Cys99). Estudos com a cisteína Cys65 tem sugerido essa cisteína como nucleófila e que reduz os fatores de transcrição. Os estudos também mostraram que a substituição dessa cisteína pelo aminoácido alanina torna o domínio redox de APE1 inativo, sugerindo que é ela quem está relacionada com a redução de fatores de transcrição para a ativação dos mesmos. (WALKER et al, 1993; LUO, et al, 2012). Além disso, a função redox e a Cys65 estão presentes apenas em proteínas APE1 de mamíferos, apoiando o papel crítico de Cys65 na atividade redox de APE1 (GEORGIADIS *et al*, 2008).

Figura 1 - Os domínios da proteína APE1

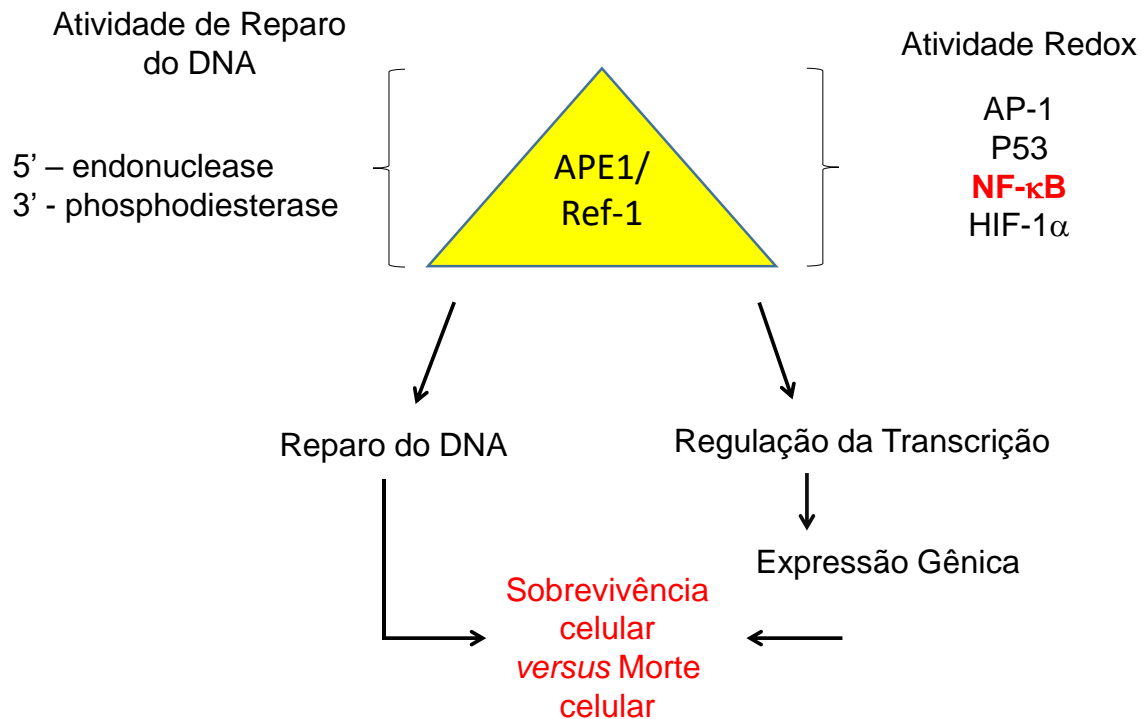


Legenda: Conformação dos domínios da proteína APE1. Domínio N-terminal que atua na regulação redox ativando fatores de transcrição e o domínio C-terminal voltando para a atuação no reparo do DNA.

Fonte: Modificado de SHAH, LOGSDON, *et al.*, 2017.

A proteína APE1 é principalmente conhecida por sua atuação no reparo de DNA, sendo essencial na via de reparo por excisão de base (BER, o inglês *Base Excision Repair*). Essa via é responsável por restaurar danos ao DNA causados por oxidação, alquilação e quebras de fita simples. A APE1 então, é responsável por remover a base danificada e atua clivando o suporte fosfodiéster do DNA na região terminal 5' de um sítio apurínico / apirimidínico (AP), gerando um corte no DNA com 3'hidroxila e 5'dRP terminais (WHITAKER; FREUDENTHAL, 2018). Além disso, ela também modula o status redox e, portanto, atua como co-ativador de vários fatores de transcrição (Figura 2) (CHOI; JOO; JEON, 2016).

Figura 2 - A dupla função de APE1



Legenda: Atuando no reparo de DNA, a proteína APE1 é a principal enzima da via de reparo por excisão de base (BER). Como uma proteína redox, APE1 atua como ativador de fatores de transcrição, incluindo AP-1, p53, NF- κ B, HIF-1 α e outros.

Fonte: Modificado de RAFFOUL, HEYDARI, *et al.*, 2012.

A proteína APE1 tem sua localização observada principalmente no núcleo, onde realiza sua função de atuação no reparo do DNA e na atividade de regulação transcricional. No entanto, já foi relatada a presença dessa proteína no citoplasma e na mitocôndria de alguns tipos celulares, principalmente nos tipos em que há altas taxas metabólicas ou proliferativas (PARK *et al.*, 2013; TELL *et al.*, 2005).

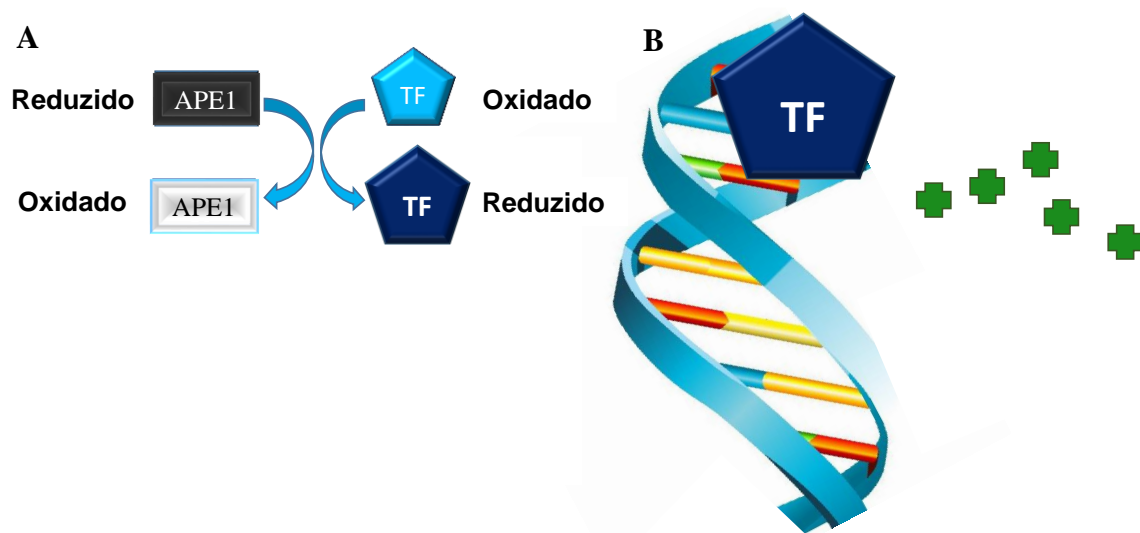
A função redox de APE1 é independente da função de reparo, e tem sido relatada em inúmeros trabalhos mostrando sua atuação na ativação de diversos fatores de transcrição e, conseqüentemente, alteração no metabolismo celular (CODRICH *et al.*, 2019; DOMENIS *et al.*, 2014; FISHEL *et al.*, 2019; GUERREIRO *et al.*, 2017; MCILWAIN *et al.*, 2018).

1.2.1. O metabolismo redox e os fatores de transcrição

A sinalização redox de APE1 ocorre exclusivamente nos mamíferos, e é um processo controlado que conduz a atividade de diversos fatores de transcrição, afetando a expressão gênica e a produção de proteínas. A função redox de APE1 é completamente independente da função de reparo e sua ativação vai depender principalmente da redução de resíduo de cistina Cys65, que é encontrado no domínio N-terminal (KELLEY; M. R., GEORGIADIS; L., FISHEL, 2012).

Para atuar como co-ativador de fatores de transcrição, APE1 se encontra em estado reduzido, e isso ocorre por meio de uma troca tiol/sulfeto com tioredoxina. A junção da cisteína nucleofílica à ligação dissulfeto do fator de transcrição inativo resulta na geração de uma ligação dissulfeto entre o domínio redox e o fator de transcrição. Esta ligação então, leva ao fator de transcrição reduzido e o domínio da proteína APE1 redox oxidado, levando a ativação dos fatores de transcrição que se ligam em suas regiões promotora do DNA (Figura 3) (CASTON *et al.*, 2020).

Figura 3 - Metabolismo Redox de APE1



Legenda: A função de APE1 na oxidação-redução. Em uma troca de tiol/sulfeto no resíduo de cisteína, APE1 reduz fatores de transcrição (TF) para sua forma ativada. APE1 é oxidado nesse processo (A). O Fator de transcrição reduzido pode se ligar ao DNA, o que desencadeia uma síntese de RNA e proteínas subsequentes (em verde) que afetam o crescimento celular, inflamação, metástases e angiogênese (B).

Fonte: Modificado de SHAH, LOGSDON, *et al.*, 2017.

Como já citado anteriormente, os fatores de transcrição regulados por APE1 incluem principalmente AP-1, NF- κ B, HIF-1 α , p53 e STAT3. Esses fatores estão envolvidos em muitos processos celulares como crescimento celular, inflamação e angiogênese (CARDOSO *et al.*, 2012; LOGSDON *et al.*, 2018). Considerando essas atuações, a superexpressão de APE1 altera a regulação desses fatores e conseqüentemente, altera suas ações, levando a uma alteração no metabolismo celular. Com isso, APE1 está relacionada com o processo de tumorigênese, sendo um dos responsáveis por ocasionar crescimento tumoral, migração, sobrevivência tumoral e também em processos inflamatórios e de angiogênese (CASTON *et al.*, 2020).

1.2.2. APE1 e o câncer de mama

Ao longo do tempo diversos autores vem demonstrando que APE1 é superexpresso em vários tumores como pulmão, colón, ovários, próstata e mama (CODRICH *et al.*, 2019; GUERREIRO *et al.*, 2017; MCILWAIN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2009; WEN *et al.*, 2016). Além disso, a superexpressão de APE1 foi correlacionada com fenótipos tumorais mais agressivos e de pior prognóstico (WOO *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, APE1 tem ganhado uma crescente atenção como alvo terapêutico para o câncer. A função de reparo do DNA é foco principal para o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras em uma tentativa de atuar contra a resistência as terapias atuais, aumentando a morte de células cancerosas. Além disso, a função redox de APE1 também está ganhando atenção como possível alvo terapêutico, pois, a inibição da função redox de APE1 pode prejudicar simultaneamente várias vias de desenvolvimento e progressão do câncer (GUERREIRO *et al.*, 2017).

Woo *et al* (2014) sugeriram que a expressão de APE1 é predominantemente nuclear tanto em amostras de mama normal quanto no câncer de mama, e o nível de expressão de APE1 no câncer de mama foi aumentado. Além disso, ALMUTAIRI *et al.*, (2015) sugerem que um polimorfismo Asp148Glu observado no gene de APE1 está relacionado com o aumento no risco de desenvolvimento de tumor de mama (ALMUTAIRI *et al.*, 2015). Com isso, a relação de APE1 e o câncer de mama tem se mostrado como um interessante alvo de estudos, considerando que essa proteína pode ser um importante marcador para uma terapêutica mais específica e possivelmente, mais eficaz. Além disso, a inibição de APE1 tem sido apontada como uma

estratégia viável para sensibilizar células tumorais à quimioterapia (FISHEL; KELLEY, 2007; TELL; FANTINI; QUADRIFOGLIO, 2010).

1.2.3. Moléculas inibidoras da proteína APE1

Nos últimos anos, diversos inibidores foram desenvolvidos para APE1, sendo específicos e direcionados às funções de reparo de DNA e a sua função redox (CODRICH *et al.*, 2019; KELLEY *et al.*, 2016; LAEV; SALAKHUTDINOV; LAVRIK, 2017). Entre os inibidores da atividade de endonuclease de APE1, podemos citar o Composto #3, CRT0044876, Espiclomazina, Fiduxosina e SB206553. O Composto #3 bloqueia a atividade de endonuclease de APE1 atuando como um inibidor competitivo ao se ligar ao sítio ativo da enzima (RAI *et al.*, 2012). O CRT0044876 tem como alvo o sítio ativo da APE1 e inibe suas atividades 3'-fosfodiesterase e 3'-fosfatase - etapas essenciais no reparo de excisão de base (WILSON; SIMEONOV, 2010). As moléculas de Espiclomazina, Fiduxosina e SB206553 atuam inibindo a interação de APE1 com NPM1(Nucleofosfomina)¹ através da ligação direta ao domínio N-terminal de APE1 e Poletto *et al.*, (2016) sugerem que esses inibidores alteram a localização e a atividade da endonuclease de APE1, mas não a maturação do rRNA.

Entre os inibidores da porção redox de APE1, os mais comumente utilizados em estudos são o APX3330 (ou E3330 como é amplamente conhecido) e o APX2009 (FISHEL *et al.*, 2019; GUERREIRO *et al.*, 2013 and 2017; KELLEY *et al.*, 2016; MCILWAIN *et al.*, 2018). Atualmente, APX3330 está sendo testado em ensaios clínicos e concluiu, com segurança, a fase I dos ensaios em câncer (CHU *et al.*, 2019; SHAHDA *et al.*, 2019). O APX2009, faz parte da segunda geração de moléculas produzidas a partir de APX3330 e ambos os inibidores atuam aumentando as ligações dissulfeto envolvendo resíduos de Cys-65 e / ou Cys-93, levando a inativação do domínio redox de APE1 (CODRICH *et al.*, 2019).

Alguns autores já sugeriram que a inibição específica do domínio redox de APE1 por inibidores como o APX3330 ou APX2009 levam a uma redução da proliferação celular de cânceres como, bexiga, cólon, pâncreas e próstata (CODRICH *et al.*, 2019; FISHEL *et al.*, 2011, 2019; MCILWAIN *et al.*, 2018). Redução no potencial de migração também foi sugerido após

¹ Proteína envolvida na biogênese de rRNA

tratamento com o inibidor APX3330 em linhagens celulares de câncer de próstata (JIANG, Y. *et al.*, 2010; ZOU; MAITRA, 2008).

Para o câncer de mama, Guerreiro *et al* (2013 e 2017) indicaram que o inibidor APX3330 leva a uma redução da proliferação, do potencial clonogênico e do potencial migratório e invasivo de células de câncer de mama. Por outro lado, não há relatos na literatura do tratamento com o inibidor APX2009 no câncer de mama.

Como já citado anteriormente, o domínio redox de APE1 atua como ativador de diversos fatores de transcrição, dentre eles, o NF- κ B. Mcilwain *et al.*, (2018) apontaram que o inibidor, APX2009 reduz a expressão de mRNA de survivina² e influencia na atividade de NF- κ B em células de câncer de próstata. Ao inibir o domínio redox de APE1 com APX2009 e inibir NF- κ B, eles observaram uma diminuição significativa de duas vezes na atividade de luciferase conduzida por NF- κ B.

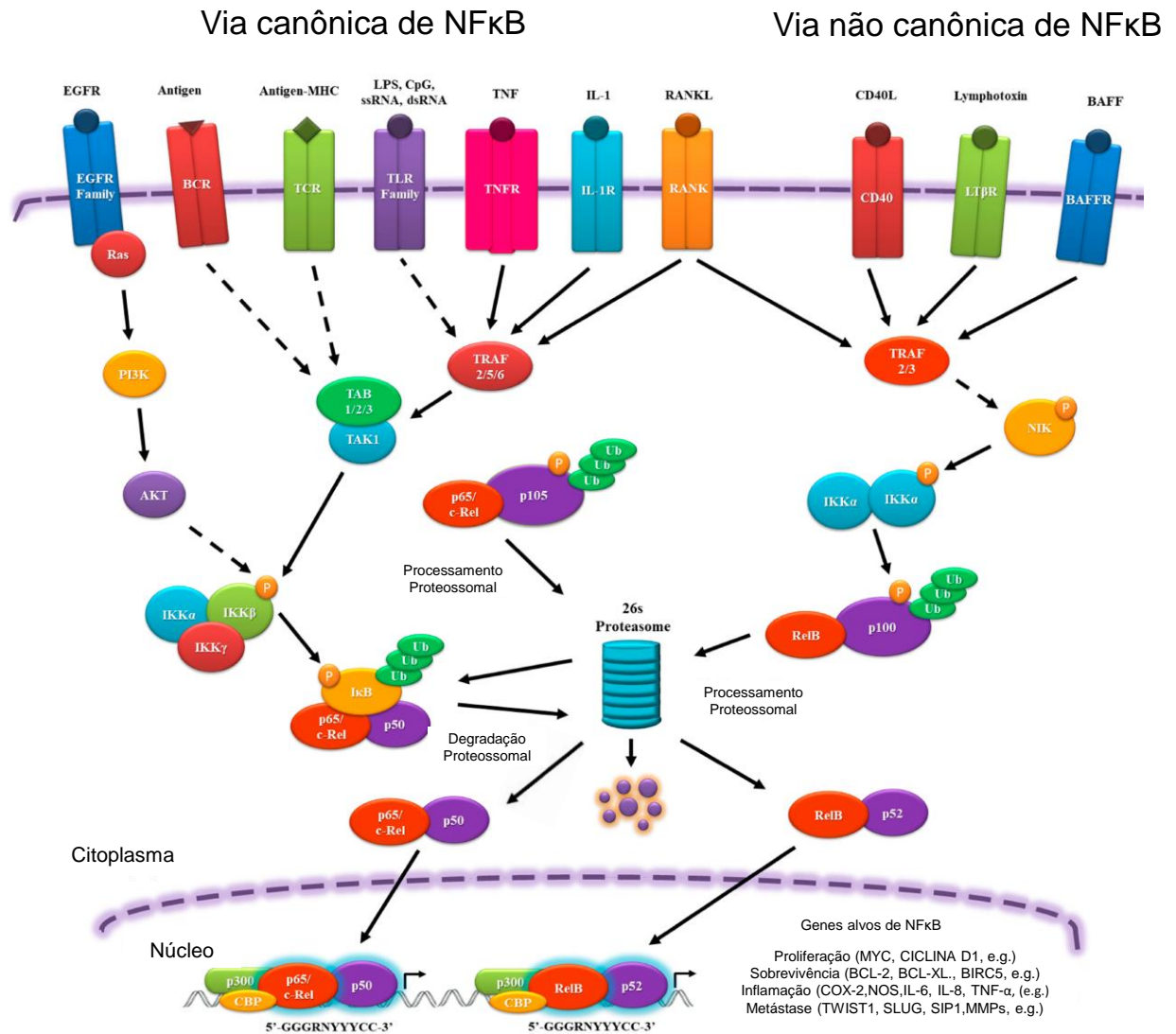
Diante de poucos dados a respeito do papel redox de APE1 em câncer de mama, tão quanto a avaliação do inibidor APX2009 como agente antitumoral, somando-se a escassez de investigações da relação entre APE1 e eventos celulares coordenados por NF- κ B, esses eventos tornaram-se foco da presente dissertação.

1.3. Fator Nuclear- κ B (NF- κ B)

NF- κ B consiste em uma família de fatores de transcrição que foi descrita pela primeira vez em 1986 por SEM e BALTIMORE ao observarem a sua ligação ao DNA no *enhancer* intrônico da cadeia leve da imunoglobulina kappa. A família consiste em cinco subunidades: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel (Rel) e RelB, que se associam para formar homo e heterodímeros funcionais a partir de uma região altamente conservada no domínio N-terminal conhecida por “domínio de homologia REL” (RHD, do inglês *REL homology domain*), que também vai ser importante para a ligação ao DNA (PIRES *et al.*, 2018). A formação de homo e heterodímeros pode ocorrer por combinação entre todos os membros da família, no entanto, alguns apresentam mais afinidade que outros. O heterodímero mais estável e abundante é o p65/p50, e pode ser encontrado na forma latente em diversos tipos de tecidos (HUANG *et al.*, 1997).

² Membro da família de proteínas do inibidor de apoptose (IAP) que inibe as caspases e bloqueia a morte celular, é altamente expressa na maioria dos cânceres e está associada a um pior prognóstico.

A ativação da via de NF- κ B resulta basicamente da transferência de fosfato e pode ocorrer da forma clássica (via canônica) ou da forma alternativa (via não canônica) (Figura 4). Na via canônica, as proteínas do heterodímero p65/p50 de NF- κ B estão usualmente inativadas enquanto ligadas a proteína inibidora I κ B (do inglês, *Inhibitor of NF- κ B*). Para que este complexo seja liberado do seu inibidor, a proteína I κ B deve ser fosforilada pelo complexo I κ B quinase (IKK, *I κ B Kinase*), o que leva à ubiquitinação de I κ B e degradação subsequente pelo proteossoma 26S. Assim, os dímeros de NF- κ B são translocados para o núcleo celular e ativam a transcrição gênica (CHEN; CHEN, 2013). Na via não canônica não há atuação de I κ B, entretanto, o complexo RelB/p100 é inativo no citoplasma. Nessa via, a quinase NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) fosforila o homodímero de IKK α , que estando ativo, fosforila então o precursor p100 que é processado proteoliticamente em p52. Assim, p52 forma um heterodímero com RelB e são translocados para o núcleo para ativar a transcrição gênica (CHEN; CHEN, 2013; SUN, 2011).

Figura 4 - As vias de sinalização de NF- κ B

Legenda: Visão esquemática das vias de sinalização canônica e não canônica do complexo NF- κ B que ocorrem no citoplasma celular, e ao serem ativados, são transportados para o núcleo celular e atuam na ativação de genes relacionados à proliferação e sobrevivência celular, além de inflamação, e metástase.

Fonte: Adaptado de PIRES et al., 2018.

Diversos autores já demonstram que a expressão gênica mediada por NF- κ B é regulada pela atividade redox de APE1, sem efeitos na degradação de I κ B (CESARATTO *et al.*, 2013; NISHI *et al.*, 2002; SHIMIZU *et al.*, 2000; ZOU; MAITRA, 2008). NISHI *et al.*, (2002) indicaram que enquanto a subunidade p65 e a maioria dos resíduos de cisteína da subunidade p50 tem sua forma reduzida semelhante no citoplasma e no núcleo, Cys-62 de p50 é altamente oxidada no citoplasma e fortemente reduzida no núcleo. Como a forma reduzida de Cys-62 é essencial para a atividade de ligação ao DNA de NF- κ B, esses autores sugerem que o fator redox de APE1 está envolvido na redução de Cys-62 no núcleo, impedindo assim a ligação de

NF- κ B ao DNA e conseqüentemente, bloqueando sua atuação como fator de transcrição. No entanto, o mecanismo envolvendo a relação de APE1 e NF- κ B precisa ser melhor explorado no câncer de mama, visando um potencial terapêutico.

O complexo NF- κ B tem sido descrito como regulador de inúmeros processos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação, respostas imunes e inflamação, tanto sobre condições fisiológicas normais, quanto em células tumorais. Além disso, o fator de transcrição NF- κ B se mostrou significativo no desenvolvimento e manutenção do câncer por apresentar um papel na regulação inflamatória, na formação do microambiente tumoral e na resistência à tratamentos quimioterápicos e à radioterapia, sendo um importante marcador de pior prognóstico (PIRES *et al.*, 2018).

Recentemente, uma pesquisa indicou que o NF- κ B é importante para a metástase do câncer de mama, por meio da ativação transcricional de genes reguladores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) (PIRES *et al.*, 2017).

1.4. A Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT)

Descrito inicialmente em 1982 por Elizabeth Hay, a EMT é um processo biológico celular que acontece naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, sendo responsável pelo controle da morfologia e arquitetura celular durante a reorganização dos folhetos embrionários. Além disso, também ocorre em diversos tipos de tecidos e estágios de desenvolvimento (ZHANG, Y.; WEINBERG, 2018).

A EMT tem um papel essencial em diversos processos patológicos, incluindo cicatrização de feridas, fibrose de tecido e progressão do câncer. Nas últimas duas décadas a importância desse processo foi estabelecida por um número crescente de estudos demonstrando a ativação da EMT durante o desenvolvimento do câncer, sendo considerado um dos principais mecanismos envolvidos na metástase de tumores sólidos (NIETO *et al.*, 2016; SHIBUE; WEINBERG, 2017).

Durante a EMT, as células tumorais perdem suas características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal levando a um comportamento invasivo e migratório. Esta troca fenotípica é um processo reversível e é regulado principalmente pelos fatores de transcrição *SNAIL1*, *SLUG* (*SNAIL2*), *TWIST1* e *SIP1* (*ZEB2*), que regulam negativamente moléculas de adesão como E-caderina, Claudinas e Ocludinas, e regulam positivamente os marcadores

mesenquimais como N-caderina, Vimentina e Fibronectina. Além disso, esses fatores estimulam a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) que vão ocasionar a degradação da matriz extracelular. (GOOSSENS *et al.*, 2017; MATYSIAK *et al.*, 2017).

Estudos mostram que a expressão dos fatores de transcrição da EMT estão correlacionados positivamente com NF- κ B em diversos tipos de cânceres, como mama, próstata, carcinoma renal e carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (NEIL; SCHIEMANN, 2008; PANTUCK *et al.*, 2010; PIRES; MENCALHA; ABDELHAY, 2013; ZHANG, Q. *et al.*, 2009). Utilizando células de câncer de mama, PIRES *et al.* (2017) demonstraram que o NF- κ B/p65 regula regiões promotoras de *SLUG*, *TWIST1* e *SIP1*, atuando como ativador desses fatores. Além disso, a inibição de NF- κ B/p65 diminuiu os níveis dos fatores de transcrição da EMT nas células agressivas. Com isso, eles demonstraram o envolvimento transcricional de NF- κ B na regulação de genes da EMT promovendo um fenótipo agressivo de células de câncer de mama (PIRES *et al.*, 2017).

Assim, considerando que APE1 já foi mostrado como regulador de NF- κ B, este trabalho tem como proposta avaliar a correlação de APE1 com NF- κ B e investigar a relação de APE1 na regulação de genes de fatores de transcrição e marcadores clássicos da EMT através da atuação de NF- κ B.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar o papel de APE1 na regulação de genes da EMT e a sua correlação com NF- κ B em câncer de mama.

2.2. Objetivos secundários

- a) Avaliar os perfis gênicos relacionados com a sinalização de APE1 e NF- κ B de amostras do banco de dados do TCGA/BRCA;
- b) Correlacionar as assinaturas gênicas de APE1 e de NF- κ B, assim como sua relação com dados clínicos-patológicos de amostras do banco de dados TCGA/BRCA;
- c) Verificar associação entre os níveis de expressão das assinaturas de APE1 e de NF- κ B, com genes envolvidos no processo de EMT;
- d) Avaliar *in vitro* o papel de APE1 no potencial de proliferação, formação de colônia, migração e invasão das células de linhagens de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7;
- e) Avaliar *in vitro* a contribuição de APE1 na regulação dos níveis de mRNA de genes da EMT e metaloproteinases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Para as análises *in silico* dos níveis de mRNA, subtipos e grau tumoral, foram utilizados dados públicos de pacientes com câncer de mama, obtidos do TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) com coort BRCA. O TCGA é um projeto que disponibiliza dados de sequenciamento do genoma e bioinformática, e é composto por diversos tipos de cânceres. A coort BRCA faz parte do projeto do TCGA, e é composta apenas por amostra de paciente com 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 microarray 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 baixos de acordo com perfis gênicos relacionados à análise. Ou seja, a coorte dos pacientes é organizada e distribuída desde altos até baixos níveis de expressão de acordo com o resultado final da equação. Para a realização deste trabalho, foram usadas três assinaturas gênicas para selecionar grupos de pacientes, sendo elas a assinatura de atividade de APE1, assinatura de atividade de NF-κB e assinatura de genes que caracterizam o perfil tumoral *Claudin-low* para identificação de pacientes com esse subtipo tumoral.

A assinatura de atividade de APE1 utilizada neste trabalho é composta por genes que se correlacionaram com APE1 em pacientes de câncer de mama. Essa assinatura é composta por genes regulados positivamente (+) e negativamente (-) e a equação gerada foi = + *RPLP1* + *PRPF19* + *TUFM* + *PHB* + *LRRC59* + *AHCY* + *NME1* + *TUBA1B* + *CDK5* + *KPNA2* + *FNI* + *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* + *ARCNI* + *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. Essa assinatura foi cedida pelo autor Emiliano Dalla (AYYILDIZ *et al.*, 2020). Os pacientes com maiores valores de expressão da equação dessa assinatura foram classificados como alta atividade de APE1.

A assinatura de NF-κB é composta por genes envolvidos na regulação da sinalização e atividade da via de NF-κB. Popeda, *et al.* (2019) apontaram 26 genes que apresentam uma relação geral com a sinalização de NF-κB, incluindo as subunidades e inibidores / reguladores de todo o complexo de NF-κB. Dentre esses genes, foram selecionados um top 12 genes regulados positivamente que foram mais expressos em células tumorais circulantes (CTCs) mesenquimais, levando assim, a uma característica mesenquimal dessa assinatura. A equação usada para análises na plataforma UCSC Xena foi: = + *FADD + TLR7 + CCRL2 + PBK + TNFSF13 + BIRC5 + TNFRSF11A + IL1RAP + IRF3 + TICAM1 + PSMD7 + TAPBP*. Os pacientes com maiores valores de expressão da equação dessa assinatura foram classificados como alta atividade de NF-κB e considerados de fenótipo mesenquimal.

Para análise de comparação da atividade de APE1 através da assinatura gênica nas amostras de tumor primário comparando com amostras não-tumorais, foram utilizadas um total de 532 amostras de tumor primário e 114 amostras não-tumorais de mama (compostas por tecido normal adjacente).

Para a realização das análises, quanto a relação de APE1 e NF-κB, primeiramente foram selecionados aqueles pacientes que expressavam assinatura *high* ou *low* de APE1 ou NF-κB através da divisão em quartil, sendo considerado 75% para *high* e 25% para *low*. Em seguida foram selecionados apenas aqueles pacientes que expressavam a assinatura *high* ou *low* de APE1 e também a de NF-κB. O número total de pacientes selecionados foi de 69 pacientes APE1 e NF-κB *high* e de 70 pacientes para APE1 e NF-κB *low*. Então, foi realizada uma análise de correlação através dos valores de ρ de Pearson e Spearman.

As análises dos subtipos de câncer de mama e grau tumoral foram realizadas através da porcentagem do número de pacientes que apresentavam cada subtipo ou grau tumoral dentro dos grupos de pacientes que expressavam as assinaturas *high* ou *low* de APE1 e NF-κB. Os dados foram adquiridos pelo UCSC XENA usando os subtipos, LumA, LumB, Her2, Basal e *Claudin-low*. Para separar os pacientes no grupo *Claudin-low*, foi utilizada a assinatura composta por genes regulados positivamente (+) e negativamente (-) e equação usada foi = + *ADAMDEC1 + ANXA1 + BTN3A3 + CASP1 + CD36 + CD3D + CFLAR + COLEC12 + CTSK + CTSS + CXCL9 + DPT + EPAS1 + FHL1 + FUCA1 + GPX3 + LAPTM5 + LGALS2 + LTB + LXN + MAF + PLAC8 + PSMB10 - AKAP1 - ANK3 - BSPRY - CDH1 - CLDN3 - CLDN4 -*

CTTN - EFNA4 - ELF3 - EPN3 - FLNB - FXYD3 - GAS2L1 - GCAT - GPR56 - H1FO - HIST1H2BD - HIST2H2BE - KRT18 - KRT19 - KRT8 - LASS2 - MB - MTA1 - MYO6 - NEBL - PBX1 - PIK3R3 - PPM1H - PTPRF - SLC19A2 - TOB1 - TOM1L1 - TPD52 - TPD52L1 - TRAF4 (DIAS *et al.*, 2017). Os pacientes com maiores valores de expressão da equação dessa assinatura foram classificados como tumores no subtipo claudin-low.

Para as análises da EMT, foram avaliadas as médias de expressão dos fatores de transcrição (*SNAI1*, *SNAI2* (SLUG), *TWIST1*, *ZEB2* (SIP1) e marcadores clássicos (*CDH1*, *CDH2*, *VIM* e *FN1*) conhecidos por estarem envolvidos no processo da EMT. Além disso, também foi realizada análises de expressão de metaloproteinases de matriz (*MMP1* e *MMP9*). Essas análises foram realizadas dentro dos grupos de pacientes que expressavam as assinaturas *high* ou *low* de APE1 e NF- κ B.

3.2. Linhagens celulares e cultura

Para esse trabalho foram utilizadas como modelos as linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) e MCF-7 (HTB22, ATCC) que possuem diferentes fenótipos. A linhagem MCF-7 é ER+ e PR+, foi isolada de um carcinoma de mama com fenótipo bem diferenciado e se assemelha ao subtipo de câncer de mama luminal A (SUBIK *et al.*, 2010). Já a linhagem MDA-MB-231 é triplo negativa, oriunda de um carcinoma de mama pouco diferenciado e é a mais agressiva entre as duas mencionadas, assemelhando-se ao subtipo Claudin-Low (DIAS *et al.*, 2017). As células foram cultivadas em atmosfera de 37°C e 5% de CO₂, em presença de meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Life Technologies, Thermo Fisher, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen), 2 mM de Glutamina, 100 mg/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen).

Os repiques celulares foram realizados quando as culturas atingiram a confluência de aproximadamente 80%. Os repiques foram realizados na proporção de 1:4 com auxílio de tripsina EDTA 1X (Invitrogen) e semeadas em novas garrafas para manutenção das culturas. Para os experimentos, as células foram repicadas para uma densidade de 10.000 células/cm², onde após 24 h os ensaios experimentais foram iniciados. Para esse repique, antes de plaquear, o número de células foi estimado por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer com auxílio do azul de tripan 0,4%. Este corante penetra e não é expelido pelas células não

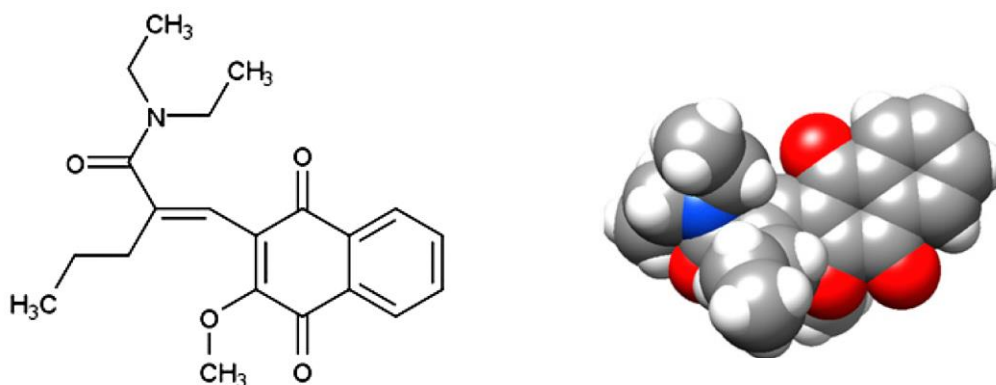
viáveis, deixando-as azuis, permitindo identificar e diferenciar das células viáveis que são proficientes na extrusão do corante. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas garrafas de cultura e placas de 96 poços.

Para estocagem das células, foram realizados protocolos de congelamento para manutenção de estoques em 90% SFB/10% Dimetilsulfóxido (DMSO), onde 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, por fim os tubos de congelamento foram transferidos para o tambor de nitrogênio líquido. Para o descongelamento e reposição da cultura, os tubos de congelamento com as células foram retirados do freezer -70°C e incubados diretamente a 37°C . Após total descongelamento, as células foram lavadas com 5mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, em português, Tampão Fosfato-Salino) 1x e cultivadas em meio RPMI suplementado com 20% de SFB até o primeiro repique. Após esse período, as células foram mantidas em meio RPMI como descrito acima.

3.3. Tratamento com o inibidor da porção redox de APE1 - APX2009

Para a inibição do domínio redox de APE1, foi utilizado o inibidor APX2009 (Sigma) (Figura 5). Este, é um inibidor potente e seletivo de APE1, o qual atua inibindo a sinalização redox da proteína. Como agente diluente, foi utilizado o DMSO (Dimetilsulfóxido) e as concentrações (0.16, 0.8, 4, 20 e 100 μM) de tratamento foram avaliadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Figura 5 - Estrutura química e subestrutura do APX2009.



Legenda: Estrutura química e subestrutura do inibidor do domínio redox de APE1, APX2009.
Fonte: Adaptado de Kelley *et al.*, 2016

3.4. Avaliação da proliferação celular

3.4.1. WST1 (do inglês water soluble tetrazolium)

Buscando determinar qual concentração de APX2009 seria capaz exercer sua função de inibição do domínio redox de APE1, sem inviabilizar as células, realizamos ensaios para avaliar proliferação celular através do reagente WST1 (Roche). As duas linhagens celulares estudadas foram avaliadas após 24, 48 e 72h de tratamento em diferentes concentrações. As concentrações utilizadas foram de 0.16, 0.8, 4, 20 e 100 μM . Para fins de comparação, foi utilizado o DMSO nessas mesmas concentrações.

Esta avaliação com WST1 é um ensaio colorimétrico baseado na conversão de sais de tetrazolina solúveis em água (vermelho claro) em sais de formazan (vermelho escuro) através da redução da enzima NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo), podendo ser aplicado para mensurar tanto a viabilidade quanto a proliferação celular, segundo o manual do fabricante. O procedimento consiste em semear as células em uma placa de 96 poços, na concentração de 7×10^3 células/ cm^2 para MDA-MB-231 e 25×10^3 células/ cm^2 para a MCF-7 em um volume de 150 μl de meio de cultura. As condições dos meios de cultura e de incubação foram as mesmas mencionadas anteriormente. Após o tempo necessário para a aderência celular, o inibidor foi adicionado ao meio de cultivo nas diferentes concentrações.

Após os tempos de tratamento, para cada poço, 2 μl de WST1 foram diluídos em 8 μl de meio de cultura e, então, esses 10 μl foram adicionados em cada poço da placa anteriormente preparada e tratada. Cada placa foi incubada em estufa a 37°C por até 2h. Após a primeira hora, as placas foram colocadas no leitor de Elisa (Polaris) utilizando o comprimento de onda de 450nm com a referência de 630 nm, e novamente após a segunda hora. Após os períodos de tratamentos, a porcentagem de células viáveis foi determinada pela razão da absorbância obtida das culturas tratadas com APX2009 em relação às tratadas com o diluente DMSO. Foram realizados cinco experimentos independentes em triplicata.

3.4.2. Ensaio de formação de colônias dependente de ancoragem

Como outra metodologia para avaliar a proliferação celular, foi realizado o ensaio de formação de colônias dependente de ancoragem após tratamento com o inibidor APEX2009. As células foram semeadas em baixa densidade, sendo 4×10^3 para a linhagem MDA-MB231 e 8×10^3 em placas de 6 poços e após 4h (tempo para a aderência das células) foram tratadas com APX2009 nas concentrações de 0.16, 0.8 e 4 μM . Para fins de comparação, poços separados foram tratados com DMSO nas mesmas concentrações. O meio de cultura foi trocado a cada três dias, sem nova adição do inibidor ou do diluente. Após 7 dias as células foram fixadas com etanol por 10 min e coradas com uma solução de cristal violeta (0,05% de cristal violeta e 20% de etanol) por 10 min. Em seguida, foram lavadas com água destilada três vezes para retirar o excesso de cristal violeta. Fotos dos poços foram retiradas com o uso de uma câmera digital (Samsung SM-A305GT). Foi adicionado 1ml de ácido acético (10% em água) por 15 min para solubilizar o cristal violeta. Após, 150 μl de cada amostra foram pipetados em poços de uma placa de 96 e as absorbâncias foram medidas a 595 nm com um leitor ELISA (Polaris). A avaliação foi feita através da razão da absorbância obtida das culturas tratadas com APX2009 em relação às tratadas com o diluente DMSO. Foram realizados três experimentos independentes.

3.5. **Ensaio de Migração *Wound Healing***

Com o intuito de comparar a migração celular das células com o domínio redox de APE1 inibido com aquelas tratadas com DMSO, foi realizado o ensaio de *Wound Healing*. Esse ensaio consiste na remoção de parte da monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. Para isso, 4×10^4 cel/cm² da linhagem MDA-MB- 231 e 10^5 cel/cm² da MCF-7 foram cultivadas sob as condições mencionadas anteriormente em placas de 6 poços. No momento em que a cultura de células alcançou a confluência desejada (90%), foi realizada a remoção longitudinal de parte das células, percorrendo as duas extremidades do poço, com a ponteira de 200 μl para MDA-MB-231 e ponteira de 10 μl para MCF-7, pois esta se mostrou mais sensível ao corte com uma ponteira maior. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas em meio de cultivo suplementado com uma baixa concentração de SFB (1 e

2% respectivamente), para reduzir a proliferação. Então, foi realizado o tratamento com o inibidor APX2009 ou DMSO na concentração de 0.8 μM para MDA-MB-231 e 4 μM para MCF-7, seguindo as doses decididas a partir dos ensaios de proliferação celular.

O espaço aberto foi fotografado com o uso de uma câmera digital (Samsung SM-A305GT) usando uma ampliação de 100x em intervalos determinados de 0 e 24h. A análise quantitativa da migração celular foi realizada através da medida da redução do espaço aberto, utilizando a imagem de 0h como referência para o tempo de 24 h analisado através do software ImageJ, onde foi obtido os valores das áreas. Os valores obtidos foram então comparados com o controle (DMSO). Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes para cada linhagem celular.

3.6. Ensaio de invasão

Para analisarmos o papel do domínio redox de APE1 no processo de invasão celular, as células foram tratadas com o inibidor APX2009 ou com DMSO nas concentrações de 0.8 μM e 4 μM . Foram utilizadas câmaras de Transwell (Corning, New York, USA) com filtros de policarbonato de 12mm de diâmetro e poros de 8 μM . Cada câmara foi umedecida com meio RPMI 1640 sem SFB por 1min, seguido de aplicação de 30 μl de Matrigel (Sigma) diluído em meio de cultura sem SFB gelado (1 mg/mL) que ficou em incubação a 37 °C por 45 min.

O Matrigel é uma matriz gelatinosa análoga à membrana basal. Dessa forma, 4 x 10⁴ células foram semeadas na região superior da membrana Transwell (Corning, New York, USA) contendo um meio de cultivo com baixa concentração de SFB com inibidor APX2009 ou DMSO. Na região inferior das membranas, foi adicionado 500 μl de meio RPMI 1640 suplementado com SFB 10%, com o objetivo de promover uma quimioatração das células.

Após 24 h, as células foram fixadas com etanol absoluto e coradas com a solução de cristal violeta (cristal violeta 0,05% em etanol 20%) seguido de lavagem em água destilada até completa remoção do excesso de corante. As células que não atravessaram o matrigel foram removidas manualmente da área superior com uma haste flexível com pontas de algodão.

Imagens foram adquiridas com o microscópio óptico invertido Olympus IX71 (Tóquio, Japão) 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). Foram realizados três

experimentos independentes apenas para a linhagem MDA-MB-231, pois devido a pandemia do Coronavírus os experimentos com a MCF-7 não foram completados.

3.7. Elaboração de iniciadores

As sequências dos genes alvos avaliados foram obtidas por meio da *database gene* do *NCBI* e do *Ensembl*. 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 iniciadores, 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 *IDT DNA*, tais como: tamanho do primer (18-24bp), produto da PCR de 70-150 bp, temperatura do primer ou TM (Temperatura de Melt) entre 55 °C e 60 °C, temperatura para formação de hairpin menor do que 35 °C e o $\Delta G > -10$ para a formação de homodímero e heterodímero (BUSTIN, 2000). Os iniciadores também foram analisados quanto à especificidade de ligação à sequência de interesse, por meio do algoritmo *BLAST*, disponível online através do endereço eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os iniciadores usados e suas sequências, foram listados na tabela 1.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores elaborados, mostrando as sequências *forward* e *reverse* de cada um deles

<i>Iniciadores</i>	<i>Sequência Forward 5'-3'</i>	<i>Sequência Reverse 5'-3'</i>
<i>ACTB</i>	GAGCGCGGCTACAGCTT	TCCTTAATGTCACGCACGATTT
<i>APEX1</i>	ATACTGGTCAGCTCCTTCGG	GCATAGGCGATGAGGAGCA
<i>CDH1*</i>	AGAGGACCAGGACTTTGACTTG	TTCATCGGGATTGGCAGGG
<i>CDH2*</i>	GTCAGTGAAGGAGTCAGCAGA	GGTCCCCTGGAGTTTTCTGG
<i>MMP1</i>	AATAGTGGCCCAGTGGTTGAA	GTCAGATGTGTTTGCTCCCAG
<i>MMP9</i>	CGACCTCAAGTGGCACCA	TAGTTGGCGGTGGTGGCG

Legenda: Iniciadores usados neste trabalho. *ACTB*: Beta acatina, *RELA*: NFκB (p65), *APEX1*: APE1, *CDH1*: E-caderina, *CDH2*: N-cadrina, *MMP1*: Metaloproteínas 1 e *MMP9*: Metaloproteínas 2. * indica os iniciadores elaborados pela autora.

Fonte: A autora, 2020.

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

3.8.1. Extração do RNA

A fim de mensurar os níveis de transcritos de genes clássicos de EMT e do *APEX1*, após inibição do domínio redox de APE1, foi realizado a RT-qPCR das células tratadas com APX2009 ou DMSO, sendo 0.8 μM para MDA-MB-231 e 4 μM para a MCF-7. O RNA total foi extraído com auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo com adição de 200 μL de Clorofórmio. Os lisados celulares foram centrifugados a 12000 rpm 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 adicionando 500 μL de Isopropanol 100%. Após 15 min a 25°C, as amostras foram submetidas a centrifugação de 12000 rpm, por 10 min, a 4°C. Descartando o sobrenadante, os precipitados foram reconstituídos em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC).

As quantificações de RNAs obtidos da extração foram realizadas através de espectrofotometria com auxílio do equipamento Nanodrop 1000 (NanoDrop). Os RNAs foram armazenados a -20°C até o uso.

3.8.2. Tratamento com DNase

Depois da extração de RNA, as amostras 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). Cerca de 2 μg de RNA total foi incubado com 1U de DNase e 1X de Tampão DNase 10X em um volume total de 9 μL , durante 15 min a 25°C. A reação foi inativada adicionando 1 μL de EDTA 25 mM e incubando a 65°C por 10 min.

3.8.3. Síntese de cDNA

Para avaliação dos níveis de mRNA, os RNAs foram convertidos em *Complementary DNA* (cDNA, em português, DNA complementar) com auxílio do SCRIPT cDNA synthesis kit (Promega). Brevemente, à reação do RNA tratado com DNase foram adicionados 4 µL de Tampão 5X 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 procedeu incubando as reações durante 50 min a 42°C com posterior inativação da enzima a 70°C por 15 min. As incubações foram realizadas em termociclador.

3.8.4. RT-qPCR

Os cDNAs foram submetidos a PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para avaliar as variações nos níveis de mRNA dos genes analisados. Para isso, as reações de síntese de cDNA foram diluídas cerca de 5 vezes e utilizadas para amplificação por PCR utilizando Rotor Gene PCR Master Mix (Qiagen). As reações das PCRs foram realizadas em volumes finais de 10 µL contendo 0,5 µM de cada primer. As RT-qPCRs 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 expressão dos genes avaliados foram normalizados pelos níveis de *beta-actin* (*ACTNB*, em português, beta-actina). As reações foram feitas em triplicata e as quantificações foram determinadas através do cálculo de DDCt (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.9. **Análises estatísticas**

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, para experimentos não paramétricos. Para os

experimentos que passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, as análises foram realizadas com o teste t de Student para dois grupos experimentais e ANOVA para comparação de três ou mais grupos experimentais. Os resultados serão considerados significativos estatisticamente adotando o valor de $p < 0,05$. Os dados foram expressos na forma de média \pm erro padrão de três a cinco experimentos individuais.

Os heatmap foram organizados de acordo com a equação de expressão, sendo os pacientes com maior somatório estando no quartil de 75% e os de menor somatório no quartil de 25%.

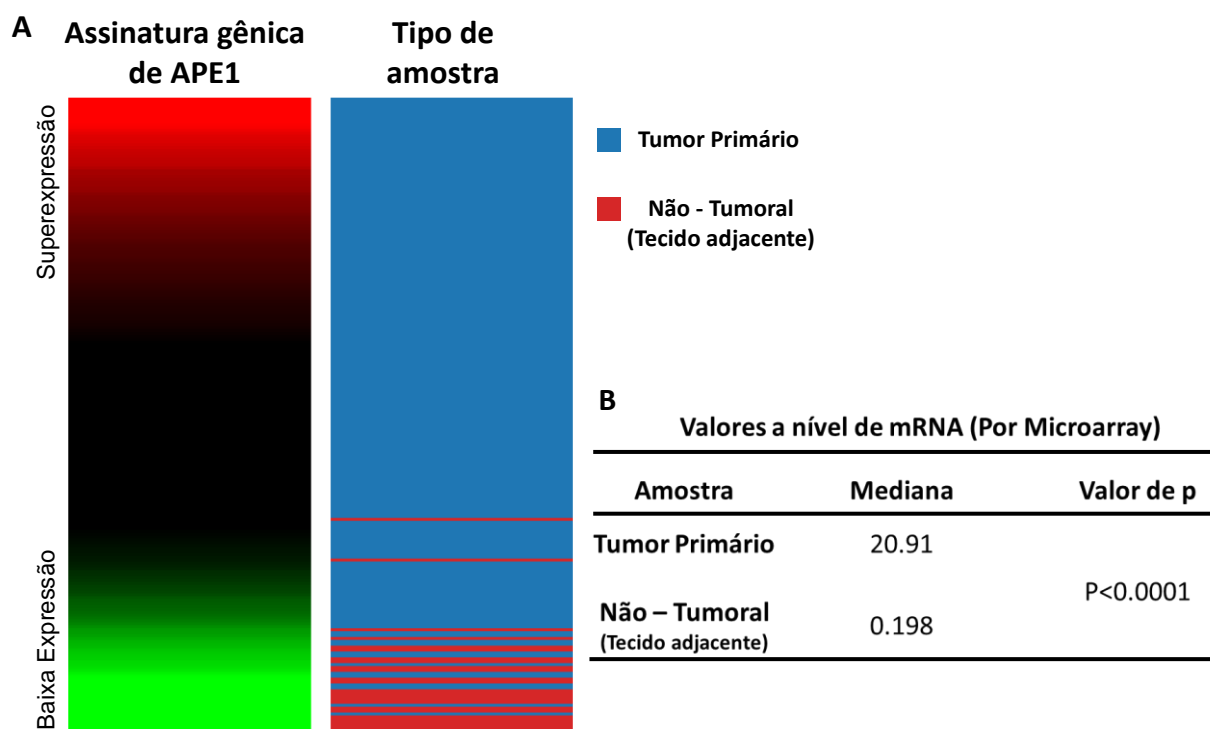
4. RESULTADOS

4.1. **Análise *in silico* da expressão da assinatura gênica de APE1 em amostras não-tumorais e de tumor primário de mama, através do banco de dados TCGA-BRCA**

Utilizando dados públicos disponíveis através do banco de dados do TCGA com a coorte de pacientes com câncer de mama BRCA, foram feitas análises para avaliar a assinatura gênica de atividade de APE1 em amostras de pacientes com tumor primário de mama e comparar com amostras não-tumorais.

Essa assinatura gênica é composta por genes que interagem direta ou indiretamente com APE1, refletindo na sua atividade (AYYILDIZ et al., 2020). O resultado indicou que essa assinatura apresenta uma maior expressão nas amostras tumorais do que nas não-tumorais (Figura 6). Como é possível observar no heatmap da figura 6 A, não há a presença de amostras não - tumorais naqueles pacientes com superexpressão da assinatura de APE1, sugerindo que APE1 está mais atuante no tumor do que em tecidos normais, o que está em concordância com seus efeitos pró-tumorais.

Figura 6 - Heatmap da assinatura gênica de atividade de APE1 comparado com amostras de tumor primário de mama e amostras não tumorais



Legenda: (A) O heatmap aponta a expressão da assinatura de APE1 a nível de mRNA de um total de 114 amostras não-tumorais e 532 amostras de tumor primário de mama. (B) A tabela apresenta valores de mediana por Microarray normalizados por Argilent determinado pela plataforma UCSC Xena.

Fonte: A autora, 2020.

4.2. Análise *in silico* da relação de APE1 e NF- κ B e a regulação da EMT em câncer de mama através do banco de dados TCGA-BRCA.

Com o intuito de avaliar a relação de APE1 e NF- κ B através de assinaturas gênicas específicas para ambos, foi realizada uma análise dos valores de médias das amostras do banco de dados TCGA com a coorte BRCA.

A assinatura gênica de APE1 é composta por genes que são regulados positiva e negativamente e que apresentam uma forte correlação com APE1, compondo uma assinatura gênica que reflete na atividade de APE1. A assinatura de NF- κ B foi proposta a partir uma gama de genes que estão diretamente relacionados com a regulação e atividade da via de NF- κ B incluindo as subunidades e inibidores / reguladores de todo o complexo de NF- κ B.

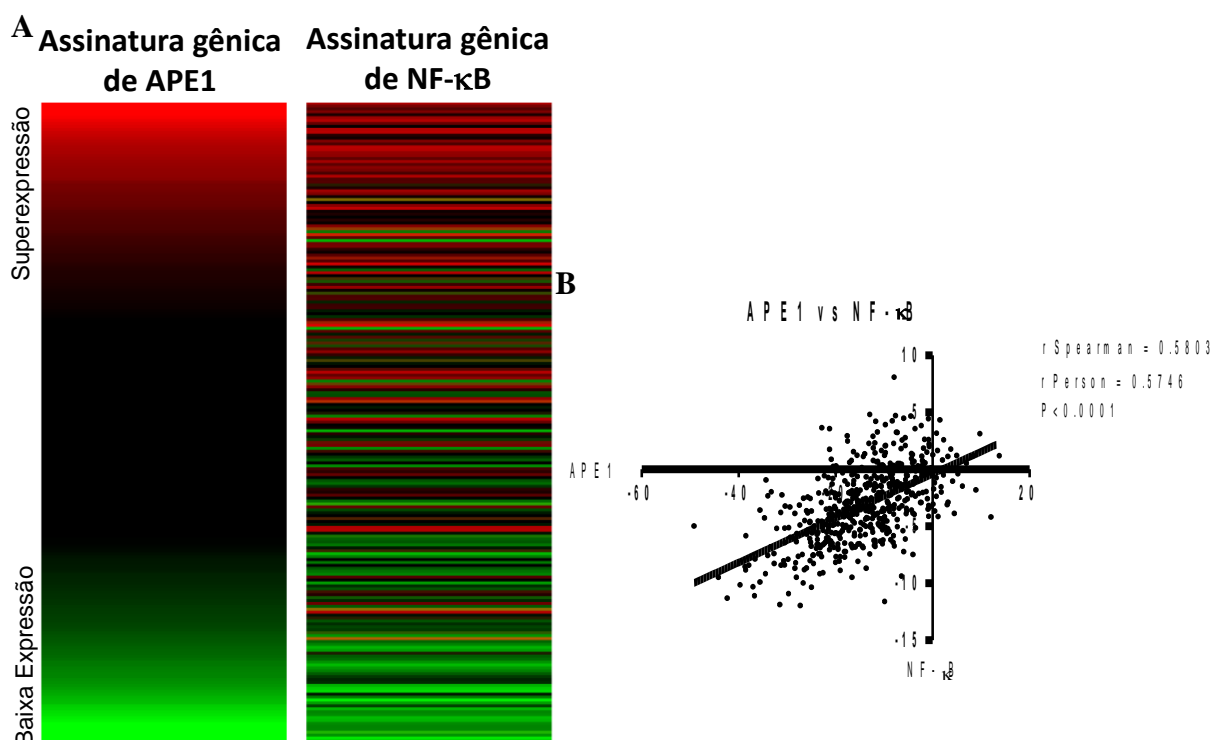
A partir dessas assinaturas, foram selecionados os pacientes com maior e menor expressão (mostrado na metodologia deste trabalho) que refletem naqueles pacientes com maior

ou menor atividade de APE1 e NF- κ B. A partir de então, foram analisados quanto aos subtipos tumorais, grau tumoral e fatores de transcrição e marcadores clássicos envolvidos no processo de EMT e também metaloproteinases de matriz a níveis de mRNA.

4.2.1. Análise in sílico de correlação entre as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF- κ B.

A fim de avaliar uma possível correlação entre as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF- κ B, foi realizada uma análise de correlação através dos valores de ρ de Pearson e Spearman. Os resultados mostram que há uma correlação significativamente positiva e moderada entre as assinaturas utilizadas, como pode ser observado no *heatmap* e no gráfico da Figura 7 (A e B). Como a assinatura de NF- κ B é composta por genes que são mais expressos em células tumorais circulantes de mama com perfil mesenquimal, essa correlação positiva sugere então que a assinatura de APE1 também pode apresentar características mesenquimais.

Figura 7 - Correlação entre as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB



Legenda: A expressão da assinatura gênica de atividade de APE1 mostra uma correlação positiva e moderada com a assinatura gênica da via de NF-κB. (A) O *heatmap* mostrando que os pacientes com maior expressão da assinatura de APE1, também apresentam maior expressão da assinatura de NF-κB. (B) gráfico de correlação das assinaturas com valor de p significativo <0.0001.

Fonte: A autora, 2020.

4.2.2. Análise in sílico dos subtipos tumorais e grau tumoral em pacientes com alta (high) e baixa (low) expressão das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB.

Para analisar qual subtipo e grau tumoral é mais observado dentre os pacientes com alta expressão das assinaturas de APE1 e NF-κB, foi realizado uma análise baseada no número de pacientes que apresentavam cada um dos subtipos ou grau tumoral em relação ao número total de pacientes. Os subtipos analisados foram: Luminal A, Luminal B, HER2, Basal e Claudin-low e os graus tumorais divididos em I, II, III e IV. Para nível de comparação, o mesmo foi realizado para os pacientes com baixa expressão das assinaturas.

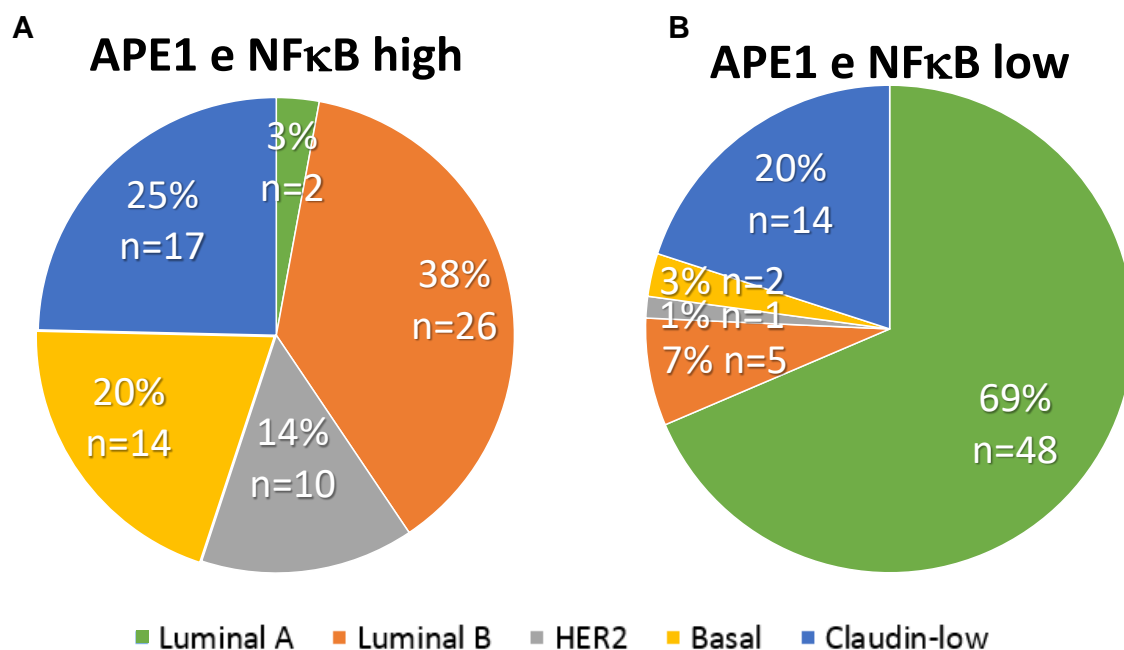
Os resultados sugerem que entre os pacientes analisados, o subtipo tumoral Luminal B é o mais observado entre os pacientes com assinatura de APE1 e NF-κB *high* compondo um total de 38% de todos os pacientes, enquanto que e o subtipo Luminal A é o menos observado

apresentando 3% do total (Figura 8 A). Por outro lado, para a assinatura *low*, o subtipo Luminal A é o mais aparente com 69% dos pacientes, sendo o subtipo HER2 como o menos observado – 1% (Figura 19 B). O subtipo Basal, que corresponde ao grupo triplo negativo, indicou maior frequências dos pacientes com assinatura *high* (20% - Figura 8 A) do que naqueles com assinatura *low* (3% - Figura 8 B). Entretanto, o subtipo Claudin-low, que também faz parte do grupo de triplo negativo, indicou apenas uma diferença de 5% entres os dois níveis das assinaturas (Figura 8 A e B).

Em relação ao grau tumoral, os resultados mostram que o grau tumoral II é o mais observado entres as assinaturas de APE1 e NF- κ B, correspondendo a 60% dos pacientes em ambos os níveis testados (Figura 9 A e B). O grau tumoral I é mais comumente observado no grupo *low*, correspondendo a 21% dos pacientes (Figura 9 B), enquanto que na assinatura *high*, foram 12% dos pacientes (Figura 9 A). Vale ressaltar que o grau tumoral IV foi observado apenas em pacientes com assinatura de APE1 e NF- κ B *high* (Figura 9 A).

Figura 8 - Subtipos tumorais em pacientes com alta (*high*) e baixa (*low*) expressão das assinaturas gênicas de atividade APE1 e da via de NF- κ B

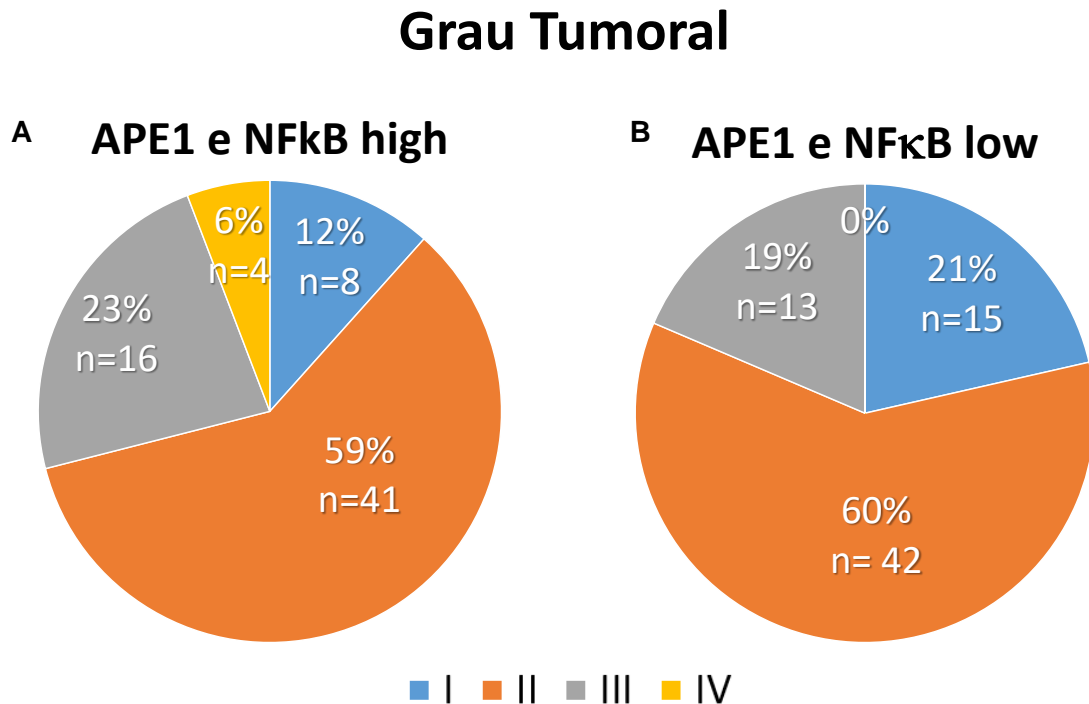
Subtipos tumorais



Legenda: Porcentagem de subtipos tumorais em pacientes com alta (*high*) (A) e baixa (*low*) (B) expressão das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF- κ B. O número total de pacientes foi de 69 pacientes para APE1 e NF- κ B *high* e de 70 pacientes para APE1 e NF- κ B *low*.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 9 - Grau tumoral em pacientes com alta (*high*) e baixa (*low*) expressão das assinaturas gênicas de atividade APE1 e da via de NF-κB



Legenda: Porcentagem de grau tumoral em pacientes com alta (*high*) (A) e baixa (*low*) (B) expressão das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF-κB. O número total de pacientes foi de 69 pacientes para APE1 e NF-κB *high* e de 70 pacientes para APE1 e NF-κB *low*.

Fonte: A autora, 2020.

4.2.3. Correlação das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB com fatores de transcrição, marcadores clássicos e metaloproteínas de matriz envolvidos no processo da EMT, análise in sílico

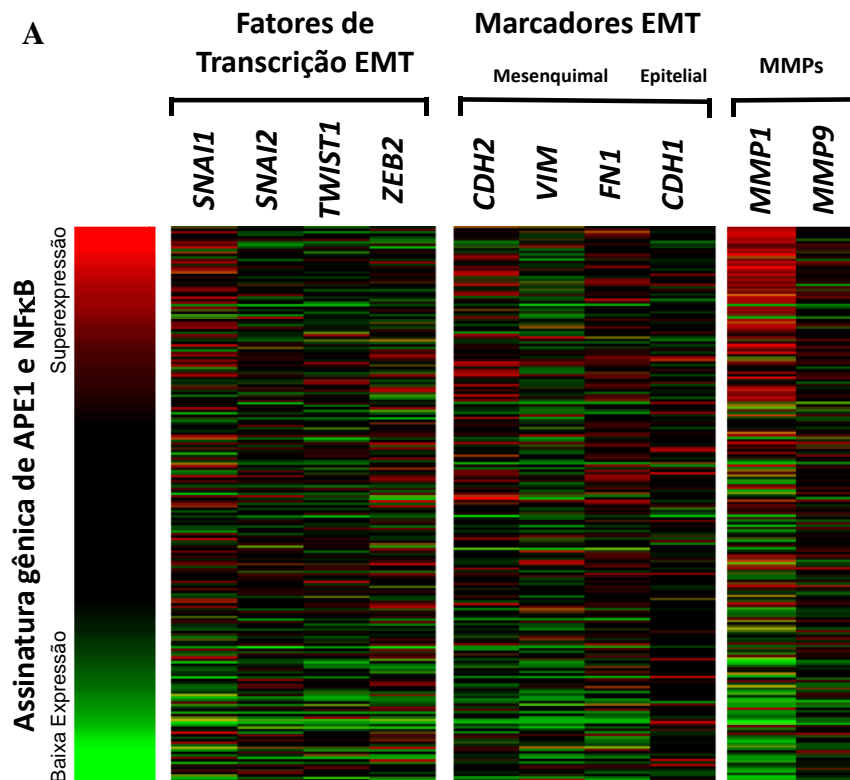
Com o objetivo de avaliar os níveis de mRNA de fatores de transcrição, marcadores clássicos e metaloproteínas de matriz que participam do processo da EMT, foram realizadas análises com o banco de dados do TCGA que possibilitaram uma comparação entre a expressão das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB com os genes envolvidos na EMT.

Os resultados das análises sugerem que o fator de transcrição *SNAIL* e os marcadores mesenquimais N-caderina (*CDH2*) e fibronectina (*FNI*) apresentam uma correlação significativamente positiva com as assinaturas de APE1 e NF-κB. Por outro lado, o marcador

epitelial E-caderina (*CDH1*) apresenta uma correlação negativa com a assinatura. Para as metaloproteinases *MMP1* e *MMP9* também foi observada uma correlação positiva com as assinaturas, e a maior correlação foi da *MMP1* (r Pearson 0.4692 e r Spearman 0.4718). Os resultados podem ser observados no *heatmap* da figura 10 A e o coeficientes de correlação para os genes descritos no *heatmap* são fornecidos em forma de tabela na figura 10 B.

Esses achados sugerem uma possível relação de APE1 com o processo da EMT através da atuação de NF- κ B e confirmam o perfil mesenquimal das assinaturas de APE1 e NF- κ B quando em superexpressão, pois marcadores mesenquimais como N-caderina e fibronectina estão apresentam uma correlação positiva com as assinaturas, enquanto o marcador epitelial E-caderina tem uma correlação negativa com as assinaturas em superexpressão.

Figura 10 - Correlação da expressão das assinaturas gênicas de atividade APE1 e da via de NF- κ B com genes EMT



B

Gene	Coeficientes de correlação			
	r Pearson	p value	r Spearman	p value
SNAI1	0.2119	<0.0001	0.2202	<0.0001
SNAI2	-0.04563	0.2949	-0.06973	0.1091
TWIST1	-0.01855	0.6704	-0.04136	0.3424
ZEB2	0.03057	0.4829	0.01457	0.7382
CDH2	0.2057	<0.0001	0.1911	<0.0001
VIM	-0.00711	0.8705	-0.03426	0.4316
FN1	0.2215	<0.0001	0.1736	<0.0001
CDH1	-0.1099	0.0114	-0.134	0.002
MMP1	0.4692	<0.0001	0.4718	<0.0001
MMP9	0.1697	<0.0001	0.1788	<0.0001

Legenda: *Heatmap* mostrando níveis de mRNA de genes em um conjunto de 530 tumores primários de mama do banco de dados TCGA feito através da plataforma online UCSC Xena (A). O *heatmap* mostra a correspondência entre a expressão das assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF- κ B com fatores de transcrição promotores de EMT como o *SNAI1*, *SNAI2* (*SLUG*), *TWIST1* e *ZEB2* (*SIP1*), os marcadores mesenquimais N-Caderina (*CDH2*), vimentina (*VIM*) e fibronectina (*FNI*), o marcador epitelial E- Caderina (*CDH1*), e as metaloproteinases *MMP1* e *MMP9*. Os níveis de mRNA foram determinados a partir da análise de dados de RNA-Seq. Os coeficientes de correlação para os genes descritos no *heatmap* são fornecidos em forma de tabela (B).

Fonte: A autora, 2020.

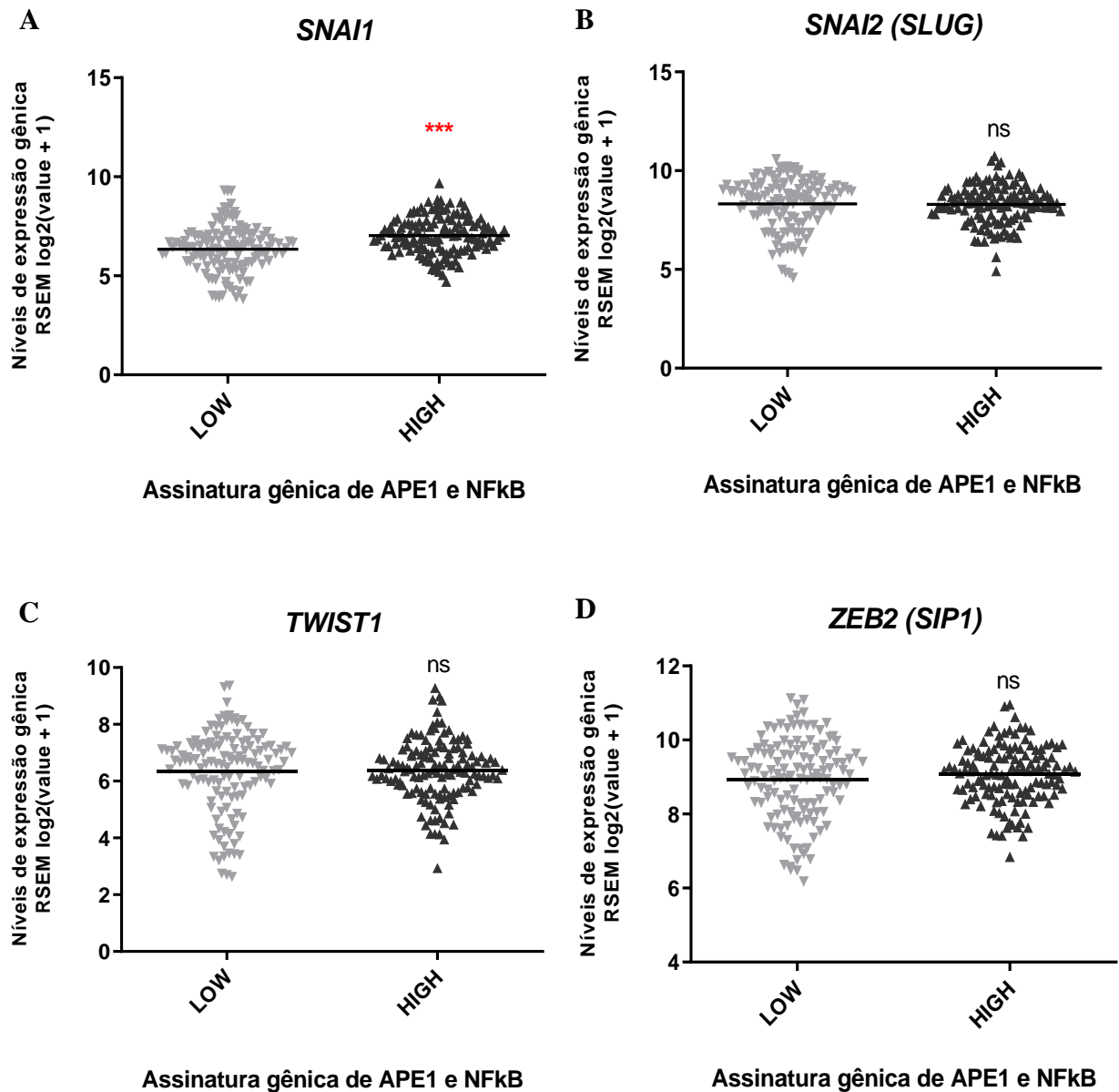
4.2.4. Análise in silico dos níveis de mRNA de genes da EMT em pacientes com assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF-κB alta (high) vs baixa (low)

A fim de comparar os níveis de mRNA dos genes clássicos envolvidos no processo de EMT em pacientes que expressavam as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF-κB *low* vs APE1 e NF-κB *high*, foram feitas análises através dos dados adquiridos do TCGA e a expressão dos genes foi determinada a partir da análise de dados de RNA-Seq. Os resultados mostram que dos fatores de transcrição avaliados, apenas o gene *SNAIL* indicou alguma alteração de expressão entre as assinaturas, sendo mais expresso na assinatura *high* (Figura 11 A). Todos os outros fatores de transcrição não apresentaram alteração significativa (Figura 11 B, C e D).

Em relação aos marcadores mesenquimais, N-caderina (*CDH2*) (Figura 12 A) e Fibronectina (*FNI*) (Figura 12 B) eles foram significativamente mais expressos na assinatura *high* do que em *low*. Por outro lado, o marcador Vimentina (*VIM*) (Figura 12 C) não apresentou qualquer alteração significativa. Já o marcador epitelial E-caderina (*CDH1*) (Figura 12 D) indicou uma alteração significativa dos níveis de mRNA sendo maior na assinatura *low*. Ambas as metaloproteinases analisadas nesses grupos, *MMP1* e *MMP9*, apresentaram maior expressão nas assinaturas *high* em comparação com as assinaturas *low* (Figura 13 A e B).

Esses resultados sugerem uma atividade de APE1 no processo da EMT através da atuação de NF-κB, sugerindo que APE1, quando superexpresso, atua regulando negativamente o marcador epitelial E-caderina e positivamente o fator de transcrição *SNAIL*, os marcadores mesenquimais clássicos da EMT e metaloproteinases de matriz.

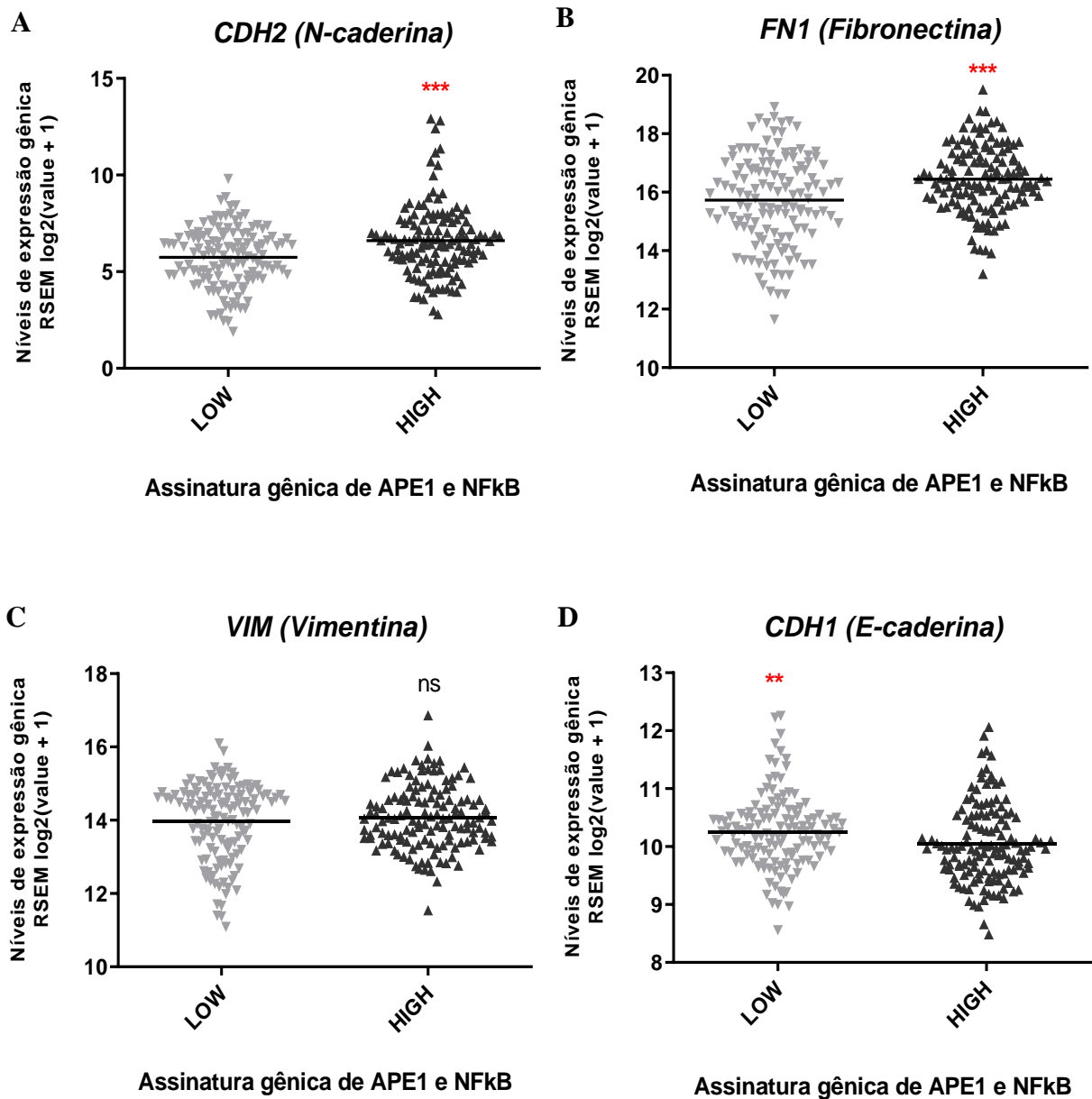
Figura 11 - Níveis de mRNA de fatores de transcrição da EMT em pacientes com assinaturas gênicas de APE1 e NF-κB alta (*high*) vs baixa (*low*)



Legenda: Comparação dos níveis de mRNA de fatores de transcrição de EMT *SNAI1* (A), *SNAI2* (B), *TWIST1* (C) e *ZEB2* (D) entre pacientes que expressam a assinatura de APE1 e NF-κB low (n=132) vs high (n=133). Os níveis de mRNA foram determinados a partir da análise de dados de RNA-Seq. Os dados foram expressos como média ± DP. *** p < 0,001. ns: Não foi observado significância estatística.

Fonte: A autora, 2020.

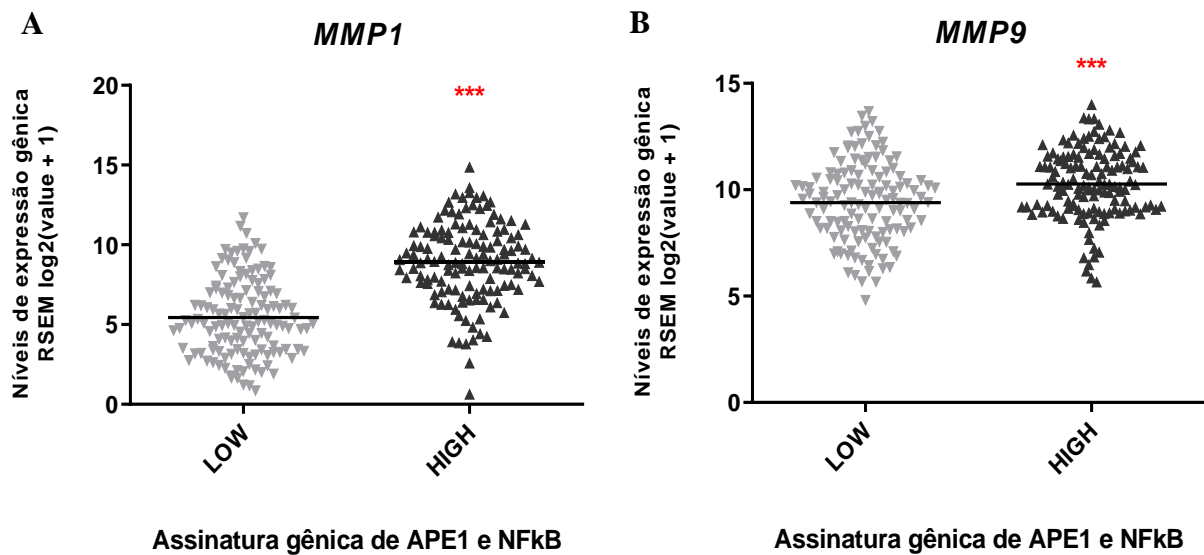
Figura 12 - Níveis de mRNA de marcadores clássicos da EMT em pacientes com assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via de NF-κB alta (high) vs baixa (low)



Legenda: Comparação dos níveis de mRNA de marcadores clássicos da EMT. Marcadores mesenquimais N-Caderina (*CDH2*) (A), vimentina (*VIM*) (B) e fibronectina (*FN1*) (C) e do marcador epitelial E-Caderina (*CDH1*) (D) entre pacientes que expressam a assinatura de APE1 e NF-κB low (n=132) vs high (n=133). Os níveis de mRNA foram determinados a partir da análise de dados de RNA-Seq. Os dados foram expressos como média ± DP. ** p<0,01; *** p<0,001. ns: Não foi observado significância estatística.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 13 - Níveis de mRNA de metaloproteinases de matriz em pacientes com assinaturas gênicas de APE1 e NF- κ B alta (high) vs baixa (low)



Legenda: Comparação dos níveis de mRNA de metaloproteinases de matriz *MMP1* (A) e *MMP9* (B) entre pacientes que expressam a assinatura de APE1 e NF- κ B low (n=132) vs high (n=133). Os níveis de mRNA foram determinados a partir da análise de dados de RNA-Seq. Os dados foram expressos como média \pm DP. *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

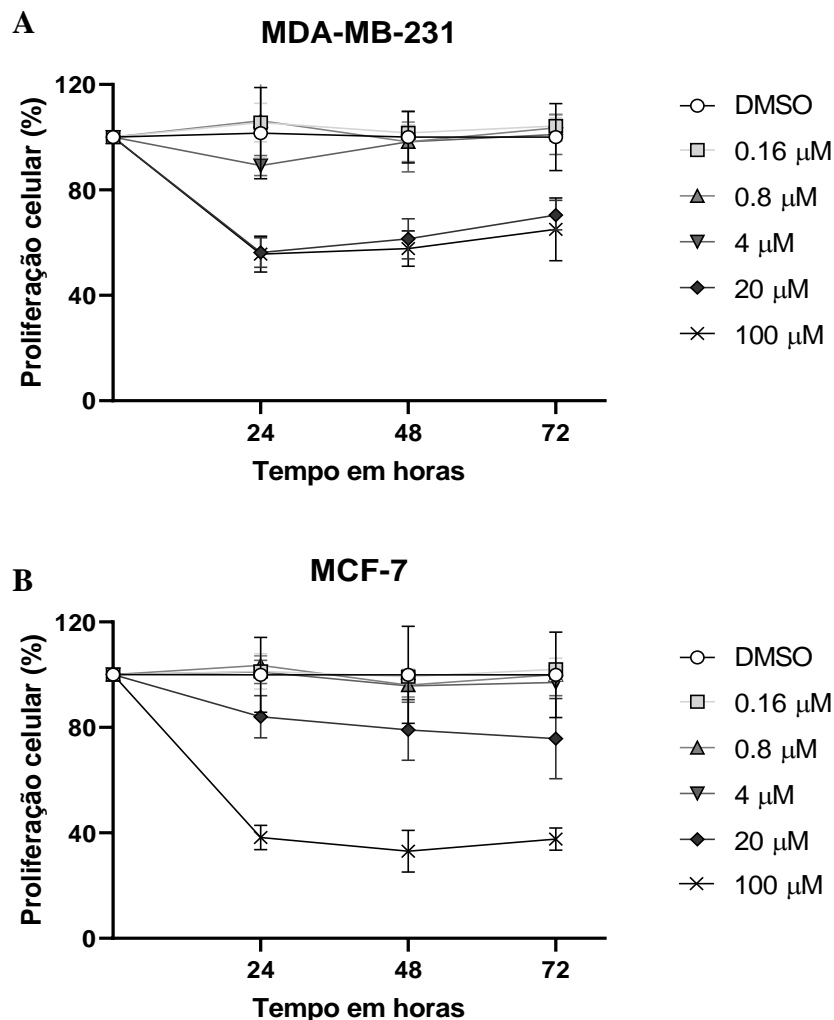
4.3. Análise de proliferação celular das células de câncer de mama tratadas com APX2009 por WST1

Para avaliar os efeitos da inibição redox de APE1 na proliferação das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, foi realizado o método de WST1, onde as células foram incubadas com o inibidor APX2009. Os resultados para a linhagem MDA-MB-231 indicaram que após 24 horas de tratamento, a proliferação celular foi reduzida nas concentrações de 20 e 100 μ M de APX2009, o que resultou em aproximadamente 55% de proliferação em comparação com os controles (células tratadas apenas com DMSO). Contudo, APX2009 nas concentrações de 0.8 e 4 μ M não afetou significativamente a proliferação celular. Além disso, nos períodos de 48 e 72 horas, os resultados observados foram semelhantes ao encontrados em 24 horas (Figura 14 A). Por outro lado, a linhagem MCF-7 se mostrou mais resistente ao APX2009 tendo uma redução da proliferação apenas na concentração de 100 μ M, resultando em aproximadamente 48% de proliferação em comparação ao controle após 24 horas

de tratamento com APX2009. Para as outras concentrações, não houve uma alteração significativa da proliferação celular, e esses resultados também foram observados em 48 e 72 horas (Figura 14 B).

Sendo assim, esses resultados mostram que o tratamento com o inibidor do domínio redox de APE1 diminui a proliferação de células MDA-MB-231 e MCF-7. Porém, com efeitos mais acentuados na primeira linhagem.

Figura 14 - Proliferação celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após tratamento com APX2009 por WST1



Legenda: Proliferação celular das linhagens MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B) em resposta ao tratamento com APX2009 em concentrações de 0.16, 0.8, 4, 20 e 100 µM. As análises foram realizadas em 24, 48 e 72 horas após o tratamento. DMSO foi usado como respectivos controles. Os pontos representam o percentual médio de células de cinco experimentos individuais (\pm S.D). Há significância estatística nas concentrações de 20 e 100 µM de APX2009 para a linhagem MDA-MB 231 em todos os tempos testados (A). Para a linhagem MCF-7, há significância estatística na concentração de 100 µM em todos os tempos testados.

Fonte: A autora, 2019.

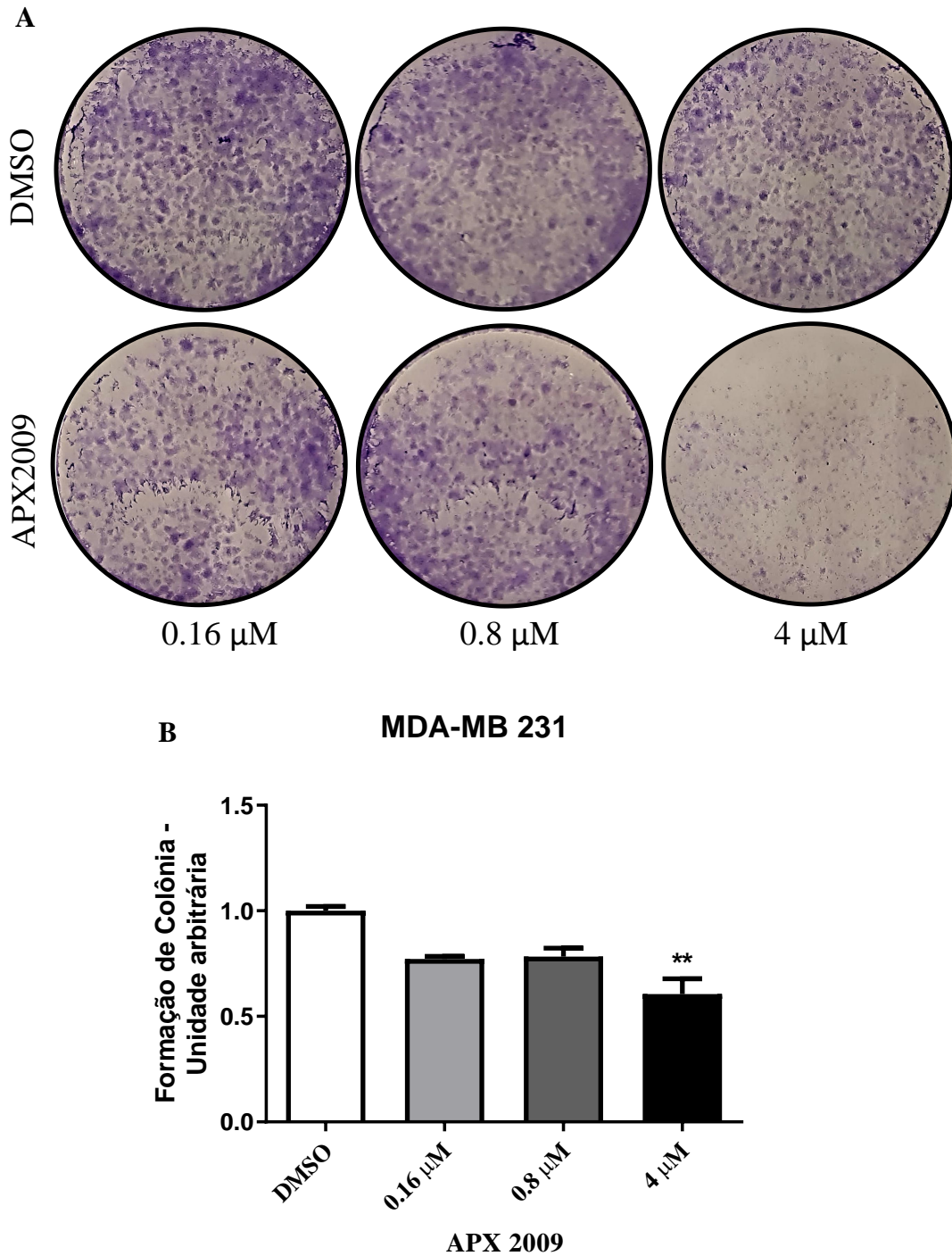
4.4. **Análise do potencial de formação de colônias de células após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1**

A fim de avaliar o efeito da inibição da porção redox de APE1 no potencial clonogênico e, por consequência, proliferação celular, foi feito o ensaio de formação de colônias dependente da ancoragem. Após tempo de semeadura de uma baixa densidade celular, o tratamento com o inibidor APX2009 foi realizado em concentrações de 0.16, 0.8 e 4 μM para ambas as linhagens estudadas. Para a linhagem MDA-MB-231, os resultados mostram que as células tratadas na concentração de 4 μM reduziram a formação de colônias em comparação à média dos controles (Figura 15). Para as outras concentrações testadas (0.16 e 0.8 μM), não foi observado nenhuma alteração significativa (Figura 15 B).

Resultados semelhantes foram observados para a linhagem MCF-7, onde a concentração de 4 μM indicou uma redução significativa na formação de colônias quando comparado com a média dos controles de DMSO (Figura 16). Assim como na MDA-MB231, não foi observado resultado significativo para as outras concentrações testadas em MCF-7 (Figura 16 B).

Com isso, esses resultados sugerem que a inibição da porção redox de APE1 pelo inibidor APX2009 reduz o potencial clonogênico de linhagens de câncer de mama.

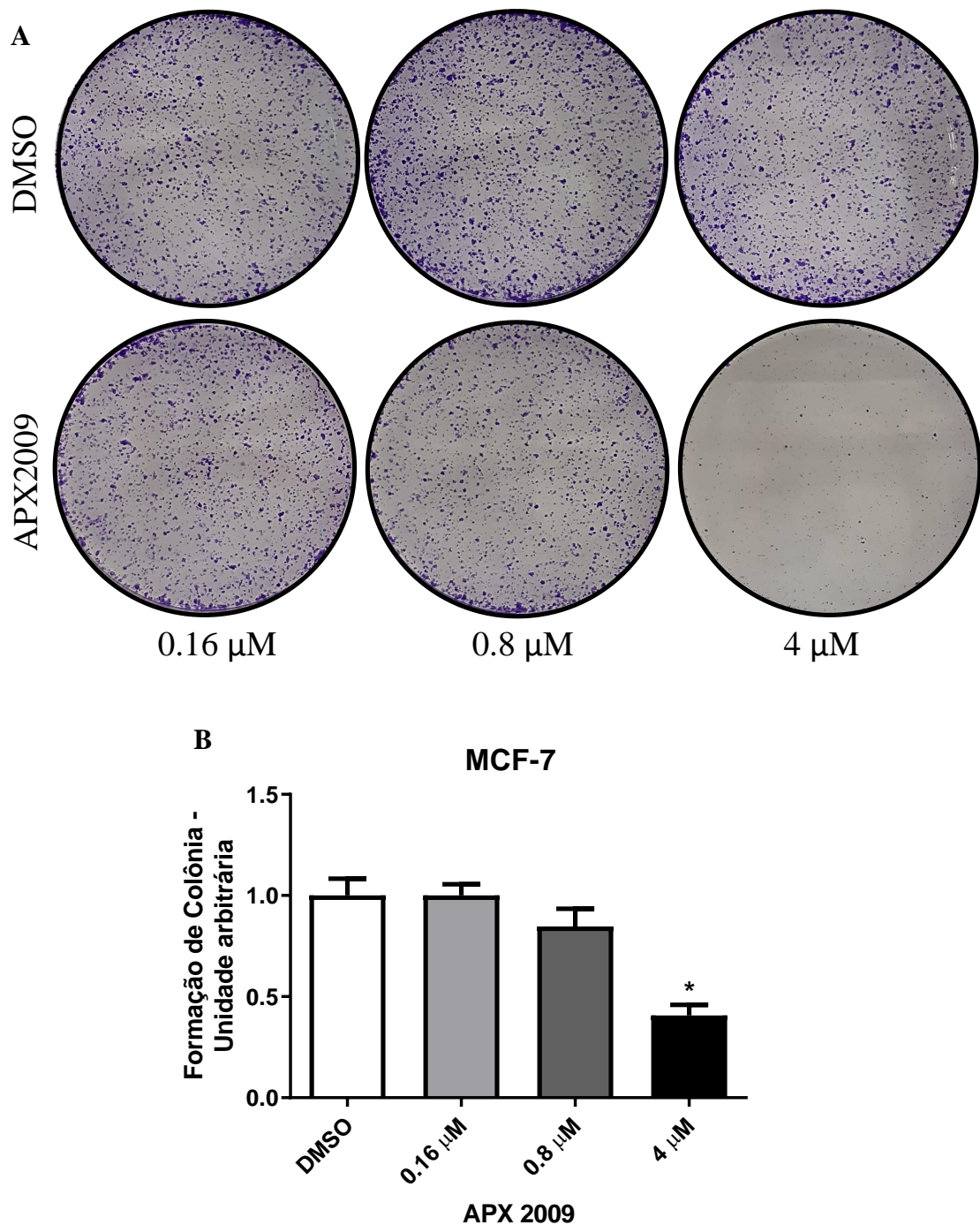
Figura 15 - Ensaio de formação de colônia por ancoragem após tratamento com APX2009 em células MDA-MB-231



Legenda: Ensaio de formação de colônia representativo que avalia a capacidade clonogênica de células MDA-MB-231 após o tratamento com APX2009 a 0.16, 0.8 e 4 μM (A). As barras representam a média de formação de colônias de células (B) de três experiências individuais (\pm D.P.). Ampliação x100 (A). ** $p < 0,01$ referente ao controle de DMSO.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 16 - Ensaio de formação de colônia por ancoragem após tratamento com APX2009 em células MCF-7.



Legenda: Ensaio de formação de colônia representativo que avalia a capacidade clonogênica de células MCF-7 após 24 h de tratamento com APX2009 a 0.16, 0.8 e 4 μM (A). As barras representam a média de formação de colônias de células (B) de três experiências individuais (\pm D.P.). Ampliação x100 (A). * $p < 0,05$ referente ao controle de DMSO.

Fonte: A autora, 2019.

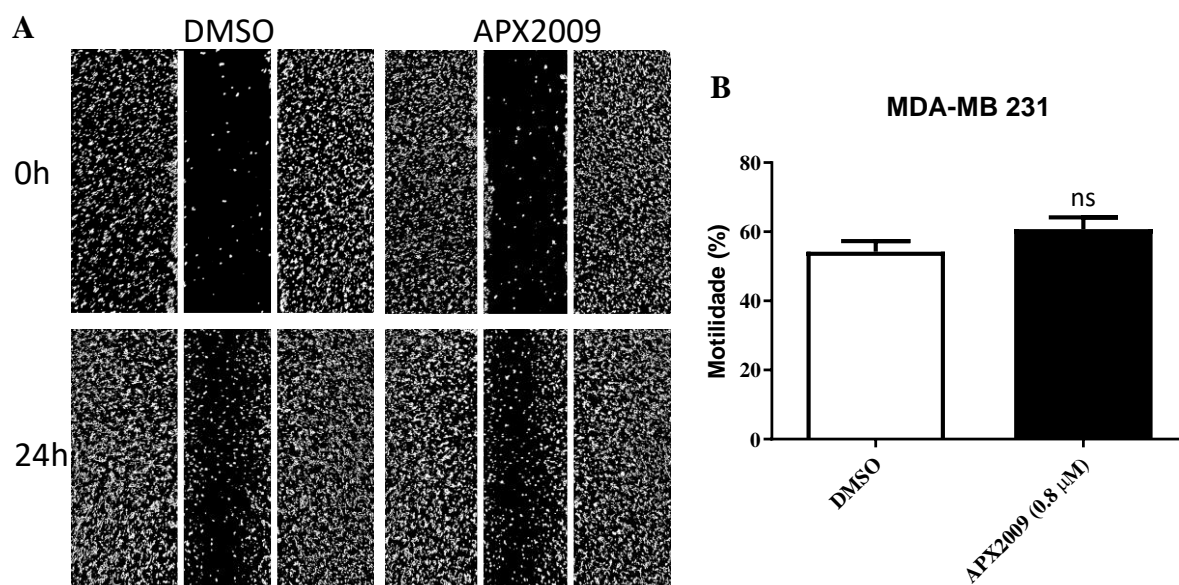
4.5. Análise de migração celular em linhagens de câncer de mama após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1

Para avaliar o efeito da inibição do domínio redox de APE1 na motilidade das células de câncer de mama, foi realizado o teste de *Wound Healing*. As células MDA-MB-231 foram tratadas com a concentração de 0.8 μM de APX2009 por 24 horas. Os resultados mostraram que essa inibição não influenciou significativamente a motilidade das células MDA-MB-231 em comparação ao controle (Figura 17).

Os resultados para a linhagem MCF-7 foram semelhantes aos encontrados para a linhagem MDA-MB-231, onde a motilidade celular não foi alterada significativamente após 24 horas de tratamento com a concentração de 4 μM do inibidor APX2009 (Figura 18).

Esses resultados sugerem que a inibição do domínio redox de APE1 não altera a motilidade de células de câncer de mama.

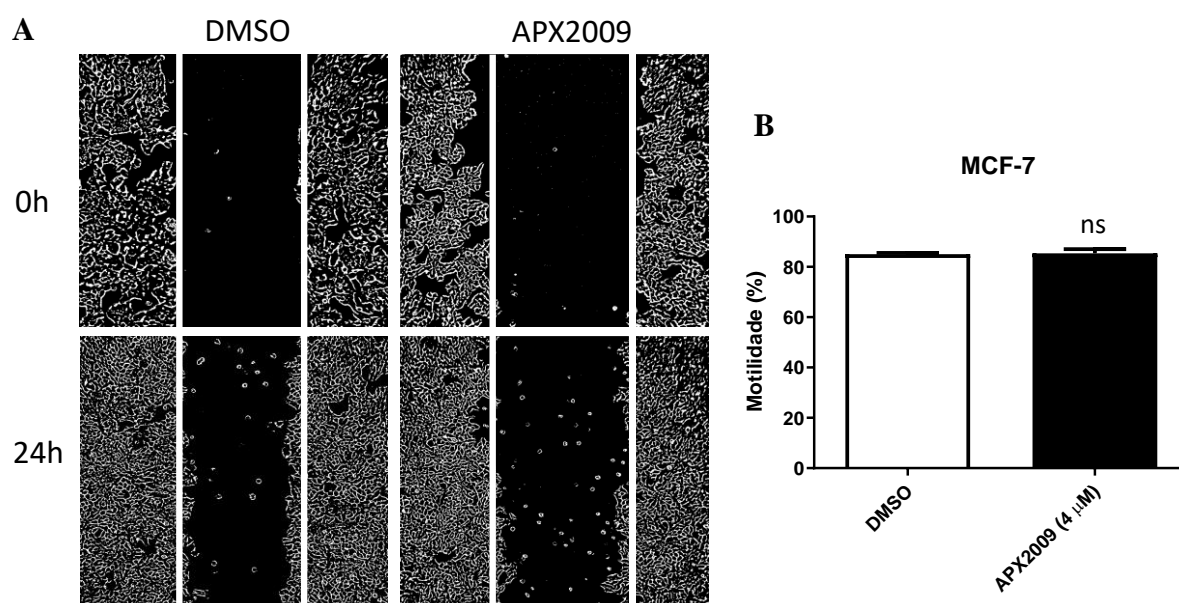
Figura 17 - Ensaio de migração celular por *Wound Healing* após tratamento com APX2009 em células MDA-MB-231



Legendas: Ensaio representativo de cicatrização de feridas (*Wound Healing*) avaliando a migração celular em 24h após o tratamento com APX2009 a 0.8 μM em células MDA-MB231 (A). Os gráficos representam as médias das porcentagens da capacidade migratória de células em três experimentos individuais, conforme indicado pela porcentagem de fechamento da ferida (B). Ampliação x100. ns: Não houve significância estatística.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 18 - Ensaio de migração celular por *Wound Healing* após tratamento com APX2009 em células MCF-7



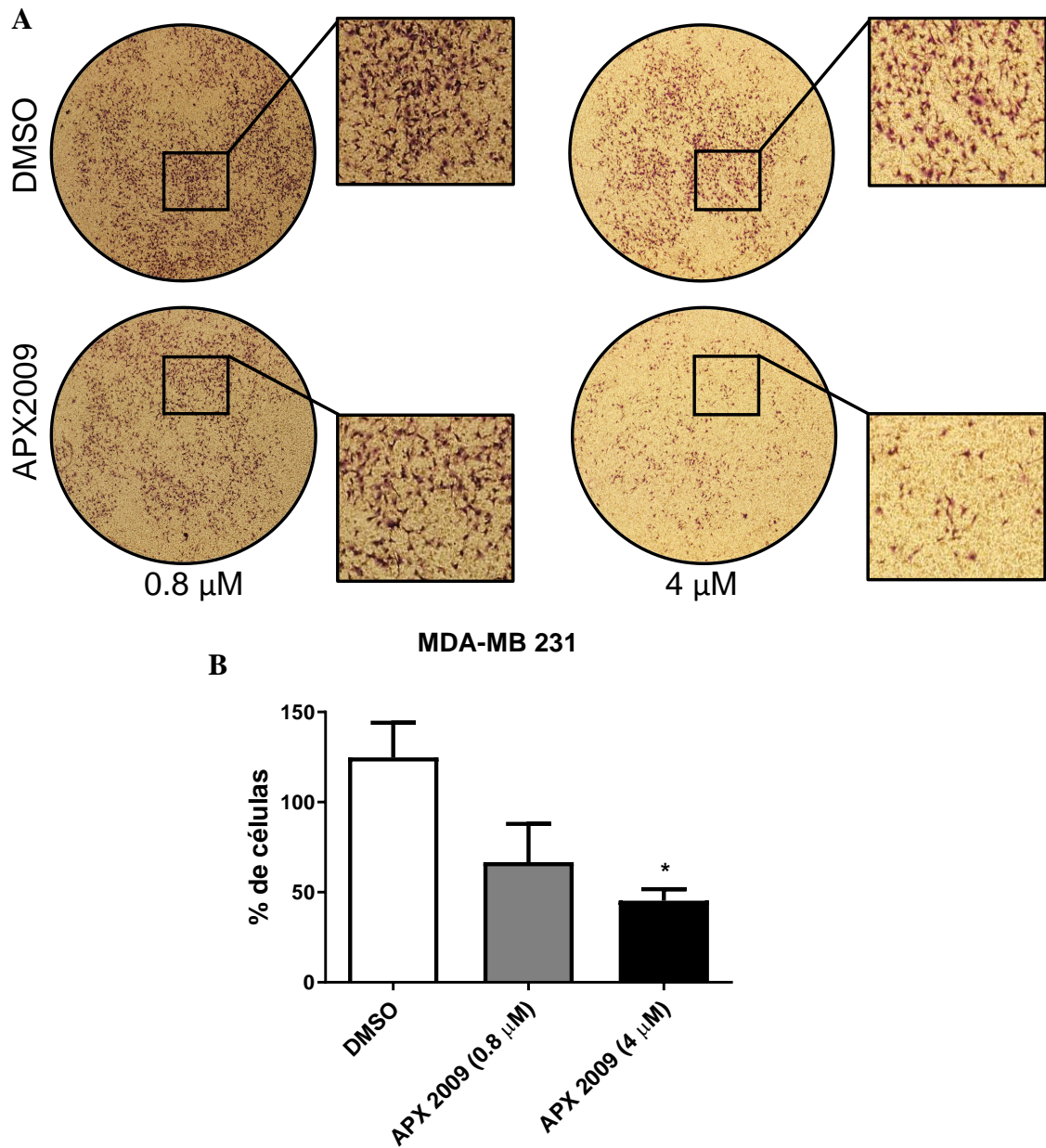
Legendas: Ensaio representativo de cicatrização de feridas (*Wound Healing*) avaliando a migração celular em 24h após o tratamento com APX2009 a 4μM em células MCF-7 (A). Os gráficos representam as médias das porcentagens da capacidade migratória de células em três experimentos individuais, conforme indicado pela porcentagem de fechamento da ferida (B). Ampliação x100. ns: Não houve significância estatística.

Fonte: A autora, 2019.

4.6. Análise do potencial de invasão celular da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1

Com o objetivo de avaliar o potencial invasivo de células de câncer de mama após inibição da porção redox de APE1, o ensaio de Matrigel Transwell foi realizado. Os resultados obtidos para essa avaliação na linhagem MDA-MB231 sugerem uma redução significativa da invasão celular após 24 horas do tratamento com o inibidor APX2009 na concentração de 4 μM, quando comparado à médias dos controlos de DMSO (Figura 19). Para a outra concentração testada (0.8 μM) não foi observado nenhuma alteração significativa (Figura 19 B). Esses resultados sugerem que a inibição da porção redox de APE1 apresenta alguma influência no potencial maligno das células de câncer de mama referentes ao subtipo triplo negativo. Análises para a linhagem MCF-7 não foram concluídas devido ao isolamento social necessário no combate ao vírus da COVID-19 ocorrido durante boa parte do ano de 2020.

Figura 19 - Ensaio de invasão celular por Matrigel Transwell após tratamento com APX2009 em células MDA-MB-231



Legenda: Ensaio representativo Matrigel Transwell que avalia o potencial invasivo 24h após o tratamento com APX2009 a 0.8 e 4 μ M de MDA-MB-231 (A). O gráfico de barras representa o potencial invasivo relativo de células MDA-MB-231 de três experiências individuais (\pm S.D). As células foram coradas com violeta cristal e DMSO foi usado como controle respectivo. Ampliação x200 (A). Os dados foram expressos como média \pm DP. * p <0,05 referente ao controle de DMSO.

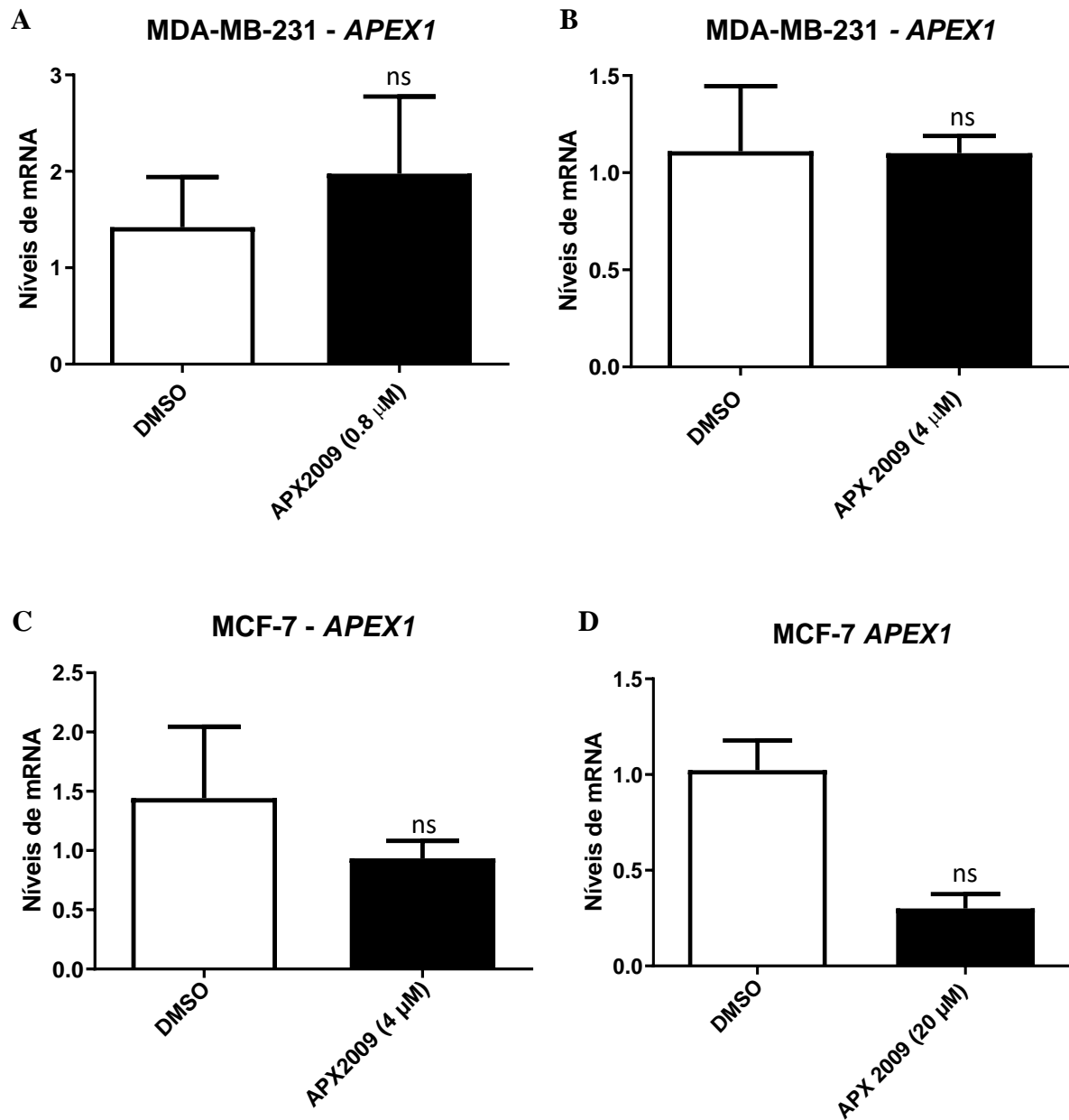
Fonte: A autora, 2020.

4.7. Análises dos níveis de mRNA de *APEX1* em células MDA-MB-231 e MCF-7

A fim de avaliar se o tratamento com o inibidor APX2009 altera os níveis de mRNA de *APEX1*, foi realizado o ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) com as duas linhagens estudadas após 24 horas do tratamento. As concentrações de APX2009 ou DMSO usadas nesse ensaio foram de 0.8 e 4 μ M para a linhagem MDA-MB-231 (Figura 20 A e B) e 4 e 20 μ M para a linhagem MCF-7 (Figura 20 C e D). Os resultados indicam que o tratamento com o inibidor do domínio redox de APE1, não influencia significativamente os níveis de mRNA de *APEX1* em ambas as linhagens testadas quando comparadas com seus respectivos controles de DMSO em nenhuma das concentrações testadas.

Com o intuito de comparar os níveis de mRNA de *APEX1* entre as duas linhagens estudadas, foi feita uma análise entre os respectivos controles de DMSO na concentração de 4 μ M das duas linhagens. O resultado indicou que a expressão desse gene não é significativamente diferente entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 (Figura 21).

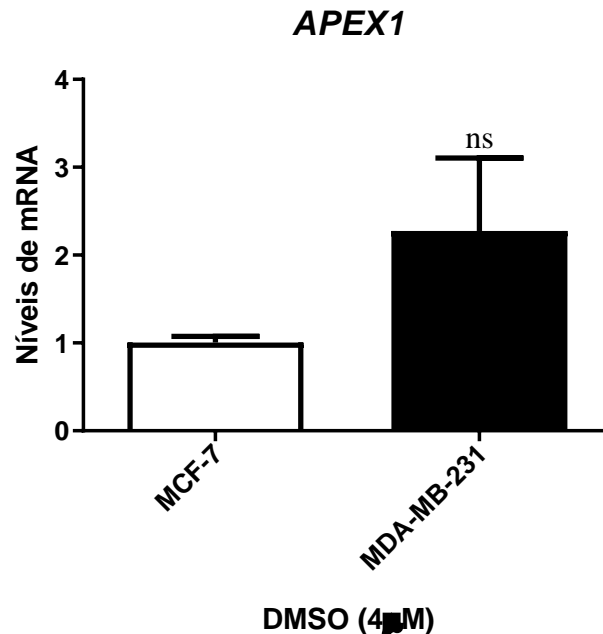
Figura 20 - Níveis de mRNA de *APEX1* após tratamento com o inibidor APX2009 na linhagem MDA-MB-231 e MCF-7



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais dos níveis relativos de mRNA de *APEX1* após tratamento com o inibidor APX2009 nas concentrações de 0.8 μ M (A) e 4 μ M (B) na linhagem celular MDA-MB-231 e nas concentrações de 4 μ M (C) e 20 μ M (D) na linhagem celular MCF-7 e seus respectivos controles de DMSO. *ACTNB* foi usada como gene de referência. ns: Não houve significância estatística.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 21 - Comparação dos níveis de mRNA de *APEX1* entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais dos níveis relativos de mRNA de *APEX1* nas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 nas concentrações respectivas de 0,8 e 4 μ M de DMSO. *ACTNB* foi usada como gene de referência. ns: Não houve significância estatística.

Fonte: A autora, 2020.

4.8. Análise dos níveis de mRNA do marcador epitelial *CDH1* e do marcador mesenquimal *CDH2* nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7

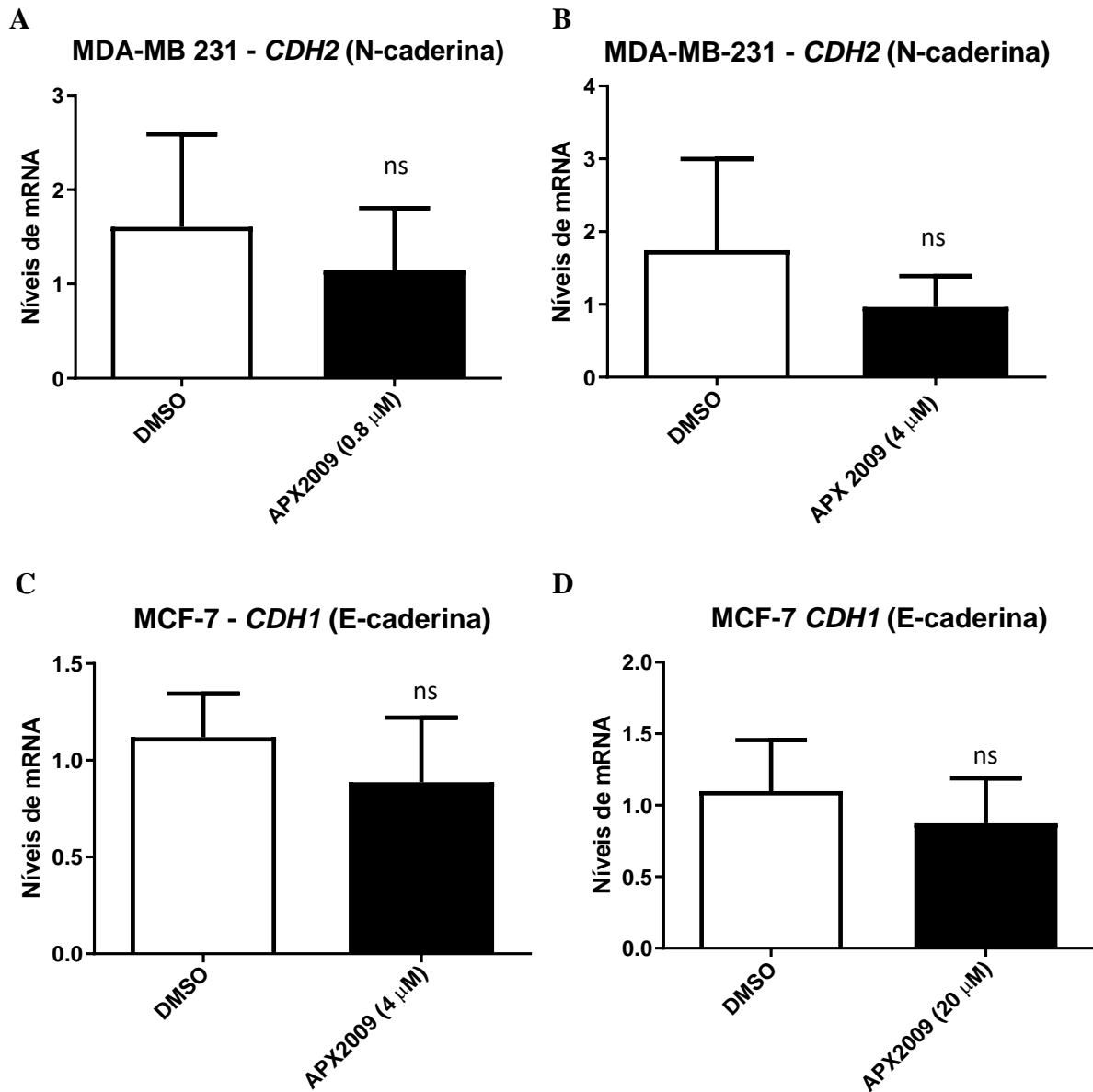
Para avaliar a relação do domínio redox de APE1 com marcadores clássicos da EMT nas linhagens de câncer de mama, analisamos os níveis de mRNA desses marcadores, após 24 horas do tratamento com o inibidor APX2009, através de RT-qPCR. Os marcadores utilizados foram o epitelial *CDH1* que codifica a proteína E-caderina e o marcador mesenquimal *CDH2* que codifica a proteína N-caderina.

Os resultados mostraram que, o inibir do domínio redox de APE1 não altera os níveis de mRNA de *CDH2* nas células MDA-MB-231 (0,8 e 4 μ M) (Figura 22 A e B). Não houve amplificação da amostra na RT-qPCR desse marcador na linhagem MCF-7.

Para a linhagem MCF-7 não houve alteração significativa dos níveis de mRNA de *CDH1* após tratamento com o inibidor APX2009 nas concentrações de 4 e 20 μ M, quando

comparado com o DMSO (Figura 22 C e D). Não foi observado amplificação da amostra na RT-qPCR desse marcador na linhagem MDA-MB 231.

Figura 22 - Níveis de mRNA dos marcadores *CDH2* na linhagem MDA-MB-231 e *CDH1* na linhagem MCF-7 após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais dos níveis relativos de mRNA de *CDH2* (N-caderina), na linhagem celular MDA-MB-231 após tratamento com o inibidor APX2009 nas concentrações de 0.8 μ M (A) e 4 μ M (B) e de *CDH1* (E-caderina), na linhagem celular MCF-7 nas concentrações de 4 μ M (C) e 20 μ M (D). *ACTNB* foi usada como gene de referência. ns: Não houve significância estatística.

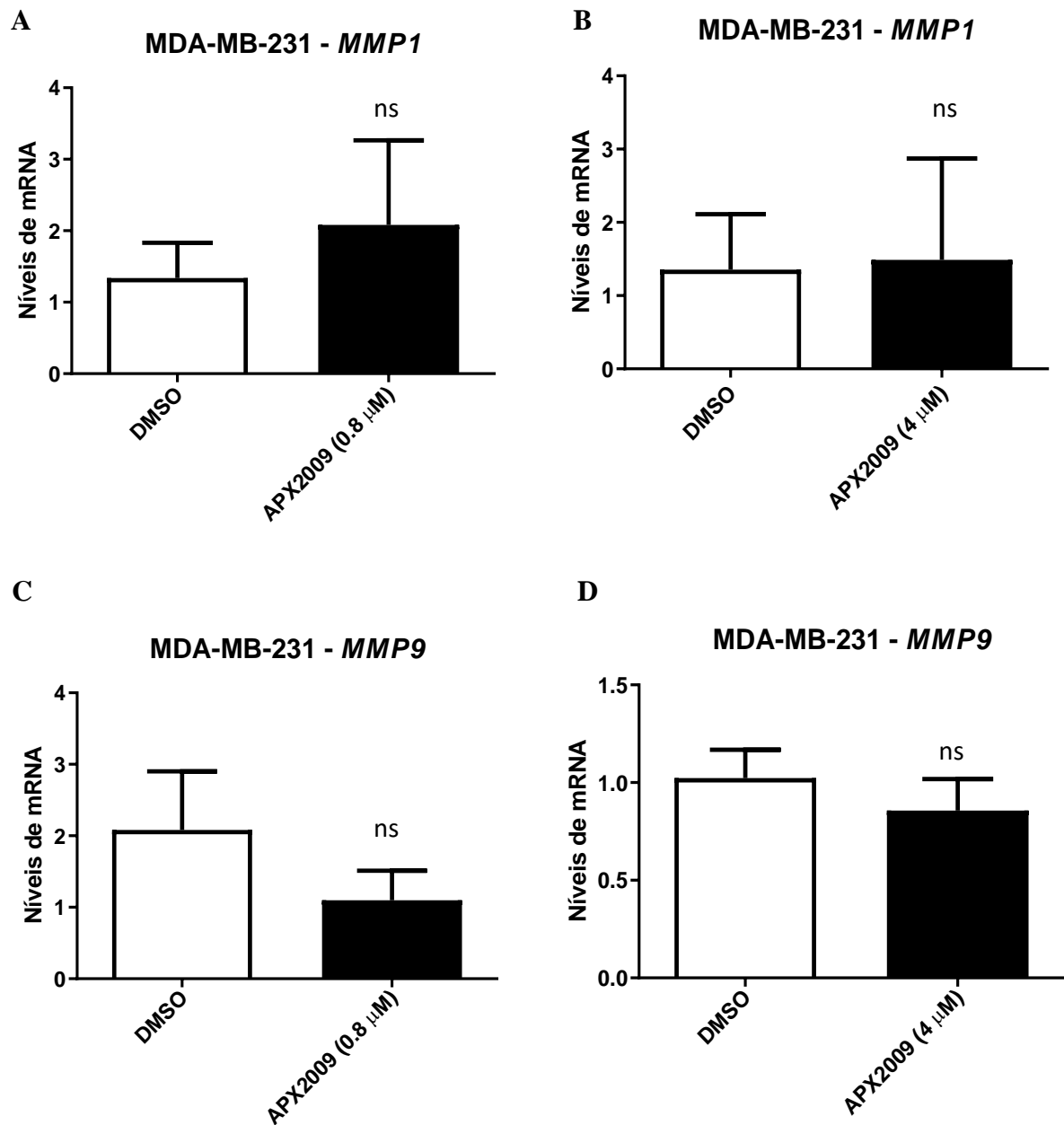
Fonte: A autora, 2020.

4.9. Análise dos níveis de mRNA das metaloproteinases de matriz (*MMPs*) nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7

Com o objetivo de avaliar os níveis relativos dos mRNAs dos genes de metaloproteinases *MMP1* e *MMP9* após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1, foi realizado uma RT-qPCR utilizando *iniciadores* específicos para cada gene.

Os resultados obtidos sugerem que na linhagem MDA-MB-231, não há alteração significativa nos níveis de mRNA de *MMP1* (Figura 23 A e B), assim como não houve alterações para o gene *MMP9* (Figura 23 C e D) em nenhuma das concentrações testadas quando comparados com seus respectivos controles de DMSO. Para a linhagem MCF-7, os mesmos resultados foram observados, onde não houve alteração nos níveis de mRNA para nenhum dos genes testados (Figura 24).

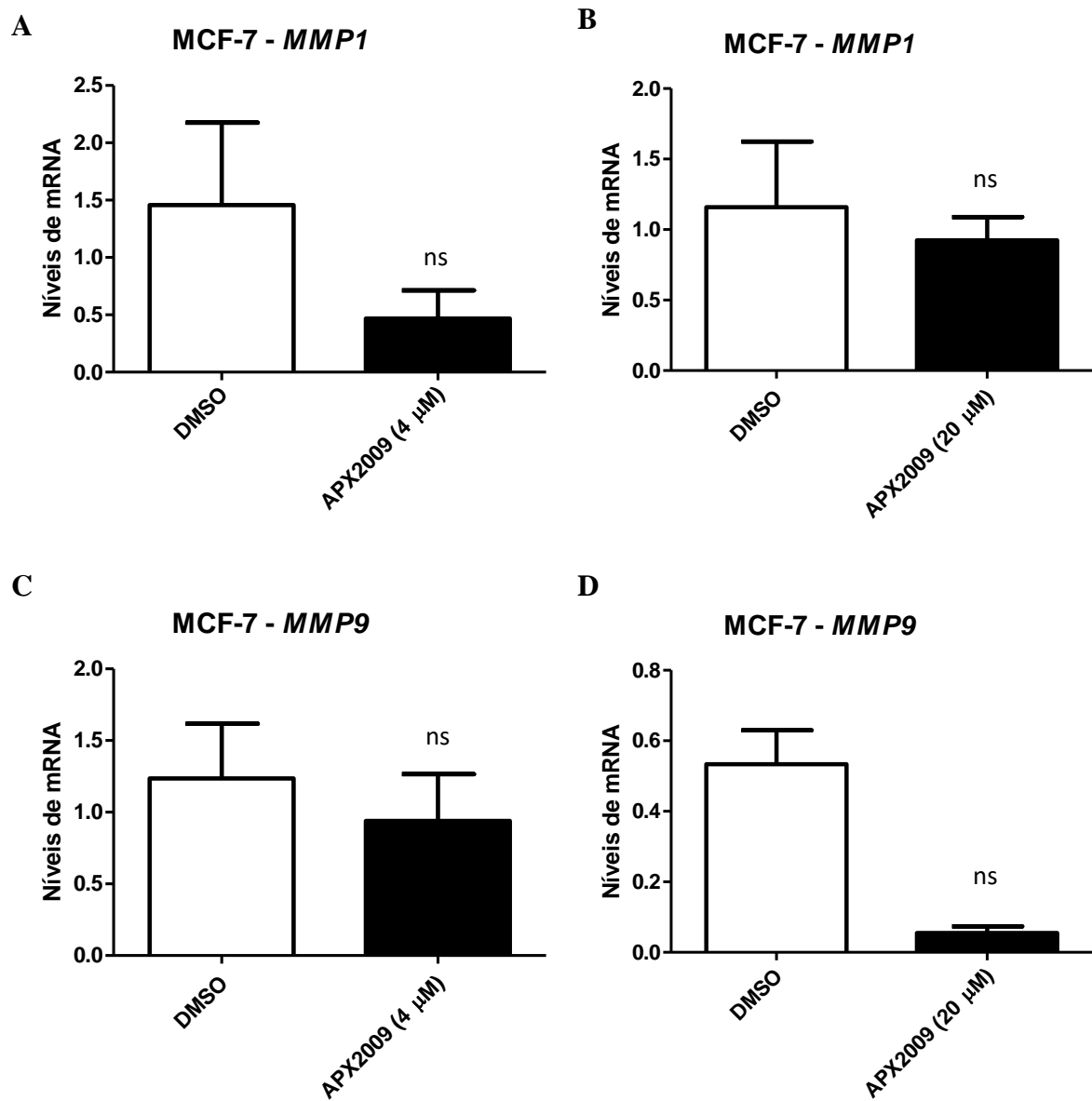
Figura 23 - Níveis de mRNA de *MMP1* e *MMP9* após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1 na linhagem MDA-MB-231



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais dos níveis relativos de mRNA de *MMP1* após tratamento do inibidor APX2009 nas concentrações 0.8 μM (A) e 4 μM (B) e do gene *MMP9* na concentração de 0.8 μM (C) e 4 μM (D) de APX2009 na linhagem celular MDA-MB-231. DMSO foi usado como controle com mesma concentração. *ACTNB* foi usada como gene de referência. ns: Não foi observado significância estatística.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 24 - Níveis de mRNA de *MMP1* e *MMP9* após tratamento com inibidor do domínio redox de APE1 na linhagem MCF-7



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais dos níveis relativos de mRNA de *MMP1* após tratamento do inibidor APX2009 nas concentrações 4 μM (A) e 20 μM (B) e do gene *MMP9* na concentração de 4 μM (C) e 20 μM (D) de APX2009 na linhagem celular MCF-7. DMSO foi usado como controle com mesma concentração. *ACTNB* foi usada como gene de referência. ns: Não foi observado significância estatística.

Fonte: A autora, 2020.

5. DISCUSSÃO

A proteína APE1 vem sendo estudada como um alvo terapêutico para diversos tipos de cânceres devido ao seu papel no reparo do DNA e na regulação de diversos fatores de transcrição, como NF- κ B, HIF-1 α , p53 e STAT3, através do seu domínio redox (ALI *et al.*, 2017; CASTON *et al.*, 2020; FISHEL *et al.*, 2019).

A fim de avaliar APE1 no câncer de mama, através do banco de dados do TCGA-BRCA, foi utilizado uma assinatura gênica de atividade de APE1. Além de ser composta por genes que apresentam uma forte correlação com APE1, os genes que compõe essa assinatura também estão relacionados com um pior prognóstico em câncer de mama. Essa assinatura foi proposta a partir de uma abrangente lista de proteínas que representam o *interactome* global de APE1, onde os autores Ayyildiz *et al.*, (2020) utilizaram dados do TCGA e focaram sua atenção nos 11 tipos de cânceres mais relevantes e que continham um conjunto de dados com o maior número de genes de pior prognóstico, incluindo o câncer de mama. Para cada tipo de câncer, um conjunto de genes foi apresentado, no entanto, no artigo, os autores focaram mais suas análises de bioinformática com os dados de TCGA de fígado, pulmão e pâncreas. O conjunto de genes obtidos com os dados de câncer de mama foram cedidos pelo autor Emiliano Dallas e seu grupo (Ayyildiz *et al.*, 2020), possibilitando a utilização dessa assinatura no presente estudo.

A partir dessa assinatura, as análises com as amostras de pacientes do banco de dados do TCGA-BRCA, sugerem que a assinatura gênica de atividade de APE1 é mais expressa no tumor primário de mama do que nas amostras não tumorais, corroborando com os dados demonstrados por Woo *et al.* (2014), sugerindo que APE1 pode ter sua atividade aumentada no tumor de mama. Além disso, em outros tipos de câncer, diversos estudos também sugerem que APE1 é mais expresso no tumor do que em tecido não tumoral, como por exemplo no câncer de colón, bexiga, ovário, próstata e no carcinoma hepatocelular, (CAO *et al.*, 2020; CODRICH *et al.*, 2019; FISHEL *et al.*, 2019; MCILWAIN *et al.*, 2018; MOORE *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 2017).

Para avaliar a relação de APE1 com a via de NF- κ B, que é um dos fatores de transcrição regulados pelo domínio redox de APE1, foi utilizado uma assinatura de genes que se relacionam com a sinalização e atividade de NF- κ B em amostras de tumor primário e esses genes também foram avaliados em células tumorais circulantes (CTCs) de mama com fenótipo mesenquimal ou epitelial. Popeda *et al.* (2019) apontaram 15 genes (*FADD*, *TLR7*, *TNFRSF11A*, *IL1RAP*,

PSMD7, TICAM1, IRF3, BCL10, IKBKE, TRAF6, RELA, IKBKG, TBK1, PSMB10 e *CYLD*) envolvidos na regulação da sinalização e atividade de NF- κ B e que são positivamente regulados em tumores primários de mama e também em CTCs de mama. Além disso, a partir de estudos da literatura, outros 11 genes (*CCRL2, PBK, TNFSF13, BIRC5, TAPBP, ELK1, STAT6, ATG10, IFNAR1, CCND3* e *MAP2K1*) foram listados como diferencialmente expressos e relacionados com a via de NF- κ B. Assim, um total de 26 genes foram apresentados por Popeda *et al.* e, dentre esses 26 genes, os autores apontaram um top 12 genes que se apresentaram mais expressos nas CTCs mesenquimais do que em CTCs com fenótipo epitelial. Esses 12 genes (*FADD, TLR7, CCRL2, PBK, TNFSF13, BIRC5, TNFRSF11A, IL1RAP, IRF3, TICAM1, PSMD7, TAPBP*) formaram a assinatura gênica da via de NF- κ B utilizada neste trabalho, e os pacientes que apresentaram a maior expressão dessa assinatura, foram considerados de fenótipo mesenquimal e de alta atividade de NF- κ B.

A partir de então, para avaliar a relação de APE1 e NF- κ B, foi feito primeiramente uma análise de correlação entre essas duas assinaturas gênicas utilizando os dados dos pacientes do TCGA-BRCA. Os pacientes foram organizados a partir da maior expressão da assinatura de APE1 e os resultados mostraram uma correlação positiva e moderada entre ambas as assinaturas. Como a assinatura de NF- κ B apresenta uma característica mesenquimal naqueles pacientes de alta expressão, essa correlação positiva sugere então que aqueles pacientes com alta expressão da assinatura de APE1 também vão apresentar um perfil mais mesenquimal e consequentemente, aqueles de baixa expressão da assinatura, um perfil epitelial. Além disso, vale destacar que a assinatura de APE1 *high* corresponde a uma alta atividade de APE1 e como essa assinatura se correlaciona positivamente com a assinatura de NF- κ B, é sugerido então que pacientes com alta atividade de APE1 também vão apresentar uma alta atividade de NF- κ B.

Utilizando essas duas assinaturas, foram realizadas análises dos subtipos tumorais de mama entre os pacientes que apresentavam alta (*high*) e baixa (*low*) expressão das assinaturas de APE1 e NF- κ B. O subtipo LumA, considerado de melhor prognóstico (GAO; SWAIN, 2018), foi o subtipo mais observado entre os pacientes com as assinaturas *low*. Além disso, esses pacientes também sugerem uma dominância do grau tumoral I e II, sugerindo a ideia de um perfil mais epitelial e consequentemente, um prognóstico mais favorável. Por outro lado, para a assinatura *high*, houve uma alta variação entre os subtipos, sendo observado em maiores quantidades os grupos LumB, Basal e Claudin-low, grupos reconhecidos por apresentarem um prognóstico de intermediário a mau (DIAS *et al.*, 2017; LI, Z. *et al.*, 2016; MILIOLI *et al.*, 2017). Além disso, o subtipo LumA foi o menos observado, e ocorreu uma predominância do grau tumoral II e III, no entanto, vale ressaltar que dentre os pacientes com assinaturas *high*, há

aqueles que apresentaram o grau tumoral IV, que não foi observado entre os pacientes com assinatura *low*. O grau tumoral IV é equivalente a um tumor mais avançado, e conseqüentemente, o grau mais associado a ocorrência de invasão e metástase (LI, C. I.; MALONE; DALING, 2003), auxiliando na ideia de que esses pacientes apresentem um perfil mesenquimal, e conseqüentemente, de pior prognóstico quando comparados aos das assinaturas *low*.

A ocorrência de metástase é o principal motivo que leva a causa de morte pelo câncer de mama. Um dos mecanismos de metástase do câncer é a transição epitelial-mesenquimal (EMT), que é um processo biológico no qual as células perdem seu fenótipo epitelial e obtêm características migratórias mesenquimais. Essas mudanças no fenótipo das células são resultado da expressão alterada de genes que são controlados por fatores de transcrição como *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB2*, entre outros (MATYSIAK *et al.*, 2017). Dentre os principais genes alterados podem ser citados a baixa expressão de *CDH1*, que codifica E-caderina, e a alta expressão dos genes *CDH2* (N-caderina), *VIM* (Vimentina) e *FNI* (Fibronectina). Além disso, a alteração de expressão de metaloproteinases de matriz também são importantes no processo da EMT, pois elas são responsáveis por degradar a matriz extracelular (GOOSSENS *et al.*, 2017). O questionamento acerca de uma relação de APE1 com a EMT no câncer já foi levantado por alguns autores. Yang *et al.*, (2018), sugerem que a atividade redox da proteína APE1 controla o processo de EMT em células de câncer de pulmão através do fator de transcrição TGF- β . No entanto, não há na literatura qualquer relato desta relação no câncer de mama. Com isso, foi feita uma análise dos genes clássicos da EMT em pacientes, através dos dados do TCGA-BRCA, que expressaram as assinaturas de APE1 e NF- κ B *high* e *low*. Essas análises tiveram como objetivo, avaliar a hipótese de que APE1 regula genes importantes do processo da EMT através do fator de transcrição NF- κ B. Vale lembrar, que aqueles pacientes que expressam alta atividade de APE1 também vão mostrar alta atividade de NF- κ B.

Os resultados mostraram que os pacientes que expressam as assinaturas gênicas de atividade de APE1 e da via NF- κ B *high* apresentam uma alta expressão dos marcadores mesenquimais N-caderina e fibronectina, além da alta expressão das metaloproteinases de matriz e baixa do marcador E-caderina, confirmando que essas assinaturas apresentam um perfil mais mesenquimal. Por outro lado, aqueles pacientes que expressam as assinaturas *low*, apresentam uma expressão mais alta do marcador epitelial E-caderina e uma expressão mais baixa dos marcadores mesenquimais e das metaloproteinases, novamente, confirmando a característica epitelial. Com isso, esses achados confirmam a hipótese de que APE1 atua como um regulador da expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais clássicos do processo de

EMT e também de metaloproteinases de matriz, através da atividade de NF- κ B em amostras *in silico* de pacientes de câncer de mama (Figura 25 A)

Com relação ao domínio redox de APE1, o seu papel ainda não foi totalmente elucidado, e conseqüentemente, diversos inibidores específicos já foram apresentados para o estudo desse domínio. Entre os inibidores redox de APE1 existentes, o APX2009, faz parte da segunda geração de moléculas desenvolvidas a partir da molécula APX3330 ou E3330 (KELLEY *et al.*, 2016). Vários estudos já indicaram que o APX2009 tem um potencial elevado no tratamento do câncer, como cólon, bexiga e próstata (CODRICH *et al.*, 2019; FISHEL *et al.*, 2019; MCILWAIN *et al.*, 2018). No entanto, não há estudos sobre a inibição redox de APE1 utilizando o inibidor APX2009 em modelos de câncer de mama. Portanto, APX2009 foi o inibidor escolhido para realizar a inibição do domínio redox de APE1 nesse estudo.

Nossos dados sugerem que o tratamento com APX2009 reduz significativamente a proliferação de células MDA-MB-231 nas concentrações de 20 e 100 μ M e de células MCF-7 apenas na concentração de 100 μ M, sugerindo uma maior sensibilidade da linhagem MDA-MB-231 do que da MCF-7. Em relação ao potencial de formação de colônias, Guerreiro *et al.*, 2017 indicam resultados significativos na inibição da formação de colônias a 50 μ M de APX3330, enquanto nossos resultados mostraram que o APX2009, foi capaz de induzir uma redução significativa na formação de colônias para ambas as linhagens testadas em uma concentração mais baixa (4 μ M) que o inibidor APX3330. Esses resultados foram essenciais para determinar as concentrações usada nos outros ensaios realizados neste trabalho.

Comparativamente, nossos dados indicam que o APX2009 é 12 vezes mais eficaz que o APX3330 para inibir a proliferação de células MDA-MB-231 quando comparado aos resultados de Guerreiro *et al.* Com isso, o APX2009 se mostra um inibidor eficiente e potente do domínio redox da APE1 em linhagens celulares de câncer de mama. Além disso, realizando uma comparação com outro tipo celular de câncer, MCILWAIN *et al.*, (2018) compararam os efeitos de APX2009 e APX3330 em células de câncer de próstata e sugerem que o tratamento com APX2009 era cerca de 7,5 vezes mais eficaz para inibir a proliferação dessas células do que o tratamento com APX3330.

Como sabido, a atividade redox de APE1 é descrita na regulação de vários fatores de transcrição (NF- κ B, HIF-1 α , p53 e STAT3) que estão clássica e fortemente relacionados à migração celular, invasão e, conseqüentemente, agressividade tumoral (BHAKAT; MANTHA; MITRA, 2009; JIANG, S. *et al.*, 2015; KELLEY; M. R.; GEORGIADIS; L. FISHEL, 2012). Nas células de câncer de mama, esses fatores transcricionais orquestram o fenótipo maligno da

linhagem celular agressiva MDA-MB-231, atuando na migração e invasão celular (AHMAD *et al.*, 2010; PIRES *et al.*, 2017).

Os ensaios de migração realizados no presente estudo tiveram uma redução do SFB, pois a viabilidade celular afetaria a migração das células. Como resultado, nenhuma alteração foi observada na migração de células de câncer de mama em ambas as linhagens testadas, no entanto, para confirmar esses resultados, se faz necessário novas análises com outras concentrações como 4 μM para MDA-MB-231 e 20 μM para a linhagem MCF-7. Contudo, GUERREIRO *et al.*, 2017 sugerem que após inibição redox de APE1 com APX3330, a migração celular na linhagem MDA-MB-231 apenas foi significativamente reduzida quando combinado com docetaxel³. Esses resultados apontados sugerem então, que apenas a inibição da porção redox de APE1 na concentração testada, não apresenta influência na migração de células tumorais de mama. Vale ressaltar que não há relatos na literatura de alteração na migração celular após tratamento com o inibidor APX2009 em nenhum tipo celular. Por outro lado, com o inibidor APX3330, a migração foi significativamente reduzida em outros tipos celulares, como células cancerígenas pancreáticas (JIANG, Y. *et al.*, 2010; ZOU; MAITRA, 2008), bem como em células endoteliais da retina (JIANG, A. *et al.*, 2011).

Entre o fenótipo maligno das células cancerígenas, a capacidade de invasão tecidual é um passo essencial para o desenvolvimento de metástases. Em relação aos estudos de câncer de mama, as células MDA-MB-231 têm sido amplamente utilizadas em estudos por apresentarem um fenótipo maligno (AHMAD *et al.*, 2010; GUERREIRO *et al.*, 2013, 2017). Com isso, nesse estudo investigamos os efeitos da inibição redox de APE1 no potencial de invasão de células MDA-MB-231. Nossos resultados sugerem que o tratamento com o inibidor APX2009 (4 μM), foi suficiente para reduzir significativamente a capacidade de invasão das células estudadas. Por outro lado, no estudo realizado por GUERREIRO *et al.*, (2017), o tratamento com o inibidor redox de APE1 (APX3330) por si só não alterou significativamente a invasão de células MDA-MB-231, no entanto, uma diminuição no potencial invasivo das células apenas foi observado quando o inibidor foi combinado com o tratamento com docetaxel. Portanto, nossos achados sugerem que a inibição do domínio redox de APE1 por APX2009 é capaz de reduzir o potencial invasivo de células tumorais agressivas de mama. Vale ressaltar que a concentração de 0.8 μM de APX2009 não indicou alteração no potencial de invasão da linhagem MDA-MB-231 assim como não alterou o potencial migratório na mesma linhagem (Figura 25 B).

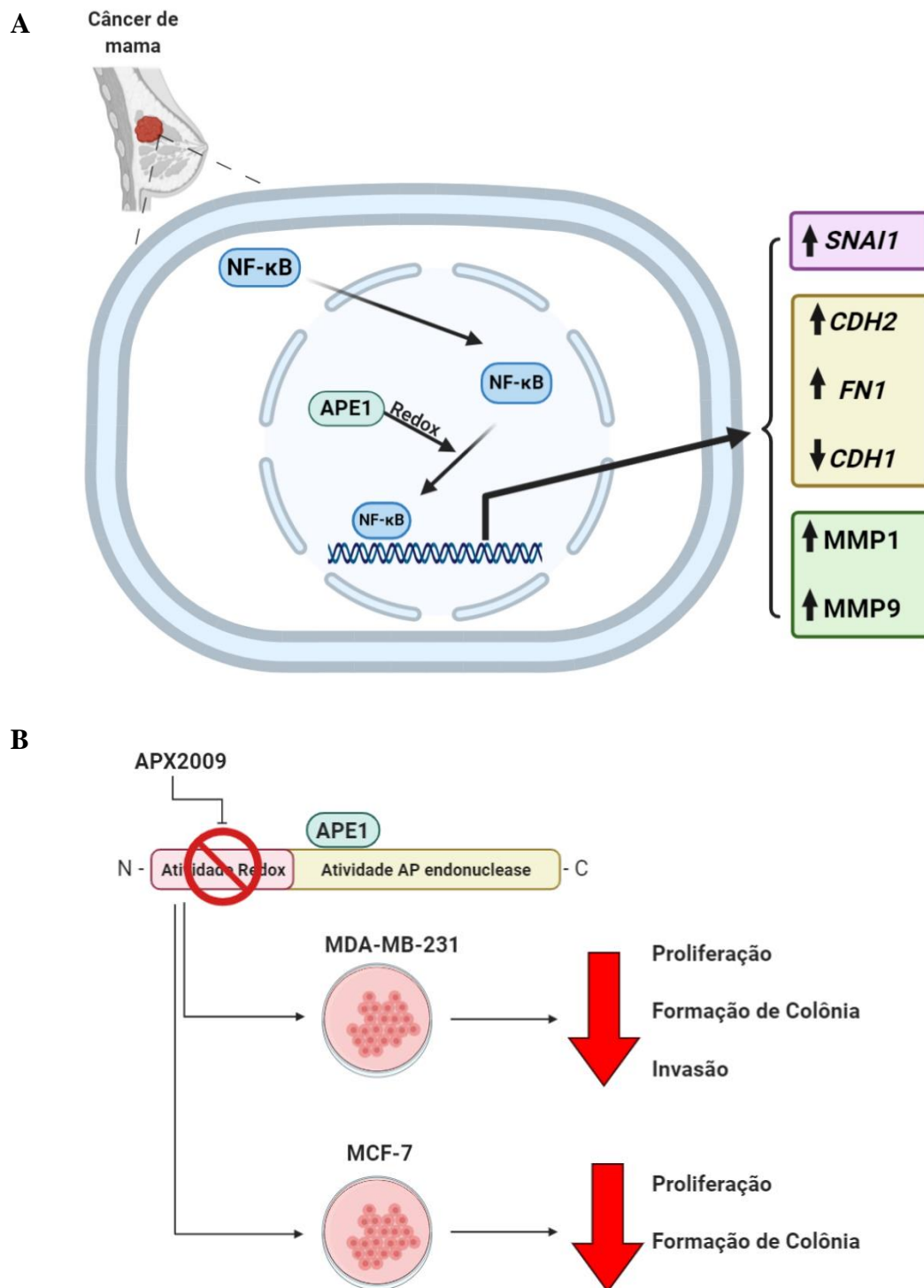
³ Antineoplásico usado no tratamento quimioterápico do câncer.

O inibidor APX2009 atua aumentando as ligações dissulfeto através de resíduos de cisteínas e com isso inibindo a atividade do domínio redox de APE1 (CODRICH *et al.*, 2019). Não há relatos na literatura se há alguma influência desse inibidor no gene de APE1, *APEX1*, a nível de mRNA, em linhagens de câncer de mama. Com isso, realizamos ensaios de RT-qPCR que indicaram que não há alteração significativas nos níveis de mRNA desse gene em ambas as linhagens de câncer de mama estudados. No entanto, para a linhagem MCF-7 há uma tendência de diminuição nos níveis de mRNA após tratamento com APX2009 na concentração de 20 μ M quando compara com o controle de DMSO, porém, o número de experimentos realizados (n=3) não foi suficiente para que o teste estatístico indicasse uma significância, com isso, novos experimentos com essa concentração se fazem necessários. Além disso, comparando os níveis de mRNA de *APEX1* entre as linhagens estudadas, não foi observado uma diferença significativa. Vale ressaltar que nossos resultados são a nível de mRNA do gene *APEX1* e é necessário que experimentos a nível de proteína também sejam realizados.

Considerando que APE1 está envolvido na regulação de fatores de transcrição que atuam regulando genes envolvidos na EMT, avaliamos uma possível relação do domínio redox de APE1 com marcadores clássicos de EMT. Os dados sugerem que, não há alteração no nível de mRNA de E-caderina (*CDH1*) em células MCF-7 quando comparado ao controle. Alguns autores sugerem que a linhagem MCF-7 apresenta pouca expressão da proteína APE1 (KARIMI-BUSHERI *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2019), e que essa linhagem apresenta baixos níveis dos fatores indutores da EMT (BLICK *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2017). Por conta disso, é possível que a abordagem com relação a essa linhagem pode não ser a mais adequada para estudar os efeitos de APE1 e EMT.

Com relação ao marcador mesenquimal N-caderina (*CDH2*) na linhagem MDA-MB-231, e as metaloproteinases de matriz *MMP1* e *MMP9* em ambas as linhagens, nenhuma alteração nos níveis de mRNA foi observada. No entanto, na linhagem MCF-7, os níveis de mRNA do gene *MMP9* sugerem uma tendência de redução após tratamento com a concentração de 20 μ M, quando comparado com seu respectivo controle de DMSO, porém devido ao número de experimentos (n=3) o teste estatístico não indicou uma alteração significativa. Com isso, novos experimentos com essa concentração se fazem necessários. Esses resultados sugerem até o momento que a inibição da porção redox de APE1 pelo inibidor APX2009 não apresenta influência a nível de mRNA, de genes relacionados com o processo da EMT. No entanto, como o tratamento com esse inibidor apresentou diminuição significativa no potencial de invasão da linhagem MDA-MB-231, é necessário que outras vias sejam estudadas.

Figura 25 - Ilustração esquemática dos principais resultados



Legenda: Ilustrações esquemáticas dos resultados obtidos neste trabalho. (A) Relação de APE1 e NF- κ B na regulação de marcadores clássicos do processo de EMT (*SNAI1*, *CDH2* (N-caderina), *FN1* (Fibronectina), *CDH1* (E-caderina)) e também de metaloproteinases de matriz (*MMP1* e *MMP9*), considerando os níveis de mRNA. (B) Inibição do domínio redox de APE1 através do inibidor APX2009 que levou a diminuição do potencial de proliferação, formação de colônia nas linhagens de câncer de mama MDA-MB231 e MCF-7. Para a linhagem MDA-MB231 houve redução do potencial de invasão. Criado em BioRender.com.

Fonte: A autora, 2021.

CONCLUSÃO

A proteína APE1 apresenta um papel fundamental no desenvolvimento do câncer através da sua atuação no reparo do DNA e também pela regulação de diversos fatores de transcrição. Com isso, neste trabalho, vimos o efeito do inibidor da porção redox de APE1 no potencial de proliferação, formação de colônia, potencial de migração e invasão. Além disso, sugerimos sua atuação na regulação de genes envolvidos na transição epitélio-mesenquimal através da atuação de NF- κ B no câncer de mama.

Nossos achados concluem que:

- a) A atividade de APE1 é maior em amostras tumorais que em não tumorais e a assinatura de APE1, que indica sua atividade, apresenta uma relação positiva com a atuação da via de NF- κ B;
- b) A alta atividade de APE1 e da via de NF- κ B estão mais relacionadas com subtipos tumorais de pior prognóstico;
- c) APE1 se mostrou um regulador dos níveis de mRNA de marcadores clássicos do processo de EMT e também de metaloproteinases de matriz, através da atividade de NF- κ B;
- d) O tratamento com o inibidor do domínio redox de APE1 foi capaz de diminuir a proliferação celular, assim como a formação de colônias em duas linhagens celulares de câncer de mama com características de agressividade diferentes;
- e) O potencial migratório das células de câncer de mama estudadas não foi alterado, no entanto, o potencial de invasão foi reduzido em células com alto perfil de agressividade após tratamento com inibidor redox de APE1;
- f) O inibidor do domínio redox de APE1 usado não influencia os níveis de mRNA de *APEX1* e nem de genes envolvidos na EMT;
- g) Esses dados reforçam para APE1 como possível foco no desenvolvimento de novas drogas anticâncer, através da utilização de inibidores da função redox.
- h) Mais experimentos com as concentrações do inibidor APX2009, usadas neste trabalho, se fazem necessários para confirmar alguns dos achados *in vitro*. Esses experimentos não puderam ser realizados devido ao distanciamento social exigido durante o ano de 2020 por conta da pandemia do coronavírus.

REFERÊNCIAS

ABBOTTS, R.; MADHUSUDAN, S. Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 5, p. 425–435, 2010. DOI: 10.1016/j.ctrv.2009.12.006.

AHMAD, A. et al. FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extra-cellular matrix degrading factors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 2, p. 337–346, 2010. DOI: 10.1007/s10549-009-0572-1.

ALI, R. et al. DNA damage repair in breast cancer and its therapeutic implications. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 156–165, 2017. DOI: 10.1016/j.pathol.2016.11.002.

ALMUTAIRI, F. et al. Association of DNA Repair Gene APE1 Asp148Glu Polymorphism with Breast Cancer Risk. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1155/2015/869512.

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.

BHAKAT, K. K.; MANTHA, A. K.; MITRA, S. Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 621–637, 2009. DOI: 10.1089/ars.2008.2198.

BLICK, T. et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 25, n. 6, p. 629–642, 2008. DOI: 10.1007/s10585-008-9170-6.

BUSTIN, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000. DOI: 10.1677/jme.0.0250169.

CAO, L. et al. APEX1 is a novel diagnostic and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. **Aging**, v. 12, n. 5, p. 4573–4591, 2020. DOI: 10.18632/aging.102913.

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, p. 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**, 2020. 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, p. e70909, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0070909.

CHEN, J.; CHEN, Z. J. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 4–12, 2013. DOI: 10.1016/j.coi.2012.12.005.

CHOI, S.; JOO, H. K.; JEON, B. H. Dynamic Regulation of APE1/Ref-1 as a Therapeutic Target Protein. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 2, p. 75, 2016. DOI: 10.4068/cmj.2016.52.2.75.

CHU, L. et al. CTC enumeration and characterization as a pharmacodynamic marker in the phase I clinical study of APX3330, an APE1/Ref-1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15, p. e14531–e14531, 2019. DOI: 10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e14531.

CODRICH, M. et al. Inhibition of APE1-endonuclease activity affects cell metabolism in colon cancer cells via a p53-dependent pathway. **DNA Repair**, v. 82, p. 102675, 2019. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102675.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929–43, 2015.

DIAS, K. et al. Claudin-Low Breast Cancer: Clinical & Pathological Characteristics. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0168669, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0168669.

DOMENIS, R. et al. The Redox Function of APE1 Is Involved in the Differentiation Process of Stem Cells toward a Neuronal Cell Fate. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89232, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089232.

FISHEL, M. L. et al. Antitumor activity and mechanistic characterization of APE1/ReF-1 inhibitors in bladder cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 11, p. 1947–1960, 2019. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1166.

FISHEL, M. L. et al. Impact of APE1/Ref-1 Redox Inhibition on Pancreatic Tumor Growth. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1698–1708, 2011. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0107.

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.

FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018. DOI: 10.1016/j.soc.2017.08.005.

GAO, J. J.; SWAIN, S. M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. **The Oncologist**, v. 23, n. 5, p. 556–565, 2018. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0535.

GEORGIADIS, M. M. et al. Evolution of the redox function in mammalian apurinic/aprimidinic endonuclease. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 643, n. 1-2, p. 54-63, 2008. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.04.008.

GOOSSENS, S. et al. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 2, p. 584–591, 2017. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.06.006.

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. The APE1 redox inhibitor E3330 reduces collective cell migration of human breast cancer cells and decreases chemoinvasion and colony formation when combined with docetaxel. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, n. 4, p. 561–571, 2017. DOI: 10.1111/cbdd.12979.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. DOI: 10.1186/gb-2007-8-5-r76.

HGNC, HUGO Gene Nomenclature Committee. **Symbol report for APEX1**. Disponível em: <https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:587>. Acesso em: 22 set. 2020.

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.

HUANG, D.-B. et al. The role of DNA in the mechanism of NFκB dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits. **Structure**, v. 5, n. 11, p. 1427–1436, 1997. DOI: 10.1016/S0969-2126(97)00293-1.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>. Acesso em: 18 jan. 2021.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). **Tipos de Câncer: Câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 4 dez. 2020.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2019.

JIANG, A. et al. Inhibition of APE1/Ref-1 redox activity with APX3330 blocks retinal angiogenesis in vitro and in vivo. **Vision Research**, v. 51, n. 1, p. 93–100, 2011. DOI: 10.1016/j.visres.2010.10.008.

JIANG, S. et al. Ape1 regulates WNT/ β -catenin signaling through its redox functional domain in pancreatic cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 2, p. 610–620, 2015. DOI: 10.3892/ijo.2015.3048.

JIANG, Y. et al. Reduced expression of DNA repair and redox signaling protein APE1/Ref-1 impairs human pancreatic cancer cell survival, proliferation, and cell cycle progression. **Cancer Investigation**, v. 28, n. 9, p. 885–895, 2010. DOI: 10.3109/07357907.2010.512816.

KARIMI-BUSHERI, F. et al. Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 3, p. R31, 2010. DOI: 10.1186/bcr2583.

KELLEY, M. R. et al. Identification and characterization of new chemical entities targeting apurinic/aprimidinic endonuclease 1 for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 2, p. 300–309, 2016. DOI: 10.1124/jpet.116.235283.

KELLEY, M.; GEORGIADIS, M.; FISHEL, M. APE1/Ref-1 Role in Redox Signaling: Translational Applications of Targeting the Redox Function of the DNA Repair/Redox Protein APE1/Ref-1. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 36–53, 2012. DOI: 10.2174/1874467211205010036.

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 & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 2531–2544, 2017. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.01.028.

LI, C. I.; MALONE, K. E.; DALING, J. R. Differences in Breast Cancer Stage, Treatment, and Survival by Race and Ethnicity. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 1, p. 49, 2003. DOI: 10.1001/archinte.163.1.49.

LI, Z. et al. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65024–65033, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.11344.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

LOGSDON, D. P. et al. Blocking HIF signaling via novel inhibitors of CA9 and APE1/Ref-1 dramatically affects pancreatic cancer cell survival. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13759, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-32034-9.

LUO, M. et al. Characterization of the redox activity and disulfide bond formation in apurinic/aprimidinic endonuclease. **Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 695–705, 2012. DOI: 10.1021/bi201034z.

MA, X. et al. Downregulation of APE1 potentiates breast cancer cells to olaparib by inhibiting PARP-1 expression. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 176, n. 1, p. 109–117, 2019. DOI: 10.1007/s10549-019-05189-w.

MASHAYEKHI, F. et al. The association of ApE1 -656T>G and 1349T>G polymorphisms with breast cancer susceptibility in northern Iran. **Cellular and Molecular Biology**, v. 61, n. 4, p. 70–74, 2015. DOI: 10.14715/cmb/2015.61.4.12.

MATYSIAK, M. et al. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 295, n. 4, p. 817–825, 2017. DOI: 10.1007/s00404-017-4304-1.

MCILWAIN, D. W. et al. APE1/Ref-1 redox-specific inhibition decreases survivin protein levels and induces cell cycle arrest in prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 9, n. 13, p. 10962–10977, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.23493.

METZGER-FILHO, O. et al. Patterns of Recurrence and Outcome According to Breast Cancer Subtypes in Lymph Node–Negative Disease: Results From International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 25, p. 3083–3090, 2013. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.1574.

MILIOLI, H. H. et al. Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes. **BMC Medical Genomics**, v. 10, n. 1, p. 19, 2017. DOI: 10.1186/s12920-017-0250-9.

MOORE, D. et al. Alterations in the expression of the DNA repair/redox enzyme APE/ref-1 in epithelial ovarian cancers. **American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 602–609, 2000.

NEIL, J. R.; SCHIEMANN, W. P. Altered TAB1:I B Kinase Interaction Promotes Transforming Growth Factor -Mediated Nuclear Factor- B Activation during Breast Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 68, n. 5, p. 1462–1470, 2008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3094.

NIETO, M. A. et al. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

NISHI, T. et al. Spatial Redox Regulation of a Critical Cysteine Residue of NF-κB in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44548–44556, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M202970200.

OHL, I. C. B. et al. Ações públicas para o controle do câncer de mama no Brasil: revisão integrativa. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, n. 4, p. 793–803, 2016. DOI: 10.1590/0034-7167.2016690424i.

PANTUCK, A. J. et al. NF- B-Dependent Plasticity of the Epithelial to Mesenchymal Transition Induced by Von Hippel-Lindau Inactivation in Renal Cell Carcinomas. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 752–761, 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2211.

PARK, M. S. et al. Cytoplasmic localization and redox cysteine residue of APE1/Ref-1 are associated with its anti-inflammatory activity in cultured endothelial cells. **Molecules and Cells**, v. 36, n. 5, p. 439–445, 2013. DOI: 10.1007/s10059-013-0195-6.

PIRES, B. R. B. et al. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. **Genes**, v. 9, n. 1, p. 24, 2018. DOI: 10.3390/genes9010024.

PIRES, B. R. B. et al. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169622, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169622.

PIRES, B. R. B.; MENCALHA, A. L.; ABDELHAY, E. S. F. W. Molecular Mechanisms of NF-κB on Cancer Promotion and Progression. **Journal of the Senologic International Society**, v. 2, n. 1, 2013.

POLETTI, M. et al. Inhibitors of the apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1)/nucleophosmin (NPM1) interaction that display anti-tumor properties. **Molecular Carcinogenesis**, v. 55, n. 5, p. 688–704, 2016. DOI: 10.1002/mc.22313.

POPEDA, M. et al. NF-kappa B Signaling-Related Signatures Are Connected with the Mesenchymal Phenotype of Circulating Tumor Cells in Non-Metastatic Breast Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1961, 2019. DOI: 10.3390/cancers11121961.

PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, S.-F. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 325–338, 2018. DOI: 10.1016/j.cpet.2018.02.004.

RAFFOUL, J. J.; HEYDARI, A. R.; HILLMAN, G. G. DNA Repair and Cancer Therapy: Targeting APE1/Ref-1 Using Dietary Agents. **Journal of Oncology**, v. 2012, p. 1–11, 2012. DOI: 10.1155/2012/370481.

RAI, G. et al. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–Activity Relationships of a Novel Class of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3101–3112, 2012. DOI: 10.1021/jm201537d.

ROYCHOUDHURY, S. et al. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE1) Is Acetylated at DNA Damage Sites in Chromatin, and Acetylation Modulates Its DNA Repair Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 6, 2017. DOI: 10.1128/mcb.00401-16.

RUSSNES, H. G. et al. Breast Cancer Molecular Stratification. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 2017. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.04.022.

SABATIER, R. et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 228, 2014. DOI: 10.1186/1476-4598-13-228.

SHAH, F. et al. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 19, 2017. DOI: 10.1038/s41698-017-0023-0.

SHAHDA, S. et al. **A phase I study of the APE1 protein inhibitor APX3330 in patients with advanced solid tumors.** *Journal of Clinical Oncology*. [S.l.: s.n.], 2019

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 14, n. 10, p. 611–629, 2017. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.44.

SHIMIZU, N. et al. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 8, p. 877–881, 2000. DOI: 10.1038/78496.

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. 117822341000400, 2010. DOI: 10.1177/117822341000400004.

SUN, S.-C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Research*, v. 21, n. 1, p. 71–85, 2011. DOI: 10.1038/cr.2010.177.

TELL, G. et al. The Intracellular Localization of APE1/Ref-1: More than a Passive Phenomenon? *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 7, n. 3–4, p. 367–384, 2005. DOI: 10.1089/ars.2005.7.367.

TELL, G.; FANTINI, D.; QUADRIFOGLIO, F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 21, p. 3589–3608, 2010. DOI: 10.1007/s00018-010-0486-4.

WALKER, L. J. et al. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Molecular and cellular biology*, v. 13, n. 9, p. 5370-5376, 1993. DOI: 10.1128/MCB.13.9.5370.

WANG, D. et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer*, v. 66, n. 3, p. 298–304, 2009. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.02.019.

WEN, X. et al. APE1 overexpression promotes the progression of ovarian cancer and serves as a potential therapeutic target. *Cancer Biomarkers*, v. 17, n. 3, p. 313–322, 2016. DOI: 10.3233/CBM-160643.

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.

WHO, World Health Organization. **Breast**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2021.

WILSON, D. M.; SIMEONOV, A. Small molecule inhibitors of DNA repair nuclease activities of APE1. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 21, p. 3621–3631, 2010. DOI: 10.1007/s00018-010-0488-2.

WOO, J. et al. Prognostic Value of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1) Expression in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99528, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0099528.

YANG, X. et al. The regulatory role of APE1 in epithelial-to-mesenchymal transition and in determining EGFR-TKI responsiveness in non-small-cell lung cancer. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 9, p. 4406–4419, 2018. DOI: 10.1002/cam4.1717.

YERSAL, O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 412, 2014. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.412.

ZHANG, Q. et al. Nuclear Factor- κ B-Mediated Transforming Growth Factor- β -Induced Expression of Vimentin Is an Independent Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 10, p. 3557–3567, 2009. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1656.

ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 4, p. 361–373, 2018. DOI: 10.1007/s11684-018-0656-6.

ZOU, G. M.; MAITRA, A. Small-molecule inhibitor of the AP endonuclease 1/REF-1 E3330 inhibits pancreatic cancer cell growth and migration. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 7, p. 2012–2021, 2008. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0113.