

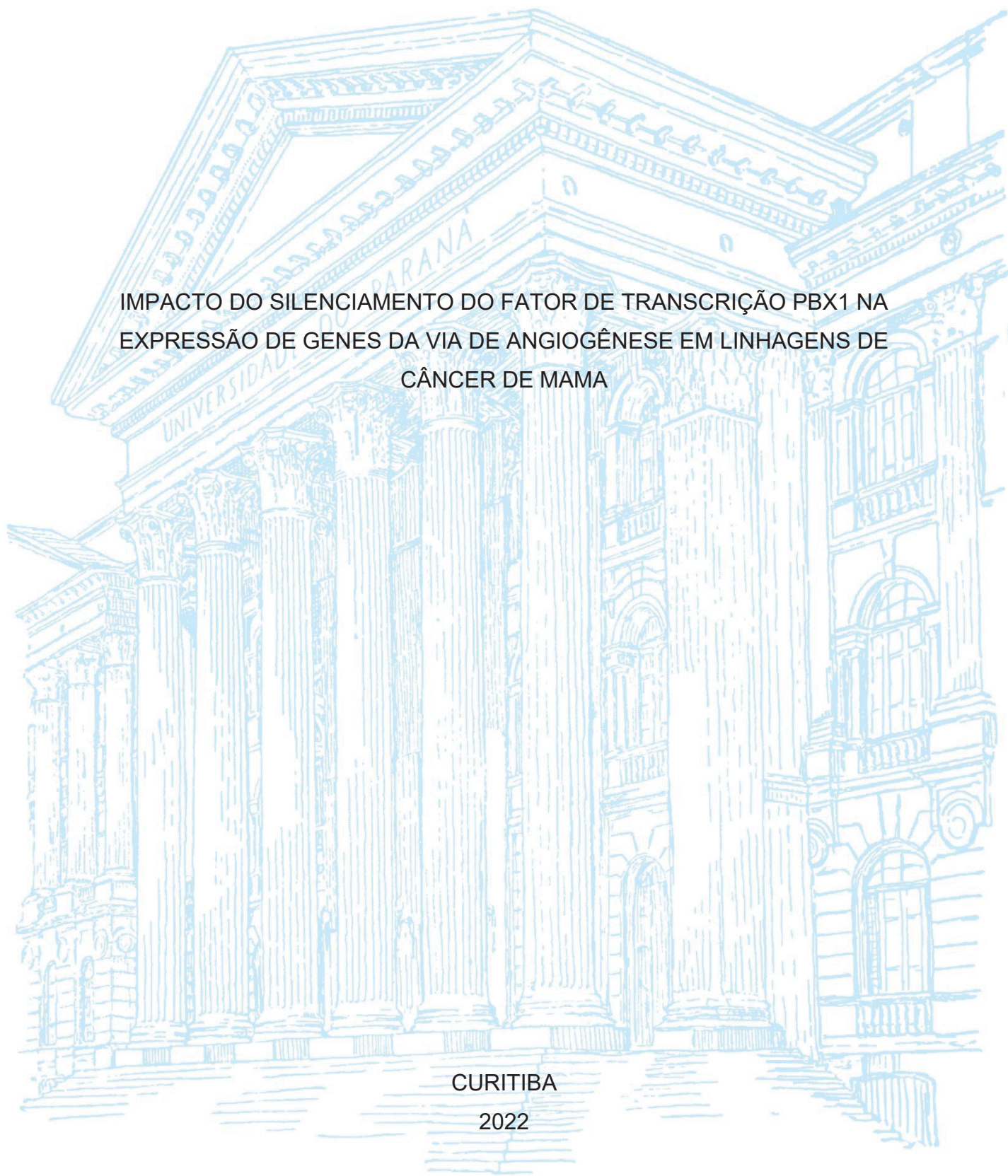
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ NATH LUDWIG

IMPACTO DO SILENCIAMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PBX1 NA
EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ANGIOGÊNESE EM LINHAGENS DE
CÂNCER DE MAMA

CURITIBA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ NATH LUDWIG

IMPACTO DO SILENCIAMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PBX1 NA
EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE ANGIOGÊNESE EM LINHAGENS DE
CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Daniela Fiori Gradia

Coorientadora: Prof.^a Dr^a. Jaqueline Carvalho de Oliveira

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ludwig, Beatriz Nath

Impacto do silenciamento do fator de transcrição PBX1 na expressão de genes da via de angiogênese em linhagens de câncer de mama / Beatriz Nath Ludwig. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Fiori Gradia.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Jaqueline Carvalho de Oliveira.

1. Mamas - Câncer. 2. Técnicas de silenciamento de genes. I. Gradia, Daniela Fiori, 1971-. II. Oliveira, Jaqueline Carvalho de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de BEATRIZ NATH LUDWIG intitulada: **Impacto do silenciamento do fator de transcrição PBX1 na expressão de genes da via de angiogênese em linhagens de câncer de mama.**, sob orientação da Profa. Dra. DANIELA FIORI GRADIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Junho de 2022.

Assinatura Eletrônica

27/06/2022 12:11:58.0

DANIELA FIORI GRADIA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/06/2022 11:41:52.0

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/06/2022 06:52:20.0

DIB AMMAR

Avaliador Externo (41001010)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 199676
Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 199676

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Daniela Fiori Gradia por aceitar me orientar, confiar no meu trabalho e pela oportunidade de fazer parte do LabCHO. Agradeço pela paciência, conselhos, amizade e carinho depositado em mim antes mesmo de eu chegar em Curitiba, que com certeza fizeram a diferença e melhoraram minha experiência profissional e pessoal. Você mostrou que além da chegada no destino, a viagem também pode ser especial.

À minha coorientadora, Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira, pelas ideias, sugestões, amizade e carinho nessa trajetória, que com certeza enriqueceu não somente este trabalho, mas também a mim.

A todos meus colegas de laboratório do LabCHO, por me acolherem nessa casa, por tudo que me ensinaram, pelos momentos de descontração, aflição, desabafos, risadas e limpezas da sala de cultivo e do freezer -80°C. Em especial, gostaria de agradecer a técnica do LabCHO Ana Luiza Mattana por toda a ajuda, broncas, apoio técnico e emocional.

À minha família, em especial meus pais, Francisco e Marlene, e meu irmão Vinicius pelo incentivo para que eu seguisse meus sonhos.

Ao meu companheiro e melhor amigo, Rodrigo, por todo o amor, carinho, motivação e compreensão nos meus momentos de ausência. Obrigada por não me deixar desistir.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direto ou indiretamente para este trabalho.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”

Benjamim Disraeli

RESUMO

Câncer é o termo dado para descrever um conjunto de mais de 100 patologias, as quais possuem em comum a capacidade de crescer descontroladamente e invadir tecidos adjacentes. Os *hallmarks* do câncer, propostos por Hanahan & Weinberg consistem em um grupo de características importantes para progressão e manutenção da doença. Dentre eles, o *hallmark* da angiogênese é relevante principalmente para a metástase e nutrição do tumor, provendo oxigênio e nutrientes para que ele cresça e possa invadir outros tecidos. O fator de transcrição PBX1 possui diversas funções associadas à biologia do desenvolvimento, e nos últimos anos, as pesquisas o associaram a diversos *hallmarks* do câncer, incluindo o processo de angiogênese. Este trabalho buscou explorar correlações da expressão diferencial de *PBX1* e com genes envolvidos na via de angiogênese e impactos funcionais do silenciamento do mesmo no contexto de linhagens de câncer de mama. Ainda, para fins de melhor compreensão do papel de PBX1 em pan-cancer, análises em bancos de dados públicos foram investigadas. Através de análise de transcriptoma de amostras de pacientes com câncer de mama, disponíveis em bancos de dados públicos, observou-se uma maior expressão de *PBX1* nos subtipos luminais em comparação com os demais. Esta diferença está relacionada com o aumento na expressão em amostras positivas para os receptores hormonais de estrogênio e progesterona em relação às que não os expressam. No entanto, análises de sobrevida, não indicam que a expressão aumentada ou diminuída deste gene seja um marcador prognóstico. Ao se avaliar o impacto do silenciamento de *PBX1* em genes envolvidos na via de angiogênese na linhagem celular de câncer de mama MCF7 foi possível obter um silenciamento de aproximadamente 40% da expressão deste gene, 48 horas após a transfecção. O silenciamento não provocou um impacto na viabilidade ou proliferação celular, porém houve diminuição significativa ($p < 0,05$) na capacidade clonogênica. Observou-se também o aumento ($p < 0,05$) na expressão do fator anti-angiogênico *TIMP1* e diminuição na expressão de *VEGFA* ($p < 0,001$) e de *ANGPT4* ($p < 0,01$), dois fatores pró-angiogênicos, em decorrência da diminuição da expressão de *PBX1*. Na linhagem MDA-MB-231, a expressão de *PBX1* não foi detectada por RT-qPCR ou por *immunoblotting*, apesar de ter sido observada em dados públicos de RNAseq. Estes resultados sugerem que PBX1 pode participar da via de angiogênese, particularmente nos tumores de mama positivos para receptores de estrogênio, atuando como um oncogene. Finalmente, para uma visão mais global do papel de PBX1 nos processos tumorais, utilizando informações do banco de dados do TCGA, observa-se uma expressão diferencial deste gene em 16 tipos tumorais com impacto na sobrevida dos pacientes de câncer de células claras de rim (KIRC), tornando-o um bom candidato a futuras investigações nesta patologia.

Palavras-chave: Câncer de mama. PBX1. Angiogênese

ABSTRACT

Cancer is the term given to describe a set of more than 100 pathologies, which have in common the ability to grow uncontrollably and invade adjacent tissues. Cancer hallmarks, proposed by Hanahan & Weinberg, consist of a group of characteristics shared by almost, if not all cancers, and are important for disease progression and maintenance. Among them, the hallmark of angiogenesis is relevant mainly for tumor metastasis and nutrition, providing oxygen and nutrients for it to grow and invade other tissues. The transcription factor PBX1 has several functions associated with developmental biology, and in recent years, research has associated it with several hallmarks of cancer, including the process of angiogenesis. This work sought to evaluate the relationship of PBX1 in genes involved in the angiogenesis pathway in the context of breast cancer. Through transcriptome analysis of samples from breast cancer patients, available in public databases, we observed a higher expression of PBX1 in luminal subtypes than the others. This difference is related to the increased expression in positive samples for estrogen and progesterone hormone receptors compared to those that do not. However, survival analyzes do not indicate that increased or decreased expression of this gene is a prognostic marker. We also sought to evaluate the impact of PBX1 silencing on genes involved in the angiogenesis pathway in MCF7 breast cancer cell line. In this strain, we obtained a silencing of approximately 40% of the expression of this gene 48 hours after transfection. The silencing did not cause an impact on cell viability or proliferation, but there was a significant decrease ($p < 0.5$) in clonogenic capacity. There was an increase ($p < 0.5$) in the expression of the anti-angiogenic factor TIMP1 and a reduction of VEGFA ($p < 0.001$) and ANGPT4 ($p < 0.01$), two pro-angiogenic factors, as a result of the decreased expression of PBX1. Despite being observed in public RNAseq data, in the MDA-MB-231 strain, PBX1 expression was not detected by RT-qPCR or immunoblotting. These results suggest that PBX1 may participate in the angiogenesis pathway, particularly in estrogen receptor-positive breast tumors, acting as an oncogene. Finally, for a more global view of the role of PBX1 in tumor processes, using information from the TCGA database, a differential expression of this gene was observed in 16 tumor types with an impact on the survival of patients with clear cell kidney cancer (KIRC), making it a good candidate for future investigations in this pathology.

Key words: Breast cancer. PBX1. Angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de carcinogênese e fatores transcricionais moduladores envolvidos nas etapas de iniciação, promoção e progressão.....	20
Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando o desequilíbrio entre ativadores e inibidores de angiogênese.	26
Figura 3: Processo de estímulo da angiogênese pelo tumor primário avascular	27
Figura 4: Hipótese da normalização da vascularização do tumor.....	30
Figura 5: Fatores de transcrição e reprogramação celular	33
Figura 6: Fatores de transcrição oncogênicos	34
Figura 7: Esquema da placa de 6 poços utilizada para transfecção de siPBX1 e controle negativo e tempos que as células foram coletadas	42
Figura 8: Esquema representativo de placa de 96 poços utilizada para plaqueamento e análise dos ensaios de viabilidade e proliferação.....	43
Figura 9: Esquema representativo de placa de 96 poços utilizada para plaqueamento e análise dos ensaios de capacidade clonogênica	44
Figura 10: Análise comparativa da expressão de PBX1 em amostras de câncer de mama.....	51
Figura 11: Comparação da expressão de PBX1 entre subtipos de câncer de mama de acordo com a classificação de PAM50	52
Figura 12: Análise da expressão de PBX1 em amostras com diferenças na expressão de receptores de estrogênio e progesterona	53
Figura 13: Comparação da expressão de PBX1 entre amostras com diferentes status de receptores hormonais de estrogênio e progesterona.....	54
Figura 14 : Avaliação do impacto da expressão de PBX1 na sobrevida de pacientes com câncer de mama.....	55
Figura 15: Correlação do gene TIMP1 com o gene PBX1 em subtipos de câncer de mama Luminal A e Basal	58
Figura 16: Expressão relativa do gene PBX1 pós tratamento com siRNA e siCTRL (controle negativo).....	59
Figura 17: Expressão de PBX1 em linhagens MCF7 e MDA-MB-231 ...	60
Figura 18: Ensaio de viabilidade celular	61
Figura 19: Ensaio de proliferação celular.....	61

Figura 20: Ensaio de capacidade clonogênica	62
Figura 21: Análise da expressão dos genes TIMP1, ANGPTL4 e VEGF-A pós silenciamento de PBX1 na linhagem MCF7	63
Figura 22: Expressão de <i>PBX1</i> em 16 tipos de câncer e seus respectivos tecidos não tumorais	65
Figura 23: Mapa de sobrevida e gráficos de Kaplan-Meier para sobrevida geral dos cânceres HNSC e KIRC	66
Figura 24: Mapa de sobrevida e gráficos de Kaplan-Meier para sobrevida livre da doença do câncer de KIRC.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de subtipos de câncer de mama, suas características clínico-patológicas e abordagens terapêuticas.....	25
Quadro 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	46
Quadro 3: Componentes e volumes utilizados para preparo do gel de corrida (<i>Lower gel</i>) da eletroforese.....	47
Quadro 4: Componentes e volumes utilizados para preparo do gel de empilhamento (<i>Upper gel</i>) da eletroforese	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes da via da angiogênese com expressão correlacionada à <i>PBX1</i> no subtipo Luminal A.....	57
Tabela 2: Genes da via da angiogênese com expressão correlacionada à <i>PBX1</i> no subtipo basal.	57
Tabela 3: Genes da via da angiogênese com expressão correlacionada à <i>PBX1</i> no câncer subtipo KIRC	68

LISTA DE SIGLAS

AQP	<i>Aquaporins</i>
BRCA1	<i>Breast cancer gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer gene 1</i>
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
COX-2	<i>cyclooxygenase-2</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
DNMT3a	<i>DNA methyltransferase 3a</i>
EPC	<i>Endothelial progenitor cells</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
EZH2	<i>Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FABP	<i>L-type fatty acid-binding protein</i>
FABP 3-6	<i>fatty acid-binding protein 3-6</i>
FGF1/2	<i>Fibroblast Growth Factor 1 e 2</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HIF1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDC	<i>Intraductal Carcinoma</i>
IGF2	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP-2	<i>Insulin Like Growth Factor-2 mRNA Binding Protein-2</i>
IGFBP-3	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IGFBP-5	<i>Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5</i>
IGF2BP-3	<i>Insulin Like Growth Factor-2 mRNA Binding Protein- 3.</i>
ILC	<i>Intralobular Carcinoma</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
LabCHO	<i>Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética</i>
M1-rec	<i>muscarinic receptor 1</i>
M3-rec	<i>muscarinic receptor 3</i>

N-rec	<i>nicotinic acetylcholine receptor</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors gamma</i>
PR	<i>Progesteron Receptor</i>
TAF	<i>Tumor angiogenesis factor</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TIMER	<i>Tumor Immune Estimation Resource</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 CÂNCER.....	19
2.1.2 CÂNCER DE MAMA.....	21
2.2 ANGIOGÊNESE	25
2.2.1 ANGIOGÊNESE NO CÂNCER DE MAMA.....	30
2.3 FATORES DE TRANSCRIÇÃO	32
2.3.1 <i>PBX1</i>	34
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVO GERAL	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	39
5.1.1 Análise de expressão de <i>PBX1</i>	39
5.1.2 Análises de sobrevida.....	40
5.1.3 Seleção de genes relacionados à angiogênese	40
5.1.4 Análises de correlação	40
5.2 CULTIVO CELULAR.....	40
5.3 SILENCIAMENTO DE <i>PBX1</i>	41
5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	42
5.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO	43
5.6 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA.....	44
5.7 EXTRAÇÃO DE RNA.....	45
5.8 PREPARO DE cDNA.....	45

5.9 PCR QUANTITATIVA	46
5.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	47
5.11 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>IMMUNOBLOTTING</i>	47
5.12 EDIÇÃO DE IMAGENS, GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
6 RESULTADOS	51
6.1 Análise da expressão de <i>PBX1</i> em câncer de mama	51
6.3 Seleção de genes relacionados à angiogênese	56
6.4 Análises de correlação.....	56
6.5 O silenciamento de <i>PBX1</i> não impactou na viabilidade e proliferação celular na linhagem MCF7.....	58
6.5.1 Análise de viabilidade celular	60
6.6 O silenciamento de <i>PBX1</i> alterou a capacidade de formação de colônias em células da linhagem celular MCF7	62
6.7 O silenciamento de <i>PBX1</i> levou a alteração na expressão de genes da via de angiogênese	63
6.8. Análise de expressão de <i>PBX1</i> em outros tipos de câncer	63
6.9 A expressão de <i>PBX1</i> possui um impacto na sobrevida geral nos cânceres de HNSC e KIRC e na sobrevida livre da doença em KIRC	65
6.10 O gene <i>PBX1</i> está correlacionado com outros genes da via de angiogênese no câncer renal de células claras (KIRC).....	67
7 DISCUSSÃO	69
8 CONCLUSÕES	75
9 FUTURAS PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo em comum para mais de 100 patologias que possuem a característica de proliferação celular desordenada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes e distantes. Através de um processo complexo, a carcinogênese, essas células se tornam independentes e escapam dos mecanismos de controle intrínseco. Uma vez que estão se dividindo, podem invadir outros tecidos e espalhar-se para outros locais do corpo em um processo denominado metástase (INCA, 2020), criando inclusive novos recursos de manutenção própria, como angiogênese e expressão de fatores que inibem a apoptose (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres no mundo (WHO, 2020), representando um grande problema de saúde pública. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para o triênio de 2020 a 2022 no Brasil sejam diagnosticados cerca de 66.280 novos casos, correspondendo a 29,7% das neoplasias que acometem mulheres e a mais frequente delas, sem contar o câncer de pele não melanoma (INCA, 2020).

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

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

A heterogeneidade dos carcinomas mamários, é reflexo da variedade de perfis moleculares de cada subtipo. Diversas pesquisas são desenvolvidas para caracterizar essas assinaturas moleculares, na busca por biomarcadores. Fatores de transcrição são moléculas que governam a expressão gênica, modulando-a conforme a necessidade celular e importantes atores do processo de tumorigênese. O fator de transcrição PBX1 foi primeiramente identificado como um proto-oncogene em leucemia ((KAMPS et. al., 1990; NOURSE et. al., 1990) e desde então sua expressão tem sido relacionada com várias etapas da organogênese e também do desenvolvimento de tumores.

Existem estudos associando o gene *PBX1* com vários *hallmarks* do câncer, como sinalização de proliferação sustentada, invasão e metástase, resistência a apoptose, desregulação do metabolismo energético e indução a angiogênese (VEIGA, DE OLIVEIRA, GRADIA, 2021). A relação entre PBX1 e angiogênese em câncer de mama ainda não foi descrita, e sendo uma característica fundamental na progressão do câncer de mama, o objetivo deste trabalho é avaliar o impacto do silenciamento de PBX1 em genes da via de angiogênese em linhagens de câncer de mama.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

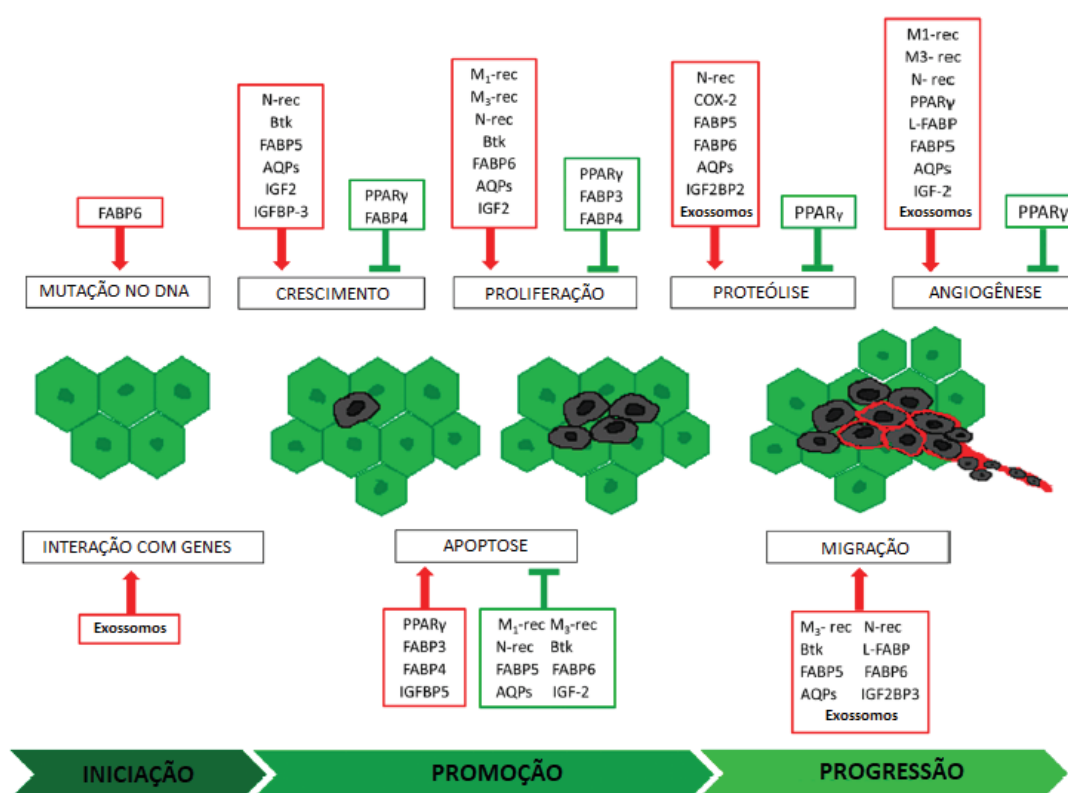
De acordo com os dados do ano de 2020 da GLOBOCAN, o câncer representou a segunda maior causa de morte em pessoas acima de 70 anos no Brasil e a primeira causa em países desenvolvidos, como Estados Unidos e Canadá, representando um grande problema de saúde pública (SUNG et. al., 2021). Dentre os cânceres diagnosticados, o de mama foi o mais comum, seguido por câncer de pulmão, colorretal, próstata e estômago (SUNG et. al., 2021). Para o ano de 2022, espera-se que nos Estados Unidos sejam diagnosticados cerca de 1,918,030 novos casos, e 609,360 pessoas morram de câncer, o equivalente a 170 mortes por dia. O maior número de óbitos estima-se que venham de cânceres de pulmão, próstata e colorretal em homens e pulmão, mama e colorretal em mulheres (SIEGEL et. al, 2022).

Em relação ao Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é que serão diagnosticados cerca de 625 mil casos novos de câncer. Os mais comuns serão o câncer de pele não melanoma (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021).

O termo câncer se refere a um grupo de mais de 100 doenças malignas que têm em comum a desordem na manutenção do crescimento celular. Carcinogênese é o processo de surgimento do descontrole dessas células e invasão para tecidos adjacentes e distantes, originado por diversos motivos, dentre eles eventos genéticos como deleções, inserções, translocações, mutações *non-sense* e mutações de ponto (DIEDERICHS et. al 2016; INCA, 2020). Esse processo é dividido em três grandes etapas, denominadas iniciação, promoção e progressão. Na etapa de iniciação, ocorrem erros de replicação e danos celulares, que caso não sejam reparados, são passados para a próxima geração de células na replicação. Ao escapar dos mecanismos de reparo, essas células passam para o próximo estágio de promoção; entram em diversos ciclos de replicação e seu crescimento não é reconhecido pelos mecanismos apoptóticos, tornando-se imune a estes sinais e resultando em um tumor grande em massa e restrito a um órgão. Por fim, na fase final de progressão ocorre a metástase, em que a matriz extracelular é degradada por metaloproteinases e

este tumor migra, através da circulação para órgãos próximos ou mesmo distantes. A sobrevivência deste tumor, agora denominado câncer, é dependente da criação de novos recursos, como formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e diversas alterações metabólicas, como expressão de sinais de indução durante todo este processo (Figura 1) (HERMANOWICZ; KWIATKOWSKA; PAWLAK, 2020)

Figura 1: Processo de carcinogênese e fatores transcricionais moduladores envolvidos nas etapas de iniciação, promoção e progressão.



Em vermelho, destacam-se os fatores indutores do processo, e em verde, os fatores inibitórios. M1-rec: *muscarinic receptor 1*; M3-rec: *muscarinic receptor 3*; N-rec: *nicotinic acetylcholine receptor*; COX-2: *cyclooxygenase-2*; PPAR γ : *peroxisome proliferator-activated receptors gamma*; Btk: *Bruton's tyrosine kinase*; FABP 3-6: *fatty acid-binding protein 3-6*; L-FABP: *L-type fatty acid-binding protein*; AQP5: *aquaporins*; IGF2: *insulin-like growth factor 2*; IGFBP-3: *insulin-like growth factor binding protein 3*; IGFBP5: *Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5*; IGF2BP2: *Insulin Like Growth Factor-2 mRNA Binding Protein-2*; IGF2BP3: *Insulin Like Growth Factor-2 mRNA Binding Protein-3*. Fonte: Adaptado de Hermanowicz, Kwiatkowska e Pawlak (2020)

Oncogenes ativos, genes supressores de tumor inativados, eventos epigenéticos ou processos infecciosos, podem levar à tumorigênese e conferir propriedades de manutenção tumoral (DIEDERICHS et. al 2016). Os *hallmarks* do câncer, descritos por Hanahan & Weinberg (HANAHAHAN & WEINBERG 2000; 2011; HANAHAHAN, 2022) descrevem as principais características que constituem um processo tumoral na maioria dos cânceres, considerando aspectos genéticos, bioquímicos e celulares. Os *hallmarks* originalmente descritos consistem em: capacidade de sinalização de proliferação sustentada, resistência à apoptose, indução à angiogênese, imortalidade replicativa, invasão e migração e evasão dos supressores de crescimento (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000). Com o avanço nas pesquisas na área do câncer, novos *hallmarks* foram adicionados na atualização publicada em 2011 (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011), sendo eles: desregulação celular energética, evasão do sistema imune, instabilidade genômica e mutações, e a capacidade de inflamação (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011). Mais recentemente na última versão publicada em 2022 novos *hallmarks* e características facilitadoras foram acrescentadas: plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética, senescência e microbioma polimórfico (HANAHAHAN, 2022).

Embora esses padrões sejam comuns em todos os tipos de cânceres, existem características que tornam o tumor único em cada local, bem como fatores que podem servir como marcadores de diagnóstico e prognóstico.

2.1.2 CÂNCER DE MAMA

Os tumores mamários são geneticamente heterogêneos, com variações na sua taxa de crescimento, nas vias metabólicas e composição celular (PEROU et. al. 2000). Os danos são gerados por diversas falhas na manutenção do DNA em diferentes momentos, que permitem que essas células acumulem erros e possam crescer, dividir e proliferar indefinidamente (EROLES et. al., 2012).

Muitos são os fatores de risco para desenvolvimento do câncer de mama. Dentre eles, pode-se destacar como um dos principais o sexo, uma vez que mulheres são muito mais acometidas que homens. Outros relevantes são a idade, obesidade, menarca ou menopausa precoces, nunca ter engravidado, gestação tardia, ingestão de álcool e componentes genéticos (ROJAS; STUCKEY, 2016; YANG et. al., 2010; BRITT, CUZICK, PHILLIPS, 2020).

Alterações no DNA como mutações, mudanças cromossômicas e epigenéticas, como metilação do promotor de um gene supressor de tumor ou ativação de um oncogene são gatilhos genéticos importantes no desenvolvimento tumoral (PROVENZANO, ULANER, CHIN, 2018).

Diversos genes e vias metabólicas podem estar envolvidas na formação do tumor. Cerca de 5 a 10% dos casos correspondem a mutações hereditárias, sendo as mais comuns nos genes *BRCA1/2*, *PTEN*, *TP53*, *STK11*, *CHEK2* entre outros (APOSTOLOU & FOSTIRA, 2013; BRITT, CUZICK, PHILLIPS, 2020). Estima-se que 65% e 45% das mulheres com mutações para *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente, vão desenvolver câncer até os 70 anos. Essa probabilidade aumenta para cerca de 85% caso haja histórico familiar associado (SKOL; SASAKI; OKEL, 2016).

No momento inicial, o diagnóstico é baseado em três pilares fundamentais na prática clínica sendo eles: o *status* linfonodal, o grau histológico e o tamanho do tumor. A classificação modificada de Nottingham (Elston-Ellis), também conhecida como Sistema de Classificação de Nottingham (NGS, *Nottingham Grading System*) é a mais recomendada pela organização mundial da saúde e por outras entidades relevantes, como a *American Joint Committee on Cancer*, *European Union* e a *Royal College of Pathologists*, classificando os tumores em graus histológicos de I a III, sendo I o mais brando e III o mais grave (RAKHA et. al., 2010).

A classificação histológica foi por muito tempo classificação diagnóstica e até hoje continua sendo a mais utilizada na prática clínica, considerando mais de 20 subtipos existentes de carcinomas invasivos. O mais comum, representando cerca de 70% dos casos é o Carcinoma Ductal Invasivo (CDI), seguido pelo Carcinoma Lobular Invasivo (CLI) e outros menos comuns, como papilomas, micropapilomas, tubulares, apócrinos e outros. É considerado nessa classificação o tipo celular envolvido, secreções extracelulares, arquitetura e forma do tumor e perfil imunoistoquímico (TSANG; TSE, 2020).

Outra classificação para tumores malignos utilizada é a classificação TNM que considera fatores clínicos e patológicos como tamanho do tumor (T), comprometimento do linfonodo regional (N) e metástase para locais distantes (M) (O'SULLIVAN et. al, 2017). Essa determinação é realizada no momento do diagnóstico através de exames físico e de imagem, com o grau patológico

determinado após a cirurgia. Essa prática tem como objetivo a otimização e estabelecimento da melhor conduta e plano terapêutico para cada paciente, e é atualizada periodicamente pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC, *Union for International Cancer Control*) (SAWAKI, SHIEN, IWATA, 2018). Além disso, faz-se uso de marcadores de proliferação, dentre eles o mais conhecido é o Ki-67. Esse marcador é muito utilizado para o prever o prognóstico, em combinação com outras moléculas, e resultado da terapia adjuvante utilizada em tratamentos de câncer de mama (DAI; XIANG, BAI, 2016).

A partir de outros estudos, foi incorporado durante a prática na rotina também a utilização de marcadores e padrões imunoistoquímicos para aprimorar essa classificação, sendo eles os receptores hormonais de estrogênio (ER, *Estrogen Receptor*) e progesterona (PR, *Progesterone Receptor*) e o receptor para o fator de crescimento humano epidermal 2 (HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) (TSANG; TSE, 2020; PROVENZANO, ULANER, CHIN, 2018). Essa classificação conseguiu fornecer uma ideia de prognóstico e sobrevida mais precisa do que o modelo anatômico somente (SAWAKI, SHIEN, IWATA, 2018; GIULIANO, EDGE, HORTOBAGYI, 2018).

Baseado em seu perfil de expressão gênica, em um estudo de Perou e colaboradores (2000), inicialmente os tumores foram agrupados em cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, Normal *like*, HER2 positivo e Basal, (PEROU et. al. 2000; SORLIE et. al. 2001). Posteriormente, o subtipo Claudina baixo foi incluído (PRAT et. al., 2010).

O subtipo Luminal A possui receptor de hormônio positivo (ER e PR +), sem amplificação de HER2 e baixos níveis dos marcadores de proliferação (Ki-67 <14%) (SUBIK et. al., 2010; PEROU et. al., 2000; GOLDBIRSCH et. al., 2013; PROVENZANO, ULANER, CHIN, 2018) (Quadro 1). Correspondem a cerca de 50 a 60% dos casos de câncer de mama (EROLES et. al., 2012) e estão relacionados geralmente a um melhor prognóstico com menores chances de reincidência (KENNECKE et. al., 2010; GOLDBIRSCH et. al., 2013). Quando uma eventual reincidência ocorre, o sítio mais comum é o osso, mas pode ocorrer também no sistema nervoso, fígado ou pulmão (EROLES et. al., 2012). Luminal A é o subtipo molecular com a maior sobrevida ao longo dos anos, com boa resposta à terapia hormonal.

Tumores com o perfil molecular luminal B correspondem a cerca de 20 a 25% dos casos e comparado com o subtipo Luminal A, sendo mais agressivos (EROLES et. al., 2012). Possuem receptor ER positivo, HER2 negativo e pelo menos uma das situações: Ki-67 > 14% (alto), PR negativo ou positivo (baixo) (Quadro 1), e risco de reincidência maior que o subtipo Luminal A, especialmente em sítios como ossos e fígado (GOLDHIRSCH et. al., 2013; KENNECKE et. al., 2010). Apesar de boa resposta a terapias hormonais, este subtipo tumoral tem maiores chances de serem candidatos à quimioterapia em comparação com o subtipo luminal A (SORLIE et. al., 2003; PROVENZANO, ULANER, CHIN, 2018).

O subtipo HER2 é caracterizado por possuir os receptores ER e PR negativo e HER2 superexpresso (SUBIK et. al., 2010; GOLDHIRSCH et. al., 2013) (Quadro 1), altos níveis de expressão de genes relacionados a processos proliferativos, alto grau histológico e grande instabilidade genética (EROLES et. al., 2012). Possui um prognóstico ruim, com altas chances de reincidência (PARKER et. al., 2009) e também de metástase, especialmente no pulmão, cérebro, ossos e fígado (KENNECKE, 2010). Porém, com a implementação da terapia com anticorpo anti HER2 o prognóstico neste subtipo tem melhorado nos últimos anos (YU et. al., 2017; MASUDA et. al., 2020).

O subtipo Basal se caracteriza pela ausência/baixa expressão do ER, PR e HER2 (GOLDHIRSCH et. al., 2013), sendo histologicamente conhecido como Triplo Negativo (TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*) (Quadro 1). Está relacionado com mutações nos genes de susceptibilidade *BRCA1/BRCA2* (*Breast Cancer Gene 1 e 2*) (SORLIE et. al., 2003), alto nível de expressão de Ki-67 (HASHMI et. al., 2019) e um pior prognóstico (ZHANG et. al., 2012). Costumam ter maior incidência em mulheres mais jovens e de ascendência africana (LIN et. al., 2012; EROLES et. al., 2012) e compõem uma menor parcela dos casos (10-15%) (YEH et. al., 2017). Dentre as características clínico-patológicas, pode-se destacar um tamanho maior do tumor, (ZHANG et. al., 2012; YEH et. al., 2017) e alto comprometimento linfonodal (EROLES et. al., 2012; PROVENZANO, ULANER, CHIN, 2018). Uma vez que há ausência de receptores nas células, as terapias hormonais e medicamentos alvo de HER2 não contribuem neste caso, portanto a quimioterapia é a abordagem sistêmica mais utilizada para o tratamento. Avanços recentes tem sido reportado para terapias realizadas com um subgrupo específico de pacientes com tumor PD-

L1+ ou tumores de linhagem germinativa positivo para BRCA. Apesar disso, apenas uma fração desses pacientes respondem à essa terapia, especialmente aos inibidores de PARP, e aqueles que respondem frequentemente acabam desenvolvendo resistência e recaída (WON & SPRUCK, 2020).

Quadro 1: Classificação de subtipos de câncer de mama, suas características clínico-patológicas e abordagens terapêuticas

Subtipo	Status hormonal	KI-67	Grau histológico	Prognóstico	Abordagem terapêutica
Luminal A	ER+ PR+ HER2-	< 14%	I ou II	Favorável	Terapia endócrina
Luminal B	ER+ PR+ ou - HER2 + ou -	Variável (maior parte > 14%)	II ou III	Desfavorável	Se HER2-, terapia endócrina e citotóxica. Se HER2+, citotoxinas, anti-HER2 e terapia endócrina
HER2	ER- PR- HER2+	>14%	II ou III	Desfavorável	Anti-HER2 e citotoxinas
Triplo Negativo	ER- PR- HER2-	>14%	III	Desfavorável	Citotoxinas

Fonte: Adaptado de Goldhirsch et. al (2013) e Dai, Xiang e Bai (2016)

Por ser um tumor tão heterogêneo, diversos genes já foram associados com o favorecimento da progressão do câncer de mama, sendo relacionados inclusive com alguns *hallmarks* do câncer, como *TP53* (instabilidade genômica e mutações), *BCL2* (resistência à morte celular) e outros (DAI, XIANG, BAI, 2016). Fato é que, muitas dessas vias estabelecidas nos *hallmarks* do câncer têm sido estudadas, buscando novas opções de alvos tanto prognósticos como terapêuticos.

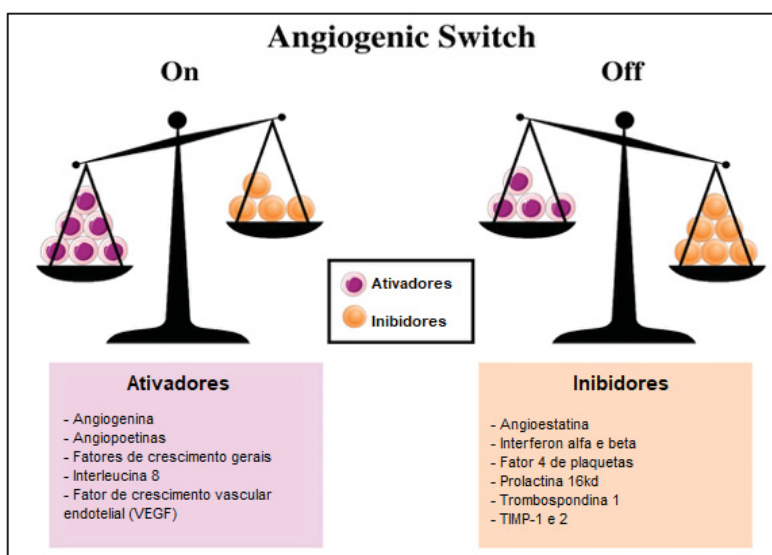
2.2 ANGIOGÊNESE

Um dos fatores cruciais para a sobrevivência de uma célula é o aporte de oxigênio e nutrientes providos pela vasculatura, obrigando tanto as células normais como as tumorais a estarem no máximo à 100 µm de um capilar (MELINCOVICI et. al., 2018). Angiogênese é o termo dado para a criação de novos vasos sanguíneos, podendo acontecer em diferentes circunstâncias. Vasculogênese é o processo que ocorre durante a organogênese, promovido pelas células endoteliais progenitoras (EPC, *Endothelial progenitor cells*), com a fina regulação entre epitélio e parênquima, pela diferenciação dessas células endoteliais a partir de hemangioblastos e criação dos primeiros vasos iniciais (MELINCOVICI et. al., 2018). Denomina-se neoangiogênese o evento em que novos ramos de vasos brotam a partir dos antigos pré-existentes,

formando células endoteliais originadas de precursores do mesoderma, ocorrendo em situações fisiológicas normais após o nascimento como reparo de feridas, ciclo menstrual e gestação, enquanto a vasculogênese é restrita ao período embrionário (HANAHAAN & WEINBERG, 2000; ZHOU, YAO, HU, 2017; MELINCOVICI et. al., 2018).

Os primeiros estudos com angiogênese foram feitos por Folkman (1971) que propôs três princípios relacionados: 1) a angiogênese é um fator necessário para a progressão tumoral; 2) os tumores secretam fatores pró-angiogênese (TAF, *Tumor angiogenesis factor*) e 3) terapias anti-angiogênese seriam uma estratégia promissora para retardar a evolução dos tumores. Anos depois, foi criado o conceito de “interruptor angionênico” (*Angiogenic switch*), em que as células, através de passos discretos, passam do estado quiescente para o estado de conseguir sintetizar novos vasos adjacentes por um desequilíbrio entre os fatores pró e anti angiogênese (Figura 2) (FOLKMAN, 1971; HANAHAAN & WEINBERG, 2000; ZHOU, YAO, HU, 2017; MADU et. al, 2020).

Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando o desequilíbrio entre ativadores e inibidores de angiogênese.

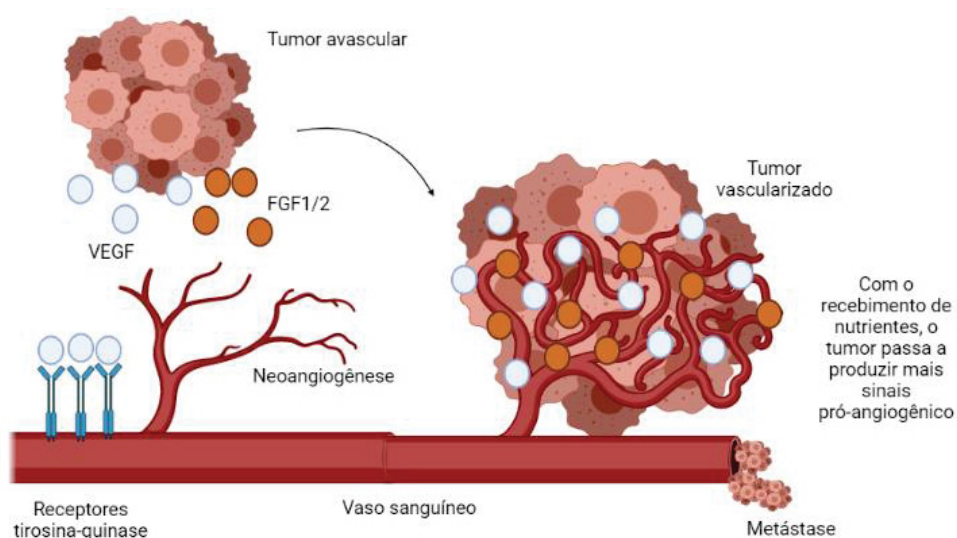


O equilíbrio entre ativadores e inibidores pode ser interrompido a favor ou contra o crescimento de vasos sanguíneos. O aumento de ativadores como angiopoetinas ou fatores de crescimento, bem como a redução de inibidores como TIMP1 e 2 pode levar à formação de novos vasos, assim como o contrário também é verdadeiro. Fonte: adaptado de Madu et. al (2020).

Ocorrendo relativamente cedo, antes da invasão e metástase, os vasos formados no cenário tumoral caracterizam-se por serem desorganizados, dilatados e tortuosos, com seus poros cerca de 100 vezes maiores que um vaso comum. Esses vasos anormais contam também com a contribuição de um microambiente tumoral favorável para seu desenvolvimento, como o acúmulo de resíduos metabólicos, redução de nutrientes, hipóxia e alta permeabilidade que levam à extravasamento de conteúdo intravascular e proteínas plasmáticas causando um aumento na pressão fluída intersticial (MAJ, PAPIERNIK, WIETRZYK, 2016; ZHOU, YAO, HU, 2017; HARRY, ORMISTON, 2021).

Os principais sinais de início deste processo são a expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), Ang-1/Tie-2 (*Angiopoietin 1/Angiopoietin 1 Receptor*), fatores de crescimento derivados de plaquetas, FGF1/2 (*Fibroblast Growth Factor 1 e 2*) e outros, que se ligam à receptores proteicos transmembranas tirosina-quinases das células endoteliais (Figura 3). Com o aumento de indutores e diminuição de repressores, como angioestatina, endoestatina, trombospondina 1 e interferon α e β em comparação com o tecido normal, inicia-se uma cascata de eventos que leva a formação de uma nova fonte de nutrientes para o tumor (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; ZHOU, YAO, HU, 2017).

Figura 3: Processo de estímulo da angiogênese pelo tumor primário avascular



Durante o processo de angiogênese, o tumor começa a secretar sinais pró angiogênese que se ligam a receptores Tirosina-quinase, estimulando a criação de novos vasos. Dessa forma, o

tumor ganha uma nova fonte de oxigênio e nutrientes, e com esse novo suprimento, mais sinais pró-angiogênese são liberados nesse evento em cascata, permitindo assim que o tumor se transporte pela circulação para outras partes do corpo. VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; FGF1/2: *Fibroblast Growth Factor* 1 e 2. Fonte: A autora (2021)

A cascata de sinalização liberada neste processo é altamente complexa, envolvendo diversos tipos celulares, especialmente as células endoteliais. Com a liberação de fatores pró-angiogênicos como FGF e VEGF, inicia-se a remodelação destas células e recrutamento de outros participantes, como macrófagos associados ao tumor, metaloproteinases, e demais fatores de transcrição. Com todos os elementos, a sinalização dá início à formação e maturação de um tubo arteriovenoso (MUKHERJEE et. al., 2020).

Dentre as vias conhecidas, a via VEGF é a mais estudada, por ser uma das proteínas mais comuns e potentes pró-angiogênica em tumores. Esse fator é secretado pelas células tumorais e se liga ao seu receptor, VEGFR (*VEGF Receptor*) nas células endoteliais. Em meio aos diversos tipos de VEGF, o VEGF-A, descrito com detalhes por Senger (2010), é o que possui um papel principal na vasculogênese e neoangiogênese. Durante o desenvolvimento, VEGF-A induz a migração de hemangioblastos e sua diferenciação em células endoteliais. Pós nascimento, os processos ativados por essa via se limitam ao aumento da proliferação e migração das células endoteliais, indução da tubulogênese, aumento da permeabilidade celular e inibição da apoptose (MELINCOVICI et. al., 2018). Outro mecanismo de ação deste receptor é a promoção de fenestrações entre os capilares e vênulas, alterando a expressão das proteínas Ocludina e Caderina das junções extracelulares com a ajuda de proteínas metaloproteinases MMP2, MMP3 e MMP9 que degradam a matriz extracelular. Este evento leva ao aumento da permeabilidade e facilita a migração das células, promovendo a metástase (ZHOU, YAO, HU, 2017; MELINCOVICI et. al., 2018).

Passando além das vias VEGF, a cascata de sinalização Ang/Tie-2 também desempenha um papel importante na angiogênese. Embora a ação e potencial desta via não esteja tão claro quanto a via VEGF, acredita-se que ela atue como pró ou anti-angiogênese dependendo do contexto (CASCONI & HEYMATCH, 2012). As proteínas Ang-1 e Ang-2 atuam de modo antagonista,

mantendo o fenótipo normal da vasculatura. A ativação de Ang-1/Tie-2 contribui para a proliferação endotelial, migração e formação de novos vasos, na ausência de sinais pró-angiogênicos. Ang-2 atua reprimindo esse cenário e promovendo a apoptose. Essa via apresenta diversos desafios em face a ser utilizada como terapia anti-angiogênese, como a eficiência dos inibidores de tirosina-quinase depende do balanço entre Ang-1 e Ang-2, dada a presença de um agonista e um antagonista natural e a ação dupla dessas moléculas de agirem como pro ou anti-angiogênica (CASCON & HEYMATCH, 2012; ZHOU, YAO, HU, 2017).

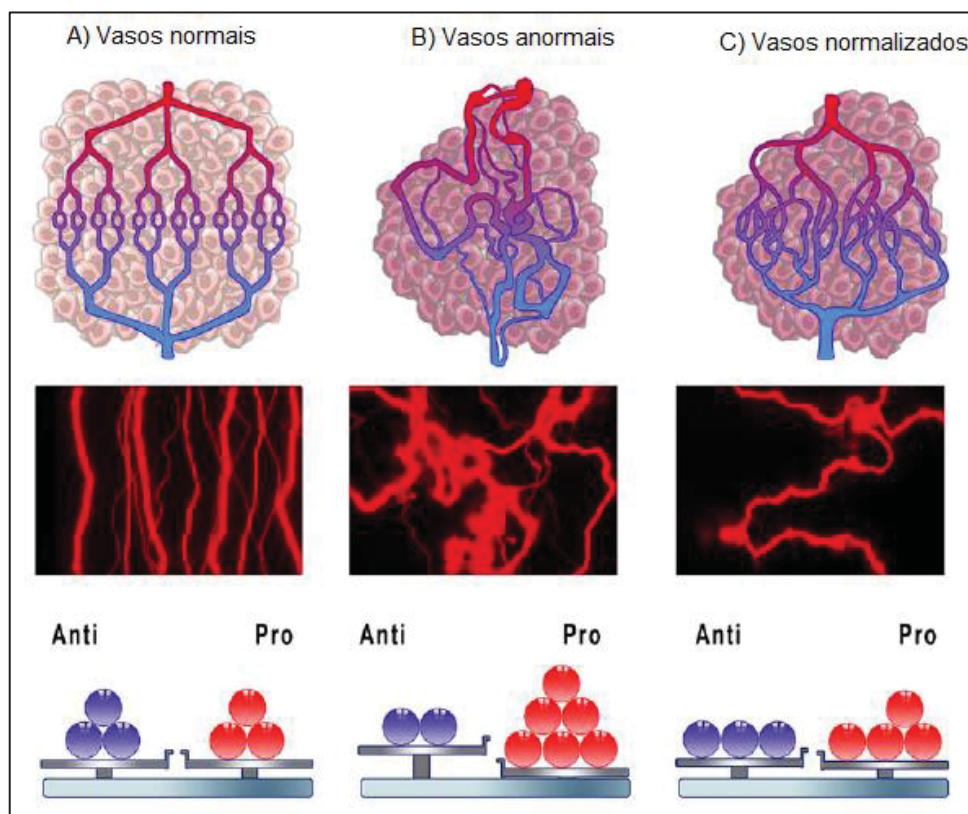
Os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF, *Platelet-derived growth factors*) são produzidos por diversas células, inclusive fibroblastos e o aumento de sua expressão é um evento observado em diversos tumores malignos, como glioblastoma, sarcomas e tumores gastrointestinais. Pacientes de vários tipos tumorais apresentam altos níveis de PDGF, sugerindo que essa molécula pode atuar como um biomarcador (ZHOU, YAO, HU, 2017).

O conceito de terapia anti-angiogênese veio a partir dos primeiros estudos de Folkman, em que em um de seus princípios estabeleceu que esta poderia ser uma aplicação futura (FOLKMAN, 1971). Diversos tipos de tratamento associados com as terapias convencionais tendo como alvo a angiogênese já foram discutidos e elaborados tendo como alvo especialmente VEGF e os receptores tirosina-quinase, como imunoterapia com anticorpos monoclonais (Bevacizumab, IMC-1121B, 2C3), inibidores do receptor tirosina-quinase, inibidores de proliferação, inibidores da via Notch e da via das Angiopoetinas (MAJ, PAPIERNIK, WIETRZYK, 2016; HARRY, ORMISTON, 2021).

Entretanto, essa prática enfrenta diversos problemas como desenvolvimento de resistência aos medicamentos, bem como o obstáculo de fatores como hipóxia e citocinas contribuírem para que o tratamento não seja totalmente bem-sucedido, apesar de resultar em uma breve normalização dos vasos sanguíneos (hipótese da normalização da vascularização tumoral) (Figura 4) (FENG, OFSTAD, HAWKINGS, 2010; ZHOU, YAO, HU, 2017; MUKHERJEE et. al., 2020). Em relação à toxicidade, assumia-se que como a angiogênese não é um processo rotineiro em adultos, haveria poucos efeitos colaterais. Entretanto, a experiência clínica provou que os efeitos adversos seriam um novo problema a ser enfrentado: alguns efeitos colaterais incluíram hipertensão, proteinúria, perfuração gastrointestinal, dificuldades de coagulação, hemorragia,

trombose, leucoencefalopatia posterior reversível e disfunção endócrina (CHEN, CLECK, 2009). Diante disto, atualmente outras formas terapêuticas tem ganhado foco, como uso de nanopartículas inorgânicas (prata, ouro e cobre), biológicas e virais (MUKHERJEE et. al., 2020).

Figura 4: Hipótese da normalização da vascularização do tumor



A) Representação esquemática de um vaso considerado fisiologicamente normal, mantido pelo equilíbrio entre fatores anti e pro angiogênese; B) Representação esquemática de um vaso anormal. Um vaso estimulado pelo processo tumoral é considerado desorganizado e tortuoso, com um estímulo descontrolado de fatores pró-angiogênese; C) Representação esquemática de um vaso pós ação da terapia anti angiogênica. Com a ação de terapia anti-angiogênese, ocorre uma certa normalização do tumor próximo ao estado fisiológico normal. Fonte: MAJ, PAPIERNIK, WIETRZYK, 2016

2.2.1 ANGIOGÊNESE NO CÂNCER DE MAMA

A atividade angiogênica é de suma importância para progressão do câncer de mama, assim como nos outros tipos tumorais. Diversos cenários são plausíveis em relação à angiogênese, e esta é controlada por pelo menos 6 fatores pró-angiogênicos (SHAHI, LOVELLE, MANGA, 2009).

A mobilização de células EPC ocorre pelo estímulo dos fatores pró angiogênicos e estas estão presentes em estudos com câncer de mama em pacientes (KIM et. al., 2003) e modelos animais (SHIRAKAWA et. al., 2002). No estudo realizado por Kim e colaboradores (2003) ao comparar o número de células EPC no sangue de controles e pacientes de câncer de mama e câncer gástrico, não foi observada diferença, apesar do número ser superior em câncer de mama do que em câncer gástrico e os níveis plasmáticos de VEGF estarem aumentados (KIM et. al., 2003). Em outro estudo, ao analisar linhagens de câncer de mama, foi encontrado um nível maior do receptor de VEGF-3 (VEGFR3) em carcinoma invasivo; por outro lado, em tecidos não tumorais e fibroadenomas, esse receptor encontrou-se com baixa expressão, indicando que essa proteína estaria relacionada com a progressão do câncer de mama (VALTOLA et. al., 1999).

HIFs (*Hypoxia-inducible factors*) também podem induzir a angiogênese estimulando fatores pro-angiogênese através das células tumorais e estromais, como adipócitos e fibroblastos. O fator de transcrição de indução à hipóxia 1 (HIF-1, *Hypoxia-inducible factor 1*) foi caracterizado como fator principal neste evento. Contextos comuns no câncer de mama como alterações genéticas de perda de função de supressores de tumor *PTEN*, *p53* e *BRCA1* ou a ativação de *PI3K/Akt/mTOR* ou a via MAPK aumentam a transcrição de HIF α , bem como os receptores HER2 e receptor de estrogênio através de elementos de resposta no promotor de *HIF1A* (HEER, JALVING, HARRIS, 2020).

A expressão elevada de outros marcadores, como PDFG pode ser aplicada como biomarcador para o câncer de mama (PINTO et. al., 2014). Uma forte correlação foi observada entre a expressão do receptor PDFG- β e grau histológico, tamanho do tumor, ausência de receptores de estrogênio e progesterona e baixa expressão de HER2, bem como uma sobrevida mais curta, sugerindo um mau prognóstico neste contexto (PAULSSON et. al., 2009; PINTO et. al., 2014).

Dentre as terapias anti-angiogênicas conhecidas, o uso do anticorpo monoclonal Bevacizumab é uma das mais utilizadas. Trata-se de um inibidor de todas as isoformas de VEGFA desenvolvido em 2004 para terapia de câncer colorretal. Em câncer de mama, em um estudo com pacientes pós metástase mostrou-se com efeitos colaterais, como hipertensão e proteinúria. Também foi

sugerido que o momento ideal para aplicação dessa terapia seria na fase inicial do tumor, antes que as vias de angiogênese estejam estimuladas (MILLER et. al., 2005; VASUDEV & REYNOLDS, 2014).

Estudos continuam sendo realizados para aplicação dessas terapias, e quando combinado com outros medicamentos, apresentam resultados que podem colocar o potencial dessa terapia em cheque. Em um estudo clínico de fase 3, foi comparada a aplicação de Bevacizumab + Paclitaxel (uma medicação de linha de frente para câncer de mama, ovário e outros) com o uso de Paclitaxel apenas. O uso da terapia combinada melhorou a sobrevida livre da progressão da doença, porém não houve diferença na sobrevida geral (MILLER et. al, 2007). O mesmo ocorreu com outros estudos clínicos, como o RIBBON-2 (quimioterapia + Bevacizumab) (BRUFSKY et. al, 2011) e o BEATRICE (Antraciclina e/ou quimioterapia + Bevacizumab) (BELL et. al, 2017).

Contudo, é importante considerar no contexto do câncer que não apenas fatores pró-angiogênicos são os protagonistas do estímulo à angiogênese, mas também a infiltração de um alto número de macrófagos e a participação de diversos fatores de transcrição promovendo a expressão de genes importantes neste processo (FONG, 2008; KROSHINANI, AFSHAR, NAJAFI, 2016).

2.3 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Fatores de transcrição são proteínas altamente conservadas que guiam diversos processos celulares, como diferenciação de tecidos, vias metabólicas, respostas imunes, dentre outros. São responsáveis por uma das primeiras respostas do DNA, regulando a expressão gênica através da interação com regiões promotoras e *enhancers*, recrutando cofatores que não possuem capacidade de ligação própria ao DNA, e enzimas, como Polimerase II, aos genes alvos (LAMBERT et. al., 2018; LEE & YOUNG, 2013). São divididos em cerca de 71 famílias diferentes, como as proteínas dedo de zinco C2H2 (>600 membros), *Homeobox* (>200 membros) e HLH (>80 membros) (LAMBERT et. al., 2018a).

O conjunto de fatores de transcrição expresso em cada uma das células difere, uma vez que sua diferenciação depende de genes que são expressos em determinado momento e determinado local, gerando um fenótipo e programação

única para cada tipo celular e podendo inclusive reprogramá-la (Figura 5) (LEE & YOUNG, 2013).

Figura 5: Fatores de transcrição e reprogramação celular

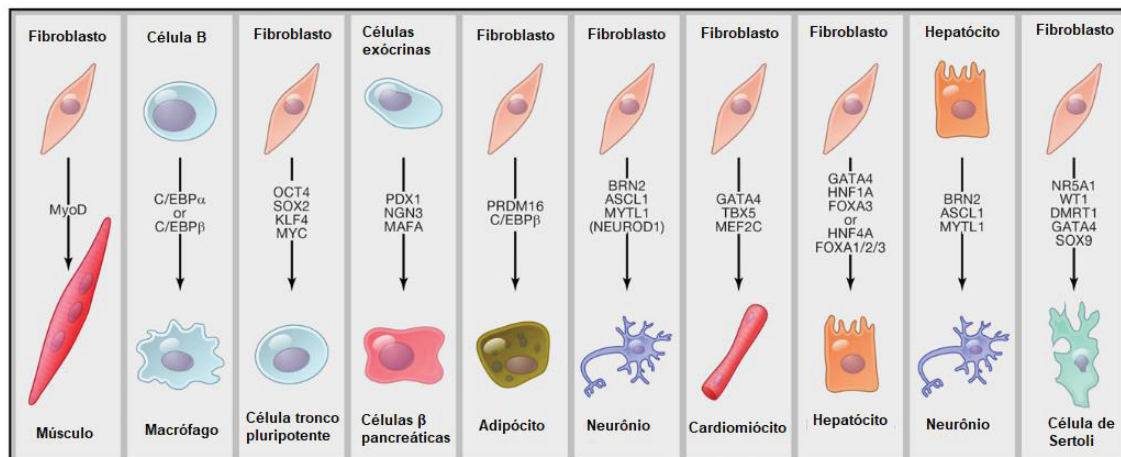


Figura representativa indicando alguns fatores de transcrição associados à reprogramação celular. Fonte: Adaptado de Lee & Young (2013)

A diferenciação celular e o desenvolvimento patológico são processos bastante relacionados. Muitas doenças estão associadas com deficiências nos fatores de transcrição, contribuindo para doenças autoimunes, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. Em especial neste último, pode-se destacar mutações nos fatores de transcrição TAL1, c-Myc, MED12 e uma diversidade de outros oncogenes (LEE & YOUNG, 2013; HUILGOL et. al., 2019).

Ao intercruzar as listas de oncogenes e fatores de transcrição, atualmente pode-se listar cerca de 294 fatores de transcrição oncogênicos, correspondendo a cerca de 19% dos oncogenes conhecidos (Figura 6) (LAMBERT et. al., 2018b).

Figura 6: Fatores de transcrição oncogênicos

ABL1	CEBPA	ERCC3	HIST1H2BE	MDM4	PAX7	SMARCA4	TFP1
AFF1	CHD1	ERCC6	HIST1H2BG	MED12	PAX8	SMARCB1	THRAP3
AFF3	CHD2	ERF	HLF	MEF2B	PBX1	SMARCD1	TLX1
AFF4	CHD4	ERG	HMGA1	MEF2C	PEG3	SMARCE1	TLX3
APC	CHD5	ESPL1	HMGA2	MEN1	PER1	SMURF2	TNEAIP3
AR	CHD7	ESR1	HOXA11	MITF	PHF3	SOX2	TP53
ARID1A	CIC	ETS1	HOXA13	MKL1	PHF6	SOX5	TRIM24
ARID1B	CITFA	ETV1	HOXA7	MLL1	PHOX2B	SOX9	TRIM33
ARID3B	CNOT3	ETV4	HOXA9	MLL1T10	PLAG1	SRCAP	TRIP11
ARID5B	CREB1	ETV5	HOXC11	MLL1T3	PML	SS18L1	TRPS1
ARN1	CREB3L1	ETV6	HOXC13	MLL1T6	PMS1	SSB	TRRAP
ARN1T2	CREBBP	EWSR1	HOXD11	MYB	PNN	SSX1	TSC22D1
ASB15	CRTC1	EYA4	HOXD13	MYBL1	POU2AF1	SSX2	TSHZ3
ASXL1	CSDE1	EZH2	ID3	MYC	POU2F2	SSX4	VHL
ATF1	CYCF	FEV	IRF2	MYCN	POU5F1	STAT3	WHSC1
ATF7IP	CTNNB1	FLI1	IRF4	MYOD1	PPARG	STAT4	WHSC1L1
ATM	DACH1	FOXA1	IRF6	NCOA1	PRDM1	STAT5B	WT1
ATRX	DACH2	FOXE1	IRF8	NCOA2	PRDM16	STAT6	WWP1
BAZ2B	DAXX	FOXJ2	IRX6	NCOA4	PRDM9	SUFU	WWTR1
BCL11A	DDI2	FOXP1	JUN	NCOR1	PRRX1	SUZ12	XBPI
BCL11B	DDIT3	FOXQ1	KHDRBS2	NCOR2	PSIP1	TAF1	XPC
BCL3	DDX5	FUBP1	KHSRP	NEUROG2	RARA	TAF15	ZBTB16
BCL6	DEK	FUS	KLF2	NFE2L2	RB1	TAL1	ZBTB20
BCLAF1	DIP2C	FXR1	KLF4	NFE2L3	RBM15	TAL2	ZFP36L1
BCOR	DNMT1	GATA1	KLF5	NFIB	RBMX	TBX18	ZFX
BRCA1	DNMT3A	GATA2	KLF6	NFKB2	REL	TBX22	ZHX2
BRCA2	DOT1L	GATA3	LDB1	NFKBIA	RUNX1	TBX3	ZIC3
BRD7	EED	GLI3	LMO1	NONO	RUNX1T1	TCEA1	ZIM2
BRD8	EGR2	GTF2I	LMO2	NOTCH2	RXRA	TCEB1	ZNF208
BRIP1	ELAVL2	HDAC9	LMX1A	NOTCH3	SALL3	TCEG1	ZNF226
BRPF3	ELF3	HEY1	LYL1	NPM1	SATB2	TCF12	ZNF331
BTG1	ELF4	HIST1H1B	LZTR1	NR3C2	SETBP1	TCF3	ZNF384
BTG2	ELK4	HIST1H1C	MAF	NR4A3	SFPQ	TCF7L2	ZNF469
CBFA2T3	ELL	HIST1H1D	MAFA	NSD1	SIN3A	TFAP2D	ZNF595
CBFB	EP300	HIST1H1E	MAFB	OLIG2	SMAD2	TFDP1	ZNF638
CDX2	EPC1	HIST1H2BC	MAML1	PAX3	SMAD4	TFE3	
CDX4	ERCC2	HIST1H2BD	MAX	PAX5	SMARCA1	TFEB	

Fonte: Lambert et. al., 2018b

Uma classe especial de fatores de transcrição são os fatores de transcrição pioneiros. Estes possuem a capacidade de se ligar na cromatina condensada independente de outros fatores, e modificar a acessibilidade ao DNA, bem como modificar o destino da reprogramação celular. Diversos fatores de transcrição possuem essa propriedade e estão associados com a patogênese do câncer, como FOXA, TLE, GATA (JOZWIK & CARROLI, 2012) e PBX1 (GREBBIN & SCHULTE, 2017).

2.3.1 PBX1

O gene *PBX1* (*PBX Homeobox 1*) (ID: 5087; Ensembl: ENSG00000185630), é um gene que codifica o fator de transcrição *Pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1* (PBX1) e está localizado no cromossomo 1q23.3. Possui 12 éxons, gerando um transcrito (isoforma 1) com

1293 nucleotídeos traduzido em uma proteína com 430 aminoácidos. Possui um domínio de ligação ao DNA que reconhece a sequência 5' - ATCAATCAA - 3'.

PBX1 foi primeiramente caracterizada na translocação t(1,19) em leucemia linfoblástica aguda, resultando no complexo E2A-PBX1 e atuando como um proto-oncogene (KAMPS et. al., 1990; NOURSE et. al, 1990; DEDERA et. al., 1993). Este fator de transcrição pertence à família altamente conservada Pbx1-4 e está diretamente associado à programação do desenvolvimento durante a organogênese (MONICA et. al, 1991; SELLERI et. al., 2001; VEIGA, DE CARVALHO, GRADIA, 2021).

As contribuições da família de proteínas PBX e em particular o gene *pbx1* no desenvolvimento, foram observadas quando camundongos mutantes morreram no 15º e 16º dia com severa aplasia e hipoplasia de múltiplos órgãos e defeitos na constituição e malformações do esqueleto (SELLERI et. al., 2001). Seu papel na regulação de diversos genes durante a organogênese se estende ao desenvolvimento de vários órgãos, incluindo esqueleto, pâncreas, pulmão, coração, baço e fígado (WELSH et. al., 2018; STANKUNAS et. al., 2008).

Foi descoberto pela primeira vez em *Drosophila* que as proteínas Pbx são cofatores do gene *hox* e fazem parte da classe de homeodomínio TALE (*Three Aminoacid Loop Extension*), porção que é a responsável pela ligação entre Pbx e Hox através do motivo contendo triptofano na região N-terminal. As consequências *in vivo* dessa ligação são controversas, em que o complexo Hox-Pbx podem atuar como ativadores ou repressores transcricionais, sugerindo que o efeito é determinado não pela presença ou ausência dos cofatores, mas sim pelo recrutamento de outros fatores ao complexo (MOENS; SELLERI, 2006; DELVAL et. al., 2011).

Evidências indicam que PBX1 pode ser um fator pioneiro, sendo primeiramente apontado nesta posição através do estudo de Berkes e colaboradores (2004). Neste estudo, foi demonstrado que a ligação da proteína MyoD no promotor da Miogenina era auxiliado pela interação com um outro fator da família Pbx, sugerindo que PBX1 estaria ligado ao promotor de uma maneira constitutiva (BERKS et. al., 2004). Esse indício também foi confirmado quando PBX1 foi relacionado na via de sinalização ER α no câncer de mama, identificando PBX1 como um fator pioneiro parceiro de FOXA1. Embora PBX1 e FOXA1 tenham efeitos independentes, a presença de ambos possui um fator

sinérgico na abertura da cromatina de sítios selecionados compartilhados (MAGNANI & LUPIEN, 2014; GREBBIN & SCHULTE, 2017).

O fator PBX1 já foi associado com diversas doenças (VILLAESCUSA et. al., 2016; KIM et. al., 2002; HEIDET et. al., 2017; ALANKARAGE et. al., 2020; REIS et. al., 2019), incluindo o câncer. Os primeiros indícios no câncer surgiram em leucemia aguda linfoblástica (KAMPS et. al., 1990; NOURSE et. al., 1990; DEDERA et. al., 1993), evidência que continua sendo corroborada com novos alvos, como *RUNX1* (PI et. al., 2020), bem como outros tipos de câncer atuando como um proto-oncogene, como melanoma (SHIRAISHI et. al., 2007; MORGAN et. al., 2007), câncer gástrico (HE et. al., 2017), ovário (JUNG et. al., 2016), carcinoma de células claras de rim (WEI, LU, LIU, 2018), linfoma (KUBOTA-TANAKA et. al., 2019) e mama (MORGAN et. al., 2012; MAGNANI et. al., 2015). Entretanto, a expressão de *PBX1* está associada também com um prognóstico favorável, como no caso de neuroblastoma (SHAH et. al., 2014) e câncer de pulmão (LI et. al., 2014).

Diversos *hallmarks* do câncer foram associados com PBX1 (VEIGA, DE OLIVEIRA, GRADIA, 2021), como transição epitélio mesenquimal, proliferação, crescimento e metástase (HE et. al., 2017). Em um estudo por Charboneau e colaboradores (2005) foi visto a relação de PBX1 na angiogênese; a perda de *PBX1* reduziu significativamente a migração de células endoteliais e migração estimulada por bFGF em uma interação com HOX. Em linhagens celulares humanas de melanoma, Shiraishi e colaboradores (2007) também encontraram evidências de PBX1 associado com a invasão e angiogênese, uma vez que em seu trabalho o nocaute deste fator de transcrição diminuiu a expressão de HOXB7 e fatores pró-angiogênicos, como BFGF, ANG-2 e MMP9 (SHIRAISHI et. al., 2007). Até o momento, ainda não foram realizados estudos com PBX1 e angiogênese no câncer de mama.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando o fator epidemiológico do câncer de mama no Brasil e no mundo, é de extrema importância que pesquisas acerca deste tipo de câncer sejam realizadas, buscando melhorar as opções de diagnóstico, prognóstico e qualidade de vida de pessoas afetadas por esta patologia.

Fatores de transcrição são moléculas chave na regulação de inúmeros processos celulares, inclusive naqueles relacionados à promoção ou controle do fenótipo tumoral e a promoção da angiogênese é uma das características importantes para a progressão do câncer e metástase.

As análises contidas neste trabalho buscam relacionar o envolvimento do fator de transcrição PBX1 no contexto da angiogênese em câncer de mama, visto que os trabalhos nesta área são escassos. Desta forma, este trabalho possui uma contribuição na melhor compreensão do papel desta molécula neste contexto, buscando entender melhor os mecanismos de ação deste gene em uma via tão importante e ainda tão pouco caracterizada.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do silenciamento do fator de transcrição *PBX1*, na expressão de genes associados à angiogênese em linhagens celulares de câncer de mama.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o padrão de expressão de *PBX1* em subtipos moleculares de câncer de mama, de expressão de receptores hormonais e origem histológica em bancos de dados públicos de expressão.
- Identificar em bancos de dados públicos, genes pertencentes à via de angiogênese com expressão correlacionada ao *PBX1*.
- Avaliar o impacto funcional do silenciamento do gene *PBX1* na linhagem tumoral MCF7.
- Medir os níveis de expressão de genes relacionados à angiogênese pós silenciamento de *PBX1*.
- Avaliar *in silico* a expressão de *PBX1* em 32 outros tipos de câncer sólido, e respectivo impacto na sobrevida dos pacientes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

5.1.1 Análise de expressão de *PBX1*

A análise de expressão de *PBX1* em câncer de mama especificamente foi realizada com amostras de pacientes do TCGA, utilizando a base de dados *Breast Cancer Gene-Expression Miner v4.8* (bc-GenExMiner v4.8, <http://bcgenex.ico.unicancer.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php?js=1>). Nesta base de dados foram feitas análises de comparação da expressão de *PBX1* entre subtipos de acordo com a classificação PAM50, realizada com base em diferentes conjuntos de genes, status de receptores de estrogênio, progesterona, combinação destes dois receptores hormonais, receptor de HER2 e tipos histológicos de câncer de mama. Sendo assim, a expressão e comparação entre subtipos de câncer de mama considerando a classificação molecular de PAM50: Basal-like (N=136), HER2 (N = 51), Luminal A (N = 268) e Luminal B (281). A comparação estatística entre os grupos nesta análise específica foi feita pelo teste de Dunnett-Tukey-Kramer e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A comparação de cada subtipo com o tecido não tumoral também foi realizada utilizando a base de dados Gepia2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) e somente dados do TCGA. Para esta análise foram analisados os subtipos Basal (N=135) x não tumoral (N=112), HER2 (N=66) x não tumoral, Luminal A (N=415) x não tumoral e Luminal B (N = 194) x não tumoral. Neste caso foi considerado um Log₂FC de 0.58 e valor de corte de $p < 0.05$ considerado como significativo.

A fim de estabelecer o perfil de *PBX1* em *pan* câncer, foram realizadas análises buscando por diferenças de expressão deste gene em 32 tipos de cânceres diferentes, utilizando amostras do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e a base de dados TIMER (*Tumor Immune Estimation Resource*, <https://cistrome.shinyapps.io/timer/>). Dentre eles, foram selecionados para estudo apenas aqueles com diferença significativa na expressão, comparando tecido tumoral com não tumoral e considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5.1.2 Análises de sobrevida

Foram realizadas análises de sobrevida geral e sobrevida livre da doença em todos os 16 tipos de câncer em que *PBX1* foi diferencialmente expresso (BLCA, BRCA, CHOL, COAD, HNSC, KIRC, KICH, KIRP, LIHC, LUSC, LUAD, PRAD, READ, STAD, THCA e UCEC). A base de dados utilizada foi o Gepia2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#survival>), sendo o tempo dado em meses, o método de análise as curvas de Kaplan-Meier e mapa de sobrevida. O valor de $p < 0.05$ foi considerado como significativo.

5.1.3 Seleção de genes relacionados à angiogênese

Para seleção de genes para análises de correlação foi realizada a consulta na literatura para genes mais mencionados nas vias e utilizada a plataforma online *Gene Set Enrichment Analysis* (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>), a fim de obter uma lista de genes relacionados ao processo de angiogênese. Foram obtidos os *datasets* da coleção *The Molecular Signature Datasets*, filtrando por *hallmarks* do câncer e por fim o *hallmark* da angiogênese. Os dados clínicos das pacientes e de expressão foram obtidos da base de dados TCGA e a partir desta tabela inicial, foram filtrados os genes de maior relevância e por subtipos Luminal A e Basal.

5.1.4 Análises de correlação

Foi utilizada a análise de correlação de Pearson, em linguagem de programação R, no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (RStudio Team, 2015). Foi comparada expressão de 38 genes obtidos relacionados à angiogênese com o gene *PBX1* em câncer de mama nos grupos luminal A e basal (503 pacientes Luminal A e 174 pacientes do subtipo Basal) e no KIRC (607 pacientes). Foram obtidos valores de correlação, considerando como ponto de corte para boa correlação acima de 0.30 e abaixo de -0.30 e correlação forte 1 e -1. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.2 CULTIVO CELULAR

Como modelo de estudo foram utilizadas linhagens celulares de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231 correspondendo aos subtipos Luminal A e basal respectivamente. As células foram cultivadas em meio RPMI (Gibco, [+] L-glutamina, [-] bicarbonato de sódio) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) e foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A manutenção das células foi realizada a cada dois dias, sendo realizada substituição do meio de cultura suplementado. Ao alcançar confluência em torno de 80%, as células foram coletadas por tripsinização para experimentos posteriores

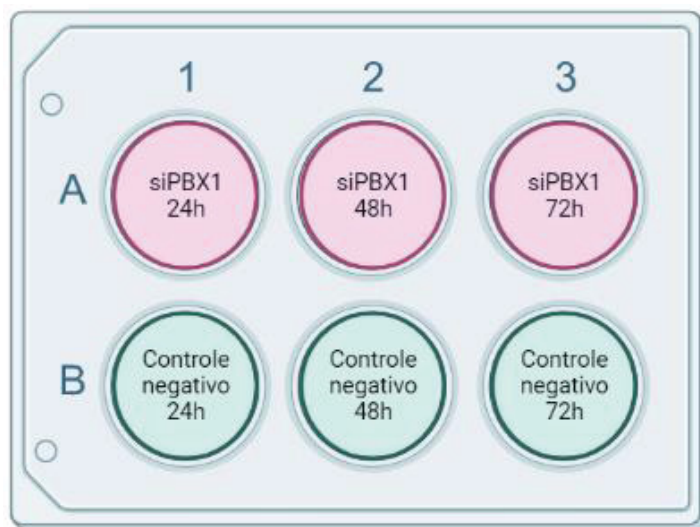
5.3 SILENCIAMENTO DE *PBX1*

O silenciamento do gene *PBX1* foi realizado utilizando transfecção com siPBX1 (SASI_Hs01_0015-4081/PBX1 – Merck) e controle negativo (SiC001-WDAA 1219/PBX1 – Merck), ambos na concentração de 100 uM. As células foram semeadas em placas de 6 poços, com 600.000 células por poço.

O reagente utilizado para a transfecção foi Lipofectamina 3000® (Thermofischer), utilizando o protocolo de transfecção de acordo com instruções do fabricante. Ao total em cada placa foram utilizados seis poços, sendo um para célula + reagente de transfecção + siPBX1 e um para célula + Lipofectamina + controle negativo para cada tempo de coleta, conforme esquema representativo abaixo (Figura 7).

Após 24, 48 e 72 horas da transfecção, as células foram coletadas após tripsinização seguida de centrifugação a 1500 RPM por 6 minutos e utilizadas nos ensaios subsequentes. Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e triplicatas biológicas.

Figura 7: Esquema da placa de 6 poços utilizada para transfecção de siPBX1 e controle negativo e tempos que as células foram coletadas

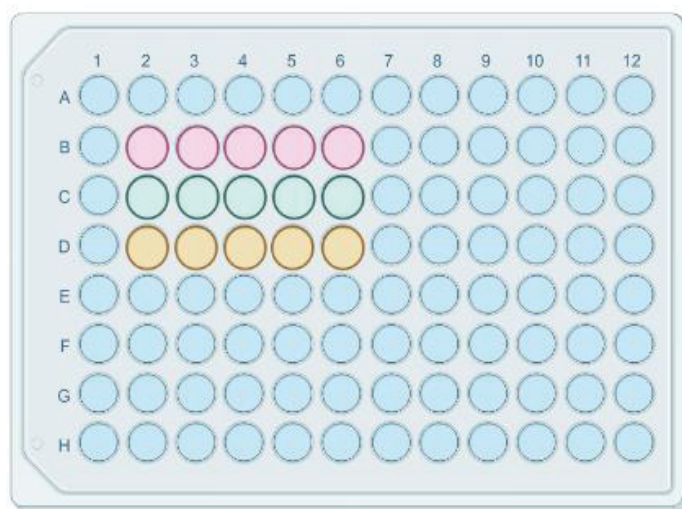


A figura representa a placa utilizada no momento da transfecção. Na fileira A, foram adicionadas em todos os poços as células + reagente de transfecção + siPBX1. Na fileira B da placa, os mesmos reagentes, porém ao invés do siPBX1 foi adicionado o controle negativo, nos mesmos volumes e concentrações. Fonte: A autora (2022)

5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Após 6 horas da transfecção, foram semeadas 3000 células em placa de 96 poços células tratadas com siPBX1 ou controle negativo. A viabilidade celular foi mensurada após 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção (Figura 8). O experimento de viabilidade foi realizado em triplicata biológica e quintuplicata técnica.

Figura 8: Esquema representativo de placa de 96 poços utilizada para plaqueamento e análise dos ensaios de viabilidade e proliferação



Representação esquemática do experimento, em que os poços rosas correspondem aos poços em que foram plaqueadas as células transfectadas com o siPBX1, em verde os poços em que foram plaqueadas as células que foram transfectadas com o controle negativo e em laranja os poços em que foi incubado apenas meio de cultura (branco). Uma placa de 96 poços foi utilizada para cada tempo (24, 48, 72 e 96 horas). Fonte: A autora (2022)

Em cada dia correspondente, o meio de cultura RPMI foi substituído por 1000 µl de uma solução de 90% RPMI e 10% do corante Resazurina e acondicionado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Após esse período foi realizada a leitura em equipamento leitor de ELISA em 570 nm e 600 nm como onda de referência. Os resultados foram posteriormente analisados, comparando os valores de absorbância das amostras teste com amostras controle, normalizados pelos valores observados apenas pelo meio de cultivo (branco). O programa GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para construção dos gráficos com os resultados e o teste t de *student* para análise estatística

5.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

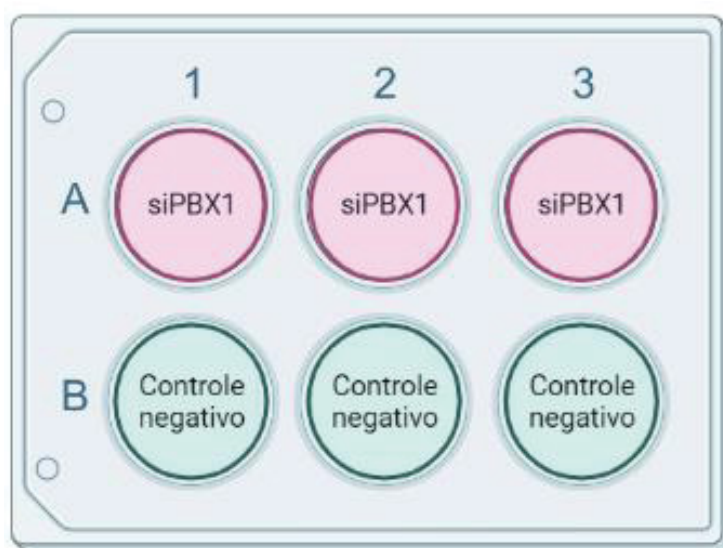
As células transfectadas foram fixadas com 100 µl de metanol por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se com uma lavagem com PBS, adição de 100 µl de corante cristal violeta e posterior incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Passado esse tempo, os poços foram novamente lavados com PBS 2 vezes, foi adicionada uma solução de ácido acético glacial 33%, e posterior incubação em temperatura ambiente por 20 minutos. Ao final, foi realizada a

leitura em leitor de placas de ELISA em um comprimento de onda de 570 nm e os resultados foram analisados com base em uma curva padrão e equação da reta previamente obtidas. O experimento foi feito em quintuplicata técnica e em triplicata biológica.

5.6 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Para o ensaio de capacidade clonogênica, após 6 horas da transfecção foram semeadas 500 células de cada tratamento (siPBX1 e controle negativo) em placa de 6 poços em triplicata (Figura 9). As células foram incubadas com 2 mL de meio RPMI suplementado a 37°C e 5% de CO₂ por 14 dias. A cada 7 dias foi adicionado 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado.

Figura 9: Esquema representativo de placa de 96 poços utilizada para plaqueamento e análise dos ensaios de capacidade clonogênica



Para o experimento de capacidade clonogênica, 500 células foram plaqueadas em cada poço e 2 mL de meio de cultura RPMI suplementados foram adicionados. Em A estão representadas em rosa as células tratadas com o siPBX1 e em B as células tratadas com o controle negativo. Fonte: A autora (2022).

Após 14 dias, o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e adicionou-se 500 µL de metanol em cada poço mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma vez que o metanol foi removido, foi adicionado 1 mL do corante cristal violeta (0,25 mg/mL) a temperatura ambiente por 10 minutos. Ao final deste tempo, procedeu-se com várias lavagens com

PBS e contagem das colônias. Os poços foram fotografados, o número de colônias registrado e os dados adicionados em gráfico no programa GraphPad Prism 8.0. Para recorte e edição das fotografias dos poços e colônias foi utilizado o programa ImageJ e InkScape. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e triplicata biológica.

5.7 EXTRAÇÃO DE RNA

Células transfectadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram coletadas e submetidas ao protocolo de extração com TRIzol®/clorofórmio e precipitação com isopropanol, conforme descrito a seguir: 1 mL de TRIzol® foi adicionado às células que foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio, homogeneizado e mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos; em seguida, as amostras foram centrifugadas em 10.000 RPM por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados 500 µl de isopropanol, incubação em temperatura ambiente por 15 minutos. Pós centrifugação, o sobrenadante foi removido e ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 70%, seguido de uma nova centrifugação a 10.000 RPM por 5 minutos a 4°C. Após secagem, foram adicionados 50 µl de água dietil pirocarbonato (DPEC) e armazenado em freezer -80°C. As amostras foram quantificadas e avaliada sua pureza em espectrofotômetro Nanodrop® (*Thermo Fischer Scientific*), utilizando parâmetros para RNA. Para o padrão 260/280 foi adotado como ótimo o intervalo entre 1,8 e 2,0 e para 260/230 entre 1,8 e 2,2. Foram utilizadas amostras com concentração mínima de 70 ng/µl e dentro dos padrões de pureza. A mensuração das amostras no aparelho foi realizada utilizando água DPEC como controle (branco) ao início e ao final de cada grupo de amostras.

5.8 PREPARO DE cDNA

Com o RNA total extraído e quantificado, procedeu-se para a etapa de preparo de cDNA. Para cada amostra foi calculado um volume diferente a ser utilizado, com o objetivo de obter a concentração de 1000 ng/µl.

Antes da reação de transcrição reversa foi realizado um tratamento com a enzima DNase I (1 U/µl, *Thermo Fischer Scientific*, nº catálogo EN0521), para garantir que o RNA obtido não continha material DNA genômico residual. Esse

tratamento procedeu-se da seguinte forma: 1 µL da amostra foi adicionado em 16 µL de água DPEC, juntamente com 2 µL de tampão 10x e 1 µL de DNase I. O material foi então incubado a 37°C por 30 minutos em termociclador. Posteriormente foi adicionado 1 µL de EDTA 25 mM (inibidor de DNase).

Para a produção do cDNA foi utilizado o kit *Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen)* e randomprimer, de acordo com as instruções do fabricante. Com o propósito de controle para este experimento, foi realizada a reação em todas as amostras sem a presença da transcriptase (RT-).

5.9 PCR QUANTITATIVA

A análise da expressão gênica de *PBX1* e de três genes relacionados à via de angiogênese: *TIMP1*, *ANGPTL4* e *VEGF*, em amostras de MCF7 avaliada através de PCR quantitativa. Como controle, foi analisada a expressão de dois genes *ACTB* (Beta Actina) e *TBP* (Proteína de ligação à TATA box). A relação dos oligonucleotídeos e respectivas sequências está no Quadro 2.

Quadro 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
<i>PBX1</i>	TGCGTTCCCGATTTCTGGAT	AGACTGTGATGCCACACTTC
<i>TIMP1</i>	GGGCTTCACCAAGACCTACA	TGCAGGGGATGGATAAACA
<i>ANGPTL4</i>	TCCGTACCCTTCTCCACTTG	ACGCCTCTGGCCGTACCACT
<i>VEGFA</i>	CCTTGCTGCTCTACCTCCAC	ATGATTCTGCCCTCCTCCTT
<i>ACTB</i>	CCGATCCACACGGAGTACTTG	GGCAGCCAGCACAATGAAG
<i>TBP</i>	TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT	CCTGAATCCCTTTAGAAATAGGGTAGA

A sequência de cada oligonucleotídeo está identificada considerando o sentido 5' para o 3'.

Fonte: A autora (2022)

As reações de PCR foram realizadas com o master mix *SYBR Green (Applied Biosystems)*, utilizando o cDNA das amostras transfectadas e controles. Os experimentos foram realizados no aparelho QuantStudio™ 5 Real-time PCR System (*Thermo Fischer Scientific*®).

Os dados foram analisados com a quantificação relativa a partir da comparação do ciclo em que a fluorescência alcança um limiar pré-estabelecido (CT - *Cycle Threshold*) do gene alvo em relação aos dois controles endógenos

(*ACTB* e *TBP*) e a linhagem transfectada com o controle negativo. Dessa forma, essa análise é obtida pelo método de análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados são mostrados em gráficos através do programa GraphPad Prism 8.0.

5.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Células das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 coletados após 24, 48 e 72 horas posterior à transfecção para extração de proteínas e *Western blotting*. Para extração foi adicionado 100 μ L de tampão de lise Triton 1% (20mM TrisHCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM EDTA, e inibidor de protease). Para quantificação das proteínas totais extraídas em cada amostra, foram adicionados 2 μ L do sobrenadante obtido na etapa anterior em placas pretas *low binding* juntamente com 198 μ L de tampão de ureia (Ureia 8M, Tris-HCl, água MiliQ), totalizando 200 μ L em cada poço. O tampão de ureia expõe as moléculas de triptofano das proteínas para quantificação. A leitura foi realizada em uma absorbância de 595 nm em um leitor de placas de ELISA (BioTek). A quantificação de proteínas totais foi obtida a partir de uma equação da reta previamente realizada, com base nos cálculos a seguir. Tomou-se como base que aproximadamente cada 0,017 mg de triptofano corresponde a 1 μ g de proteína (WISNIEWSKI, GAUGAZ, 2015).

$$\text{Absorbância}(Y) = a * \text{massa de triptofano}(X) + b$$

$$\text{Concentração de triptofano na amostra} = \frac{Y - b}{a}$$

5.11 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR IMMUNOBLOTTING

Para visualização das proteínas e especificamente, *PBX1*, foi realizado o *western blot*, seguindo o protocolo modificado de Harlow & Lane (1988). O preparo dos géis de acrilamida seguem conforme Quadros 3 e 4.

Quadro 3: Componentes e volumes utilizados para preparo do gel de corrida (*Lower gel*) da eletroforese

Componentes da solução	Volumes
------------------------	---------

Água destilada	3.3 ml
Mix de acrilamida 30%	4.0 ml
Tampão (Tris 1,5M, SDS 10%, pH 8.8)	2.6 ml
APS 10%	100 µL
TEMED	8 µL
Volume final aproximado	10mL

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*; APS: *Ammonium persulphate solution*; TEMED: *Tetramethylethylenediamine*. Fonte: A autora (2022)

Quadro 4: Componentes e volumes utilizados para preparo do gel de empilhamento (*Upper gel*) da eletroforese

Componentes da solução	Volumes
Água destilada	2.1 ml
Mix de acrilamida 30%	500 µL
Tampão (Tris 1M, SDS 10%, pH 6.8)	410 µL
APS 10%	30 µL
TEMED	6 µL
Volume final aproximado	3 mL

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*; APS: *Ammonium persulphate solution*; TEMED: *Tetramethylethylenediamine*. Fonte: A autora (2022)

O volume de cada amostra a ser aplicado no gel foi calculado a fim de se obter uma concentração de 60 µg/mL de proteínas totais. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram diluídas em tampão redutor com beta-mercaptoetanol e aquecidas a 95°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose Amersham Protran Premium 0.2 (GE Healthcare Life Science) por um sistema imerso (West-i10 – Locus), embebido em tampão de transferência (solução estoque para 500 mL: 18,2g de Tris, 90 g de Glicina, água milliQ q.s.p; solução uso para 1L: 40 mL da solução estoque, 200 mL de metanol e água destilada q.s.p – armazenado a 4°C) durante 2 horas a 100V. Tendo a transferência sido realizada, as membranas foram coradas com solução de Ponceau S (Sigma-Aldrich) para confirmar que a transferência foi realizada com sucesso.

Em seguida, a membrana foi lavada de 3 a 5 vezes com *Tris Buffered Saline with Tween® 20* (TBST – Solução estoque 10x: Tris-HCl pH 7.5 200mM, NaCl 1,5 M, Tween 20 0,05%, pH 7,5) diluído 1x. O bloqueio da membrana foi realizado após essa lavagem incubando a membrana embebida em uma solução de 5% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) em tampão TBST 1x por 40 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada novamente com solução TBST 5 vezes, por 5 minutos. Ao final desse processo, a membrana foi mantida por 14 a 16 horas com anticorpo de coelho primário anti-humano específico para a proteína PBX1 (Invitrogen, Ref PA5-17223, Lot VI3073381A *PBX1 Polyclonal Antibody*), diluído 1:1000 em TBST-BSA 5% a 4°C, sob constante agitação. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido, a membrana novamente lavada com tampão TBST 1x por 5 minutos sob agitação em temperatura ambiente e incubada com o anticorpo secundário *anti-rabbit* marcado com HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Invitrogen) na diluição 1:3000 por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Ao final desse tempo, foi utilizado o método de quimioluminescência, pelo kit *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* (ThermoFischer), na diluição 1:1 (usou-se 1000 µL total para cada membrana, sendo então 500 µL de cada reagente no tubo da diluição) para visualização das bandas proteínicas na membrana. Essa solução ficou incubando na membrana em temperatura ambiente na ausência de luz por 10 minutos e as imagens capturadas utilizando o fotodocumentador Amersham Imager 680 blot (GE healthcare).

Como controle foi utilizado o anticorpo para a proteína β -actina diluído 1:2000 em TBST-BSA 5% conforme recomendações do fabricante.

5.12 EDIÇÃO DE IMAGENS, GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As fotografias e imagens obtidas não passaram por tratamentos que alterassem seu resultado, apenas edições sutis como recortes e adição de texto. As imagens esquemáticas dessa dissertação foram feitas através da plataforma *on-line* Biorender (<https://biorender.com/>), recortes nas figuras dos resultados de capacidade clonogênica no programa de edição de imagens ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) e as edições e inclusões de texto com o programa InkScape (<https://inkscape.org/pt-br/>).

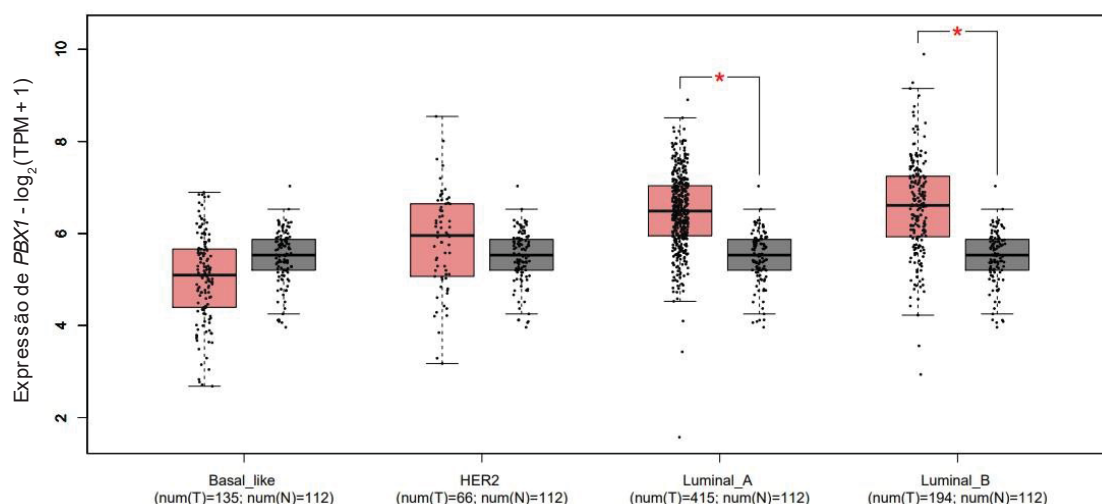
Os gráficos contidos nesse trabalho foram produzidos utilizando o programa GraphPad Prism v.8 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA), bem como as análises estatísticas. O teste estatístico t de Student foi aplicado para determinar diferença entre os grupos e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e replicata técnica previamente descrita em cada seção específica de cada teste.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da expressão de *PBX1* em câncer de mama

Para compreender melhor o padrão de expressão de *PBX1* no câncer de mama, realizou-se uma comparação de sua expressão entre amostras tumorais e tecido não tumoral, utilizando a base de dados Gepia2 e dados do TCGA. Devido à sua heterogeneidade, foram avaliados separadamente os subtipos Basal, HER2, Luminal A e Luminal B. Observa-se que a expressão de *PBX1* é significativamente superior em amostras dos subtipos luminais A e B em relação à expressão no tecido não tumoral ($p < 0,05$). Essa diferença não foi observada nas amostras classificadas como Basal e HER2 (Figura 10).

Figura 10: Análise comparativa da expressão de *PBX1* em amostras de câncer de mama.



Comparação da expressão de *PBX1* entre os subtipos de câncer de mama e amostras não tumorais do banco de dados do TCGA. Os blocos vermelhos representam amostras tumorais enquanto os blocos cinzas representam os tecidos não tumorais. num(T) número de amostras tumorais, num(N) número de amostras não tumorais. * $p < 0,05$. Fonte: A autora (2022).

Para comparar a expressão de *PBX1* entre os subtipos tumorais, classificados pelo PAM50 (PARKER et; al., 2009), utilizou-se a base de dados bc-GenExMiner v4.8, usando as informações das mesmas amostras do TCGA.

Comparando os subtipos em uma análise de todos contra todos (*Basal-like*, HER2, Luminal A, Luminal B), foi possível visualizar que há diferença

significativa de expressão do *PBX1* entre os subtipos (Figura 11). Os subtipos luminal A e B apresentaram maior expressão de *PBX1* em comparação aos demais (Luminal A > Basal, Luminal A > HER2, Luminal B > Basal, Luminal B > HER2, $p < 0,0001$).

Figura 11: Comparação da expressão de *PBX1* entre subtipos de câncer de mama de acordo com a classificação de PAM50

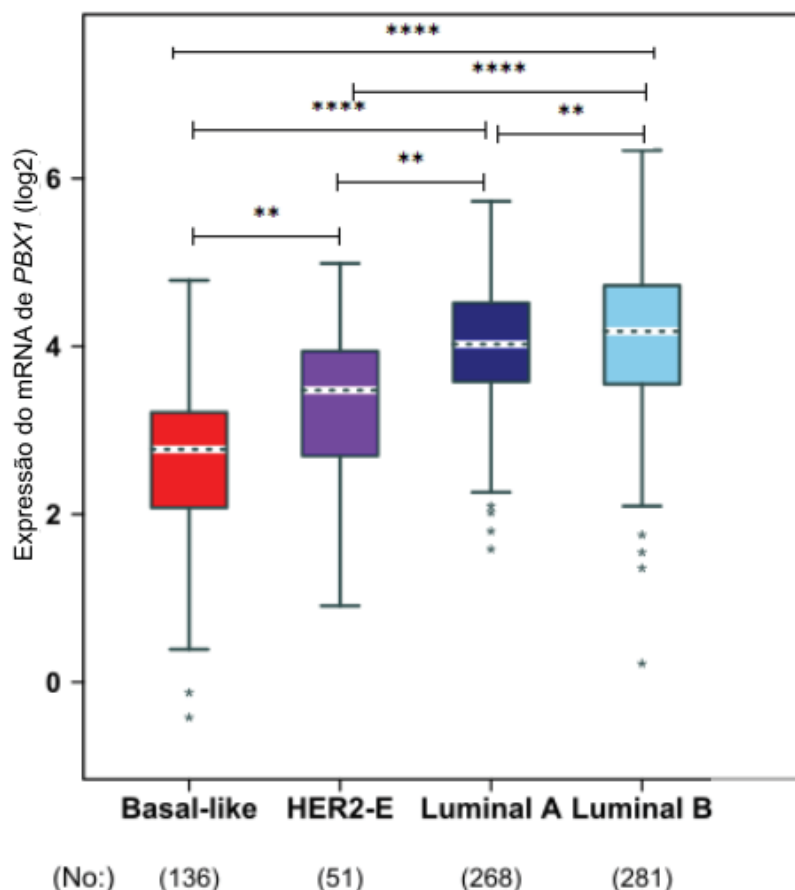
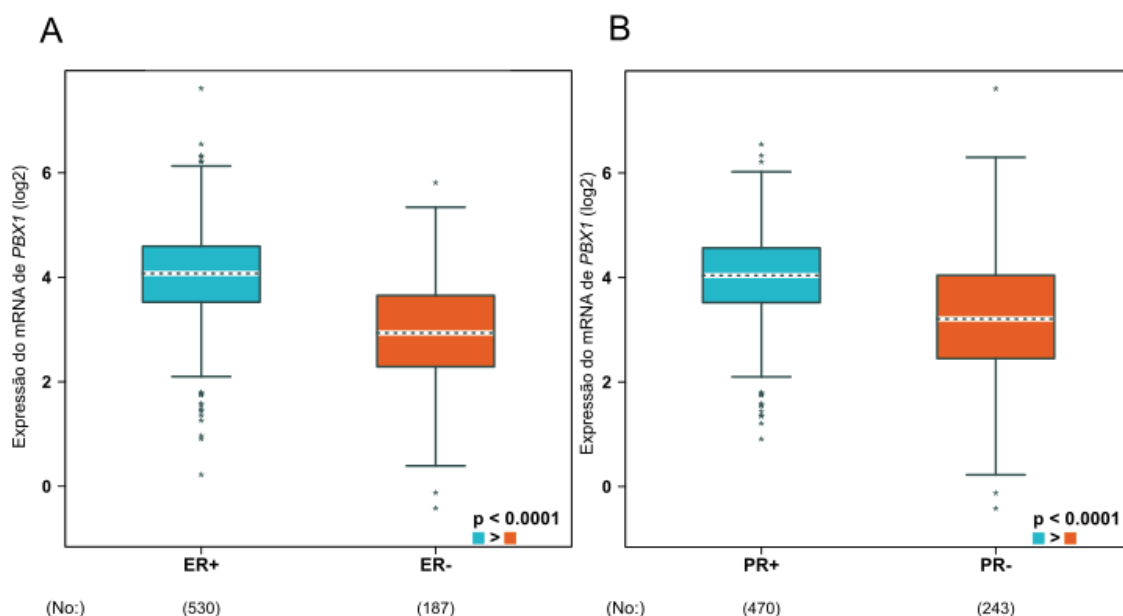


Gráfico de box e whisker da expressão de *PBX1* em amostras de câncer de mama. Dados obtidos no TCGA: *The Cancer Genome Atlas*; mRNA: *Messenger RNA*. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Fonte: A autora (2022)

Conhecendo a importância do *PBX1* na via de estrogênio (MAGNANI et. al, 2011), foi realizada também a análise de comparação da sua expressão em amostras com diferentes combinações de receptores hormonais, utilizando dados do TCGA e classificação dos receptores através de imunoistoquímica. Ao comparar as amostras de receptores hormonais positivos com as amostras de receptores hormonais negativos, em ambos os casos, estrogênio e

progesterona, a expressão de *PBX1* foi superior em amostras positivas para o receptor hormonal ($p < 0,0001$) (Figura 12).

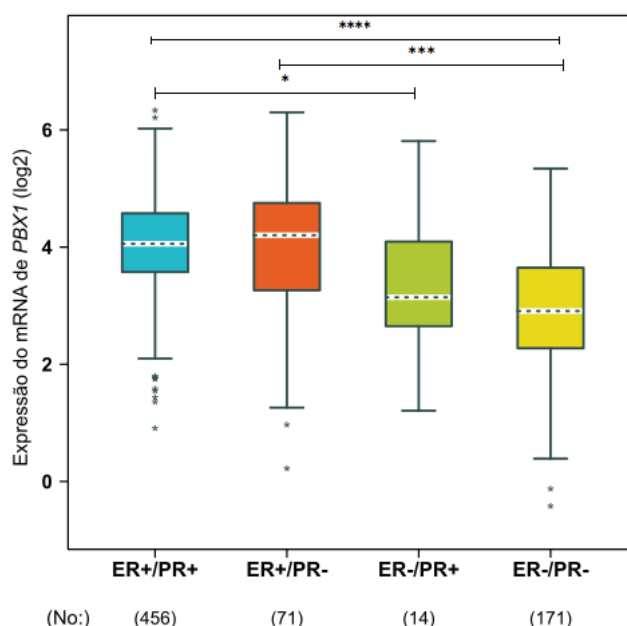
Figura 12: Análise da expressão de *PBX1* em amostras com diferenças na expressão de receptores de estrogênio e progesterona



Gráficos de box e whisker da expressão de *PBX1* em amostras classificadas de acordo com o (A) receptor de estrogênio positivo (ER+) ou negativo (ER-) e (B) receptor de progesterona positivo (PR+) ou negativo (PR-). No: número de amostras. Fonte: A autora (2022)

Além da avaliação do *status* dos receptores individualmente, também foi realizada a análise com combinações possíveis de presença e ausência de ambos os receptores hormonais em relação às amostras que não expressam nenhum dos receptores. Observa-se que há uma redução na expressão de *PBX1* conforme as seguintes combinações ER+/PR+ > ER-/PR-, ER+/PR- > ER-/PR-, ER-/PR+ > ER-/PR- ($p < 0,0001$, $p < 0,001$, $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 13). Por sua vez, não houve diferença significativa nas comparações ER+/PR- x ER-/PR+ ($0,05 < p < 0,10$), ER-/PR+ x ER-/PR- ($p > 0,10$) e ER+/PR+ x ER+/PR- ($p > 0,10$) (dados não mostrados). Esses resultados reforçam o papel importante de *PBX1* na via de receptores hormonais, em especial do estrogênio.

Figura 13: Comparação da expressão de PBX1 entre amostras com diferentes status de receptores hormonais de estrogênio e progesterona

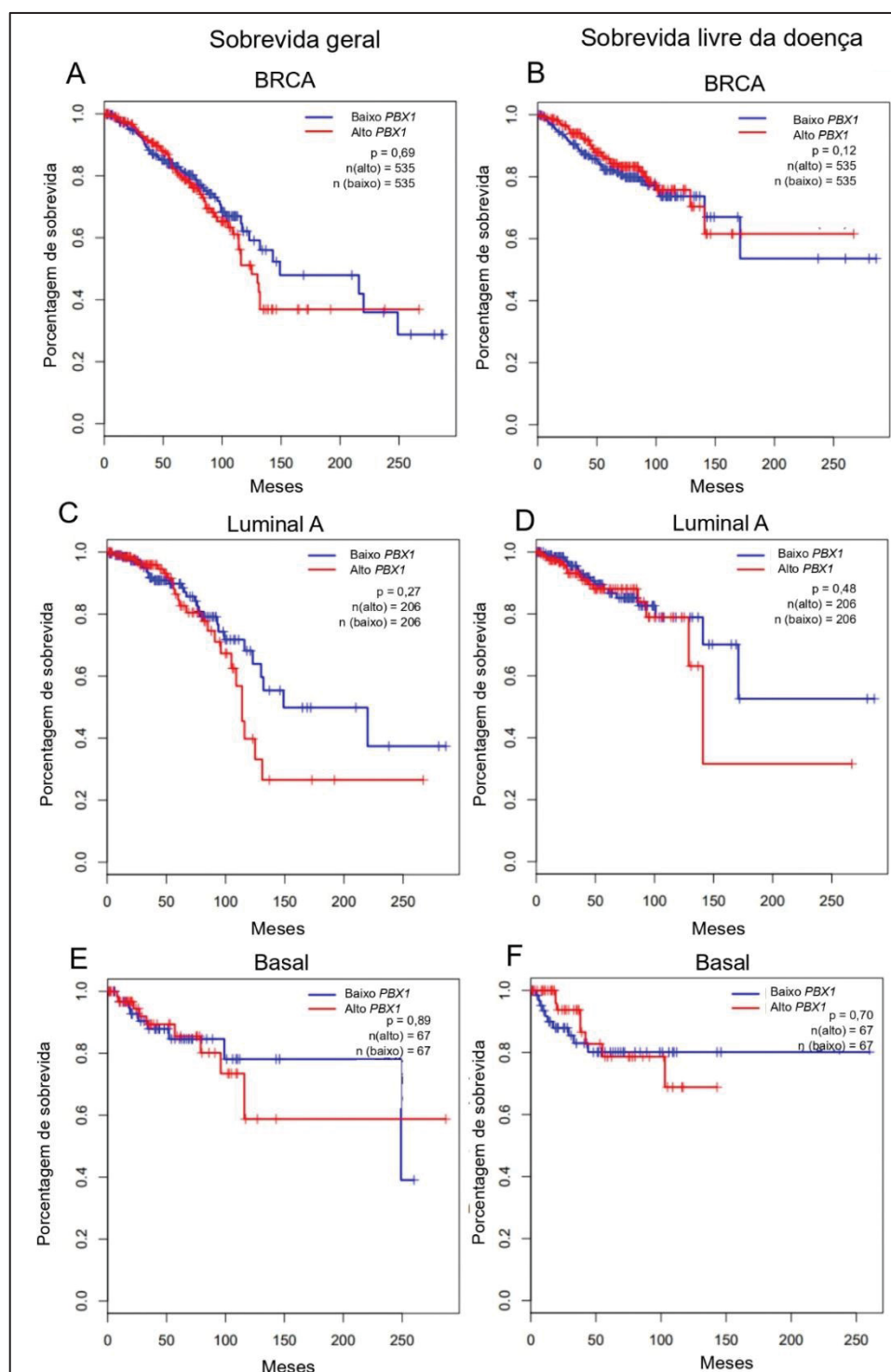


Amostras agrupadas de acordo com o status de expressão dos receptores hormonais ER e PR através da classificação por imunoistoquímica. ER: *Estrogen receptor*; PR: *Progesteron receptor*; No: número de amostras Fonte: A autora (2022)

Uma vez que há diferentes subtipos histológicos de câncer de mama, julgou-se importante também realizar a análise comparativa da expressão de *PBX1* entre eles, comparando todos contra todos com as amostras do banco de dados TCGA. Foram considerados os subtipos histológicos; carcinoma lobular invasivo, carcinoma intraductal e carcinoma mucinoso. Em todas as análises comparativas não houve diferença significativa da expressão de *PBX1* ($p = 0,308$), sugerindo que a origem histológica do tumor não parece impactar a expressão deste gene.

Buscando conhecer melhor os efeitos da expressão de *PBX1* no câncer de mama, realizou-se a análise de sobrevida geral e sobrevida livre da doença considerando amostras do TCGA. Sobrevida geral, trata da porcentagem de pacientes que vivem por um determinado período de tempo após o diagnóstico, e sobrevida livre da doença, é a porcentagem de pacientes que vivem sem sintomas de câncer após o final do tratamento. Pode-se observar que a diferença na expressão de *PBX1* não impactou na sobrevida geral e livre de doença em pacientes de carcinoma mamário, mesmo quando avaliamos os subtipos específicos luminal A e basal (Figura 14).

Figura 14 : Avaliação do impacto da expressão de PBX1 na sobrevida de pacientes com câncer de mama



À esquerda temos análise de sobrevida geral e à direita análise de sobrevida livre da doença. Em A e B estão representados os gráficos de Kaplan-Meier para BRCA, em C e D para o subtipo luminal A e em E e F para o subtipo Basal. Fonte: A autora (2022)

6.3 Seleção de genes relacionados à angiogênese

O gene *PBX1* tem sido estudado e associado com vários *hallmarks* do câncer (MAGNANI et. al, 2015; LI et. al, 2014; ZHAO et. al, 2022), porém o impacto de sua expressão na via da angiogênese, uma característica importante nos processos metastáticos, anda não está bem documentado. Dessa forma, buscou-se obter em bases de dados e na literatura, genes que se encontram diferencialmente expressos nessa via para avaliar a existência de correlação com a expressão de *PBX1*. A partir da base de dados *Gene Set Enrichment Analysis*, foram selecionados 36 genes com expressão alterada durante a formação de novos vasos sanguíneos em amostras tumorais comparadas ao tecido não tumoral: *APOH*, *APP*, *CCND2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *CXCL6*, *FGFR1*, *FSTL1*, *ITGAV*, *JAG1*, *JAG2*, *KCNJ8*, *LPL*, *LRPAP1*, *LUM*, *MMP2*, *MMP9*, *MSX1*, *NRP1*, *OLR1*, *PDGFA*, *PF4*, *PGLYRP1*, *POSTN*, *PRG2*, *PTK2*, *S100A4*, *SERPINA5*, *SLCO2A1*, *SPP1*, *STC1*, *THBD*, *TIMP1*, *TNFRSF21*, *VAV2*, *VCAN*, *VEGFA* e *VTN*. Além destes, outro gene obtido a partir da literatura foi incluído: *ANGPTL4* (ZHOU, YAO, HU, 2017).

6.4 Análises de correlação

Na busca por genes com expressão correlacionada ao *PBX1* tanto positiva como negativamente, e baseado nos resultados de diferença de expressão de *PBX1* entre os subtipos luminal A e basal, foi avaliado através de dados do TCGA, o perfil de expressão dos genes acima selecionados em 503 amostras luminal A e 174 amostras do subtipo basal. Considerando os valores de correlação $-0,3 > R > 0,3$ observou-se os seguintes genes os quais possuem alguma correlação positiva ou negativa com o *PBX1* nos subtipos luminal A (LA) e basal para angiogênese (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Genes da via da angiogênese com expressão correlacionada à *PBX1* no subtipo Luminal A

Gene	ENSEMBL ID	Correlação (R)	Valor de P
<i>ITGAV</i>	ENSG00000138448	0.333578273609924	3.36361516884115e-14
<i>PTK2</i>	ENSG00000169398	0.356685472704852	3.79803274687973e-16
<i>TIMP1</i>	ENSG00000102265	-0.365797210018043	5.84269674262409e-17
<i>MSX1</i>	ENSG00000163132	-0.369436662218041	2.72002228506918e-17
<i>S100A4</i>	ENSG00000196154	-0.372453765102699	1.43251156175031e-17

Resultados de correlação realizados através dos métodos de Pearson. Fonte: A autora (2022).

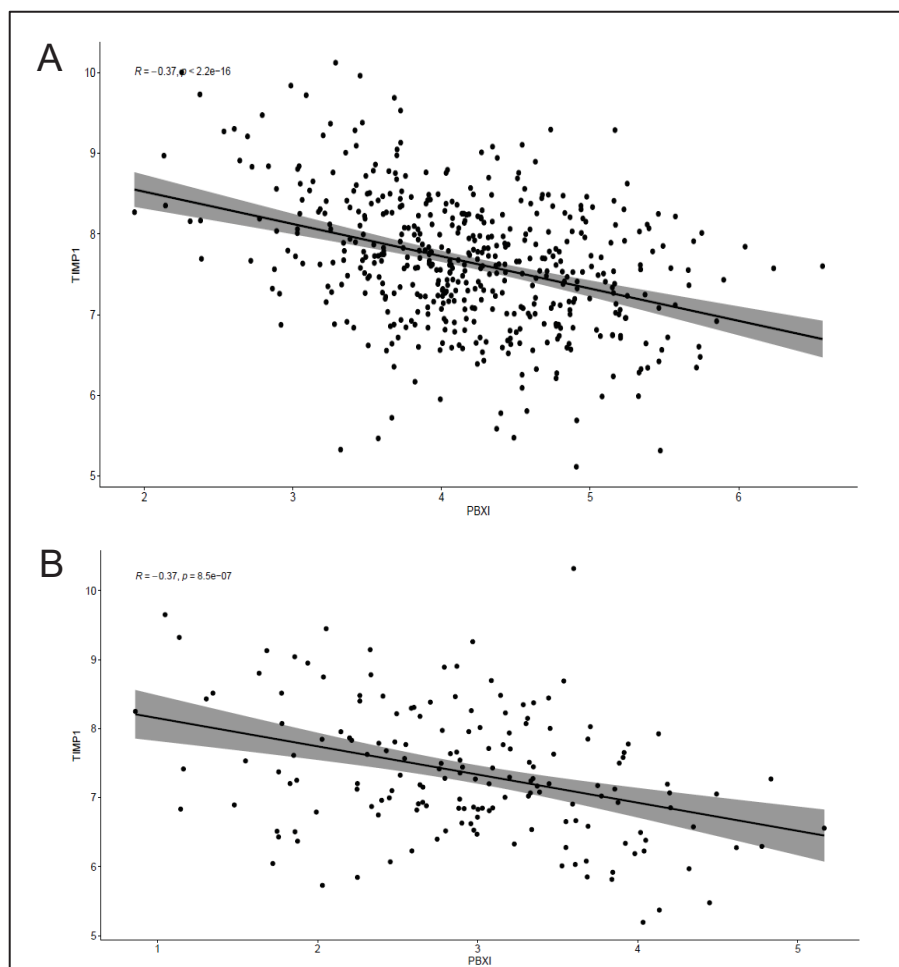
Tabela 2: Genes da via da angiogênese com expressão correlacionada à *PBX1* no subtipo basal.

Gene	ENSEMBL ID	Correlação (R)	Valor de P
<i>PTK2</i>	ENSG00000169398	0.420446058552348	1.39398346876872e-08
<i>LPL</i>	ENSG00000175445	0.31479916734582	3.23923748978553e-05
<i>TIMP1</i>	ENSG00000102265	-0.369192349887771	8.45079109961853e-07

Resultados de correlação realizados através dos métodos de Pearson. Fonte: A autora (2022).

Dentre os genes acima listados, salientamos a correlação inversa de *PBX1* com *TIMP1* (TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1), em ambos os subtipos luminal A e basal no câncer de mama (Figura 15). Trata-se de um conhecido fator antiangiogênio (REED et. al., 2003), importante para inibição da ação das metaloproteases.

Figura 15: Correlação do gene *TIMP1* com o gene *PBX1* em subtipos de câncer de mama Luminal A e Basal



Correlação da expressão do gene *TIMP1* com *PBX1* nos subtipos de câncer de mama estudados. A: imagem de correlação em subtipo Luminal A ($R = -0,37$; $p = 8,5 \text{ e-}07$). B: imagem de correlação em subtipo Basal ($R = -0,37$; $p < 2,2 \text{ e-}16$), Fonte: A autora (2022).

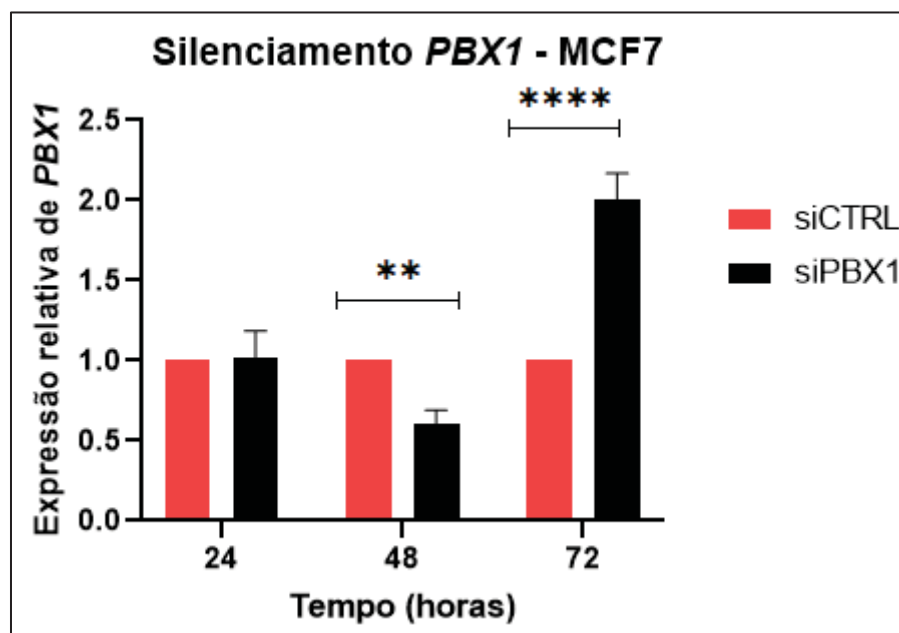
6.5 O silenciamento de *PBX1* não impactou na viabilidade e proliferação celular na linhagem MCF7.

Para avaliar o impacto funcional de *PBX1* o silenciamento com pequenos RNAs de interferência (siRNA) foi realizado na linhagem celular MCF7, correspondendo ao subtipo de câncer de mama Luminal A (KAO et. al, 2009). O silenciamento foi comprovado através de PCR quantitativa (Figura 16).

Esta estratégia de silenciamento gênico é temporária e varia para cada alvo (MOCELLIN & PROVENZANO, 2004), portanto avaliamos os níveis de expressão em 3 tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). Na linhagem MCF7, foi possível verificar uma diminuição na expressão de *PBX1* de aproximadamente

40% ($p < 0,01$), 48 horas após a transfecção. Após este período, observou-se uma retomada nos níveis deste transcrito, inclusive com um pico de expressão em 72 horas, quando comparamos com o ensaio controle (siCTRL) (Figura 16).

Figura 16: Expressão relativa do gene *PBX1* pós tratamento com siRNA e siCTRL (controle negativo)



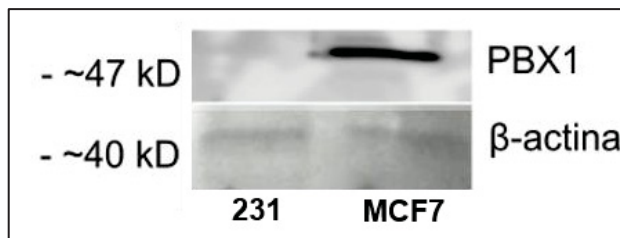
Análise da expressão através de RT-qPCR do gene *PBX1* nas amostras de linhagens celulares tratadas com siPBX1 e controle negativo, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, em três experimentos independentes. Valores de expressão relativos aos dos genes *ACTB* e *TBP*, calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Teste t de *student* foi utilizado. ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Apesar das análises de bioinformática revelarem que a expressão de *PBX1* era presente em amostras de pacientes do subtipo Basal (dados de RNAseq), na linhagem equivalente, MDA-MB-231, estes níveis foram menores do que o limite de detecção da técnica de RT-qPCR. Assim não foi possível avaliar se houve silenciamento gênico.

A ausência da detecção da expressão do transcrito de *PBX1* em células MDA-MB-231 levou à pergunta: a proteína *PBX1* é expressa nesta linhagem? Para responder este questionamento, foi realizado o ensaio de *Western blot* com amostras de MDA-MB-231. Células da linhagem MCF7 foram eficientemente silenciadas para a proteína *PBX1*, porém os dados de *immunoblotting* não foram incluídos neste documento por fazerem parte de outro trabalho do grupo ainda não publicado. Conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 17), assim como

observado para o transcrito, não foi possível detectar a proteína PBX1 nas linhagens MDA-MB-231.

Figura 17: Expressão de PBX1 em linhagens MCF7 e MDA-MB-231



Expressão da proteína PBX1 através do ensaio de *Western blot* em linhagens MCF7 e MDA-MB-231. Fonte: A autora (2022)

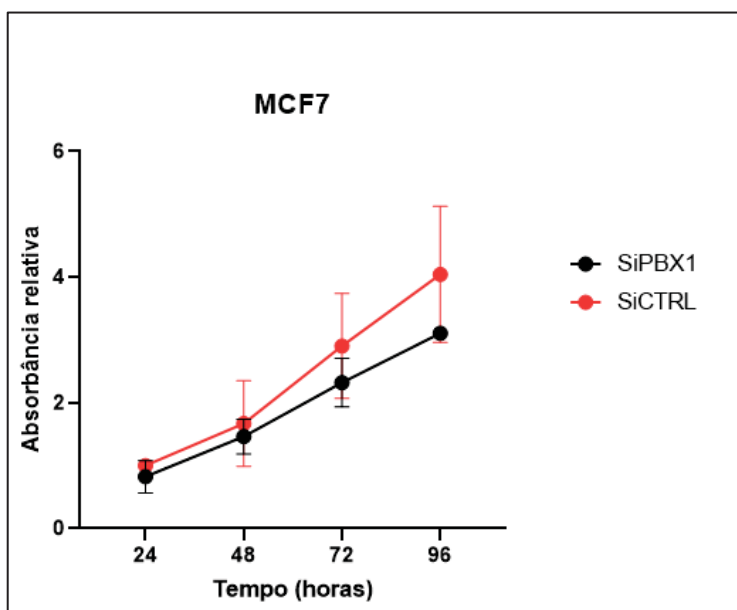
Como não foi encontrado sinais de transcrito ou proteína na linhagem celular MDA-MB-231, foram incluídos neste documento apenas os ensaios funcionais realizados na linhagem MCF7.

6.5.1 Análise de viabilidade celular

Com o propósito de verificar a quantidade de células que estão metabolicamente ativas, após o silenciamento gênico, as mesmas foram tratadas com o composto resazurina, que permite avaliar, através de uma reação colorimétrica o número de células metabolicamente ativas *in vitro* (AHMED; GOGAL JR; WALSH, 1994).

Na linhagem celular MCF7, não foi possível observar uma diferença estatística significativa na viabilidade celular comparando as amostras tratadas com o siPBX1 e controle negativo ($p > 0,05$), em nenhum dos momentos avaliados (Figura 18).

Figura 18: Ensaio de viabilidade celular

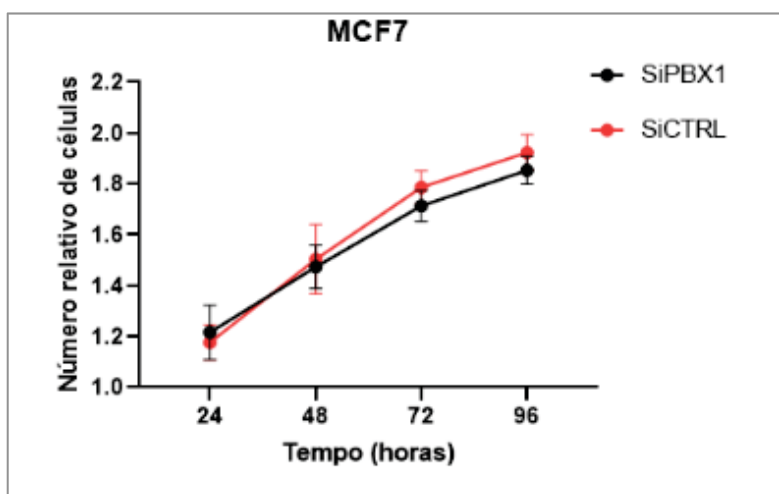


Valores de absorbância normalizados pelo controle negativo (siCTRL) referentes às células viáveis na linhagem MCF7. Estão representados resultados para três experimentos independentes com quintuplicatas técnicas. O teste t de *student* foi aplicado.

6.5.2 Ensaio de proliferação celular

Este ensaio tem por princípio avaliar se as células submetidas ao tratamento de silenciamento e controle são estimuladas a dividir-se ou não. Após tratar as células com o siPBX1 e siCTRL, observou-se que não houve impacto significativo na proliferação celular nos tempos analisados (Figura 19).

Figura 19: Ensaio de proliferação celular

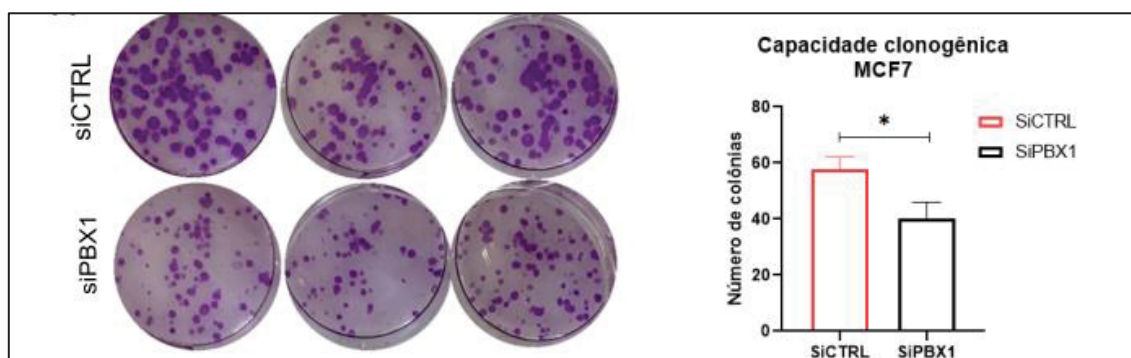


Análise de proliferação na linhagem MCF7. Estão representados resultados para três experimentos independentes com quintuplicatas técnicas. A normalização realizada é relativa ao controle de 24 horas. O teste t de *student* foi aplicado. Fonte: A autora (2022).

6.6 O silenciamento de *PBX1* alterou a capacidade de formação de colônias em células da linhagem celular MCF7

A capacidade de uma célula formar colônias *in vitro* está relacionada ao processo de metástase que ocorre *in vivo*, um fenômeno que depende fortemente da angiogênese para acontecer (BIELENBERG & ZETTER, 2015). Considerando esse aspecto, o ensaio de formação de colônias foi realizado (Figura 20).

Figura 20: Ensaio de capacidade clonogênica



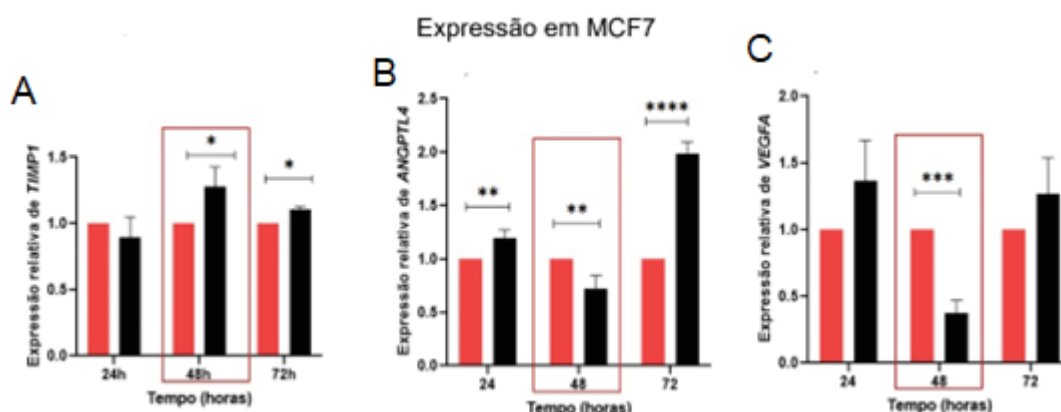
Ensaio de capacidade clonogênica em linhagem MCF7. À esquerda podemos visualizar as colônias formadas, enquanto à direita o gráfico correspondente à contagem de colônias em cada linhagem. O resultado abrange três experimentos independentes, * $p < 0,05$, utilizando teste t não pareado. Fonte: A autora (2022)

É possível observar que na linhagem MCF7 houve um impacto na habilidade de formação de colônias após o silenciamento de *PBX1* ($p < 0,05$). Além do número de colônias ser menor, o tamanho delas também foi inferior às colônias formadas no ensaio controle (Figura 20).

6.7 O silenciamento de PBX1 levou a alteração na expressão de genes da via de angiogênese

Buscando entender melhor a relação da expressão de *PBX1* com o processo de angionêse, além de analisar a expressão de um fator anti-angiogênico como o TIMP-1, dois fatores pró angiogênicos, a angiopoietina 4 (*ANGPTL4*) e o Fator A de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGFA*) (ZHOU, YAO, HU, 2017) foram avaliados quanto à sua correlação com *PBX1* em linhagem celular correspondente ao subtipo luminal A através de RT-qPCR (Figura 21).

Figura 21: Análise da expressão dos genes TIMP1, ANGPTL4 e VEGF-A pós silenciamento de PBX1 na linhagem MCF7



Análise de expressão dos genes *TIMP1* (A), *ANGPTL4* (B) e *VEGF-A* (C) na linhagem MCF7. Em vermelho temos os dados referentes às amostras tratadas com o siCTRL e em preto as amostras tratadas com o siPBX1. Em destaque está demonstrado a melhor performance do silenciamento de *PBX1*, no tempo de 48 horas. Valores de expressão relativos aos dos genes *ACTB* e *TBP*, calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Teste t de *student* foi utilizado * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Representação de três experimentos independentes.

6.8. Análise de expressão de *PBX1* em outros tipos de câncer

Tendo observado a expressão diferencial de *PBX1* em câncer de mama, decidiu-se avaliar sua expressão em 32 outros tipos de câncer sólido, usando dados de sequenciamento do TCGA. Em metade destes tipos tumorais avaliados, *PBX1* estava diferencialmente expresso ($p < 0.05$) (Quadro 1). Dos

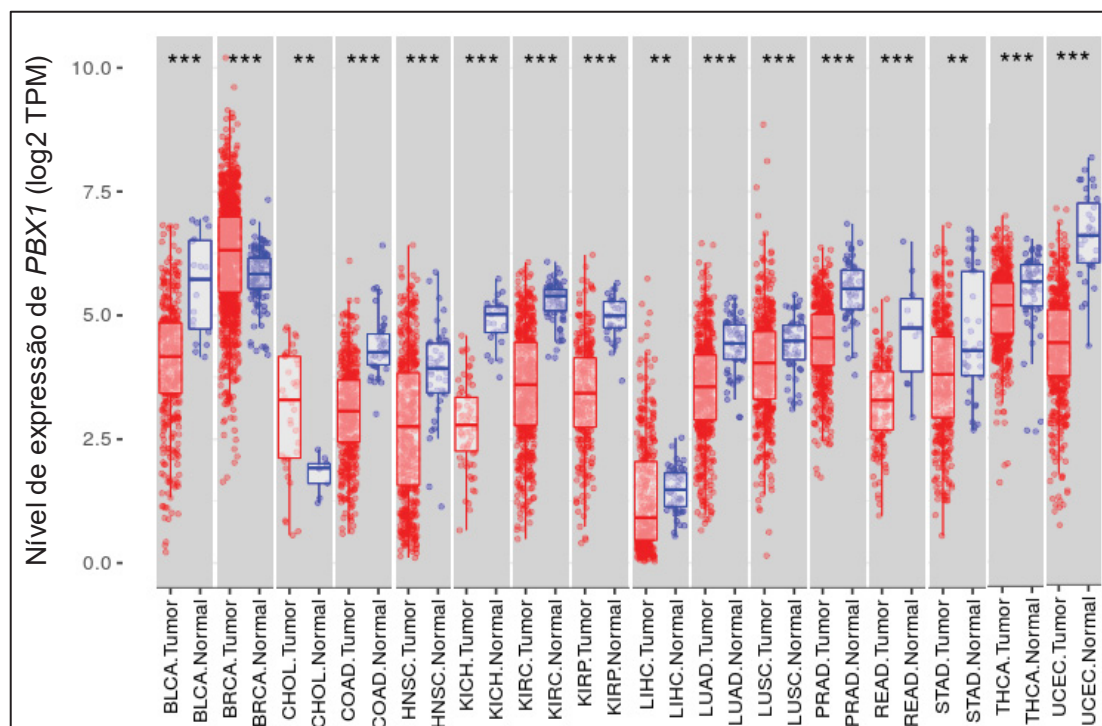
16 tipos de câncer, em 2 deles a expressão de *PBX1* estava aumentada em relação ao tecido não tumoral (BRCA e CHOL) e nos demais, a expressão estava diminuída em relação ao tecido normal (BLCA, COAD, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LIHC, LUAD, LUSC, PRAD, READ, STAD, THCA e UCEC) (Figura 22).

Quadro 1: Identificação dos tumores com diferença de expressão de *PBX1* em relação às amostras não tumorais

Sigla	Nome	NT	NNT
<i>BLCA</i>	Carcinoma de Bexiga	408	19
<i>BRCA</i>	Carcinoma de Mama	1093	112
<i>CHOL</i>	Colangiocarcinoma	36	9
<i>COAD</i>	Adenocarcinoma de Colon	41	48
<i>HNSC</i>	Carcinoma escamoso de cabeça e pescoço	520	44
<i>KICH</i>	Carcinoma renal cromóforo	66	25
<i>KIRC</i>	Carcinoma renal de células claras	533	72
<i>KIRP</i>	Carcinoma renal de células papilares	290	32
<i>LIHC</i>	Carcinoma hepatocelular de fígado	371	50
<i>LUAD</i>	Adenocarcinoma de pulmão	515	59
<i>LUSC</i>	Carcinoma de células escamosas de pulmão	501	51
<i>PRAD</i>	Adenocarcinoma de próstata	178	41
<i>READ</i>	Adenocarcinoma de reto	166	10
<i>STAD</i>	Adenocarcinoma de estômago	415	35
<i>THCA</i>	Adenocarcinoma de tireoide	501	59
<i>UCEC</i>	Adenocarcinoma de corpo uterino endometrial	545	37

Aa siglas provêm do nome do tumor em inglês. NT: número de amostras tumorais; NNT número de amostras não tumorais. Fonte: A autora (2022)

Figura 22: Expressão de *PBX1* em 16 tipos de câncer e seus respectivos tecidos não tumorais



Na imagem estão representadas comparações entre o tecido tumoral, representado nas barras vermelhas, com o tecido não tumoral, representado nas barras azuis. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

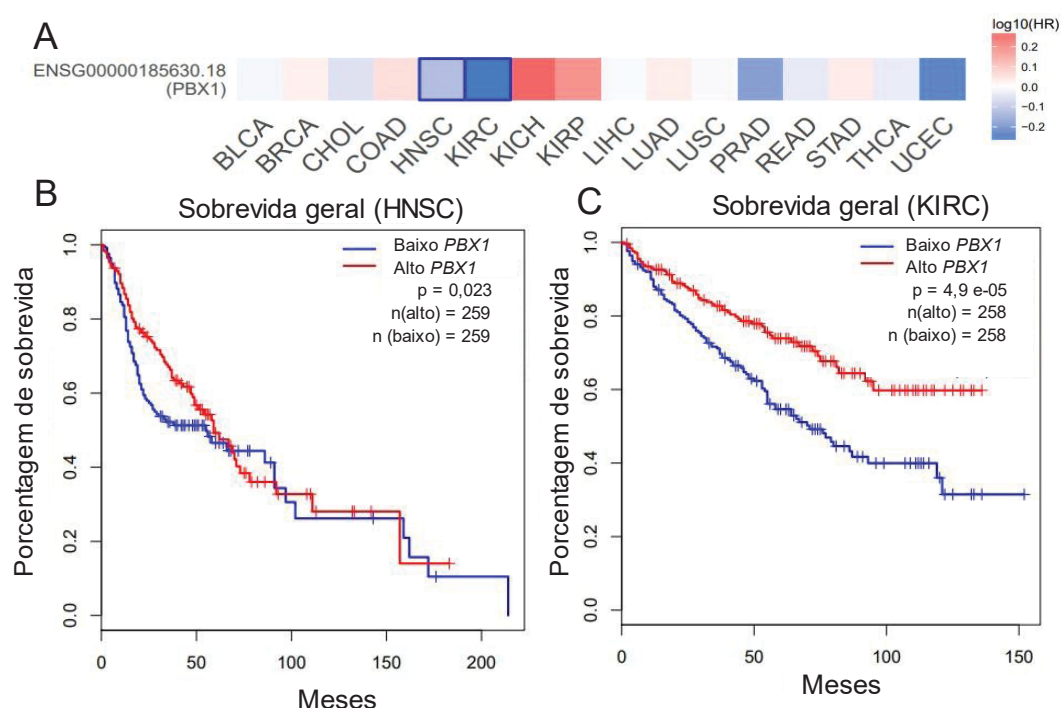
6.9 A expressão de *PBX1* possui um impacto na sobrevida geral nos cânceres de HNSC e KIRC e na sobrevida livre da doença em KIRC

Uma vez que conhecemos que há diferença na expressão de *PBX1* entre tecidos tumorais e não tumorais, verificou-se se essa diferença impactaria na sobrevida geral e livre da doença. Para essa análise foram utilizados dados de pacientes do TCGA em todos os tipos de câncer em que *PBX1* foi diferencialmente expresso (BLCA, BRCA, CHOL, COAD, HNSC, KIRC, KICH, KIRP, LIHC, LUSC, LUAD, PRAD, READ, STAD, THCA e UCEC).

Conforme demonstrado anteriormente, em câncer de mama, a expressão de *PBX1* não impacta na sobrevida das pacientes (Figura 14). Para os demais tumores, estudados, observou-se que nos cânceres de cabeça e pescoço (HNSC) e células claras de rim (KIRC) a expressão de *PBX1* impactou na sobrevida geral de pacientes (Figura 23). No câncer de cabeça e pescoço

(HNSC), apesar do valor de p ser significativo, o perfil de expressão de *PBX1* ao longo do tempo, não está claramente relacionado à sobrevida, indicando que talvez neste caso *PBX1* pode não ser um bom biomarcador prognóstico (Figura 23B). Em contrapartida, em câncer de rim (KIRC), foi possível visualizar um claro impacto na sobrevida geral dos pacientes, onde a alta expressão de *PBX1* levou a uma melhor sobrevida geral (Figura 23C).

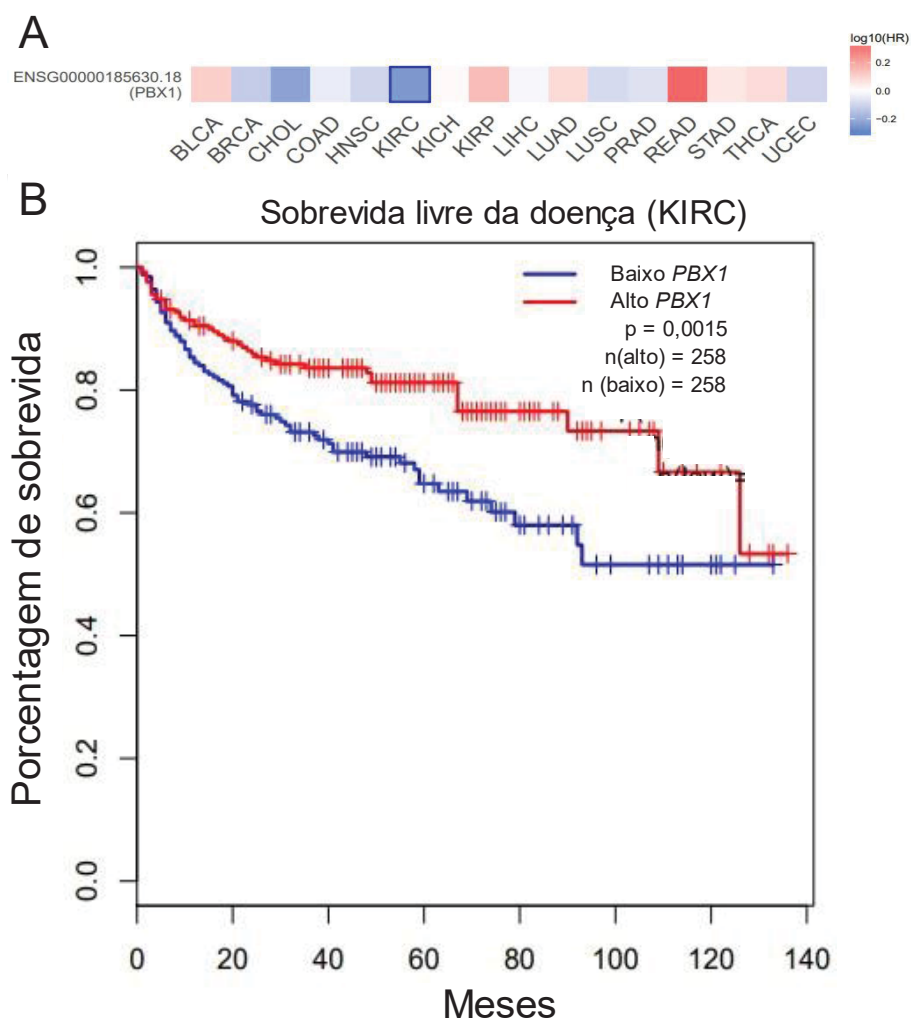
Figura 23: Mapa de sobrevida e gráficos de Kaplan-Meier para sobrevida geral dos cânceres HNSC e KIRC



Mapa de sobrevida geral para todos os cânceres, destacando os cânceres de HNSC e KIRC no qual a expressão de *PBX1* mostrou um impacto nesta análise específica de sobrevida (A). Em B e C, os gráficos de Kaplan-Meier relacionando a expressão de *PBX1* para os cânceres de HNSC e KIRC, respectivamente. Fonte: A autora (2022).

Assim como na sobrevida global, a maior expressão de *PBX1* em carcinoma renal de células claras (KIRC) tem um impacto significativo na sobrevida livre de doença ao longo do tempo (Figura 24).

Figura 24: Mapa de sobrevida e gráficos de Kaplan-Meier para sobrevida livre da doença do câncer de KIRC



Em A temos o mapa de sobrevida da sobrevida livre de doença para todos os cânceres, destacando o câncer de KIRC no qual a expressão de *PBX1* exerceu um impacto nesta análise específica de sobrevida. Em B e C, os gráficos de Kaplan-Meier para os cânceres de HNSC e KIRC, respectivamente. Fonte: A autora (2022).

6.10 O gene *PBX1* está correlacionado com outros genes da via de angiogênese no câncer renal de células claras (KIRC)

Conhecendo o impacto que *PBX1* exerce na sobrevida de pacientes em câncer de células claras de rim (KIRC), decidiu-se fazer uma análise de correlação nos mesmos genes da via de angiogênese utilizados em câncer de mama, afim de entender melhor o papel deste gene nessa via específica em câncer do subtipo KIRC. Seguindo o mesmo filtro utilizado para o câncer de

mama, que foi uma correlação maior que 0,3 ou menor que -0,3, dos genes analisados 6 deles obedeceram a este critério (Tabela 3).

Tabela 3: Genes da via da angiogênese com expressão correlacionada à *PBX1* no câncer subtipo KIRC

Gene	ENSEMBL ID	Correlação (R)	Valor de P
<i>APP</i>	ENSG00000142192	0,474770360197039	6.31075438993718e-31
<i>ITGAV</i>	ENSG00000138448	0.357192286504717	2.83776577584283e-17
<i>JAG1</i>	ENSG00000101384	0.403447706359362	5.21744174921251e-22
<i>NRP1</i>	ENSG00000099250	0.313052585416393	2.00921674944179e-13
<i>PTK2</i>	ENSG00000169398	0.516521030931115	3.28063120362785e-37
<i>SLCO2A1</i>	ENSG00000174640	0.496766858587545	3.95693496928003e-34

Resultados de correlação realizados através do método de Pearson. Fonte: A autora (2022).

Os genes estudados na via da angiogênese em câncer de mama *TIMP1*, *VEGFA* e *ANGPTL4* não obtiveram correlações que obedeceram ao critério imposto ($R = -0,24$; $R = 0,12$; $R = -0,11$, respectivamente). Com esses resultados, mais estudos funcionais são necessários para avaliar a influência de *PBX1* na via de angiogênese no câncer de rim, especialmente o gene *NRP1*, gene relevante no processo de desenvolvimento do sistema cardiovascular e angiogênese por codificar um receptor que atua dependente ou independente de VEGF (LAMPROPOULOU & RUHRBERG, 2014).

7 DISCUSSÃO

PBX1 é um fator de transcrição de homeodomínio pertencente a classe TALE (*Three Amino acid Loop Extension*) que está envolvido em inúmeros processos embrionários e hematopoiéticos, atuando na regulação da expressão gênica, na modulação de proteínas HOX entre outras funções (OMIM, 2022). Além de seu papel na biologia do desenvolvimento, o gene *PBX1* também foi associado com transformações malignas em células, envolvido na tumorigênese (MAGNANI et. al, 2015; MUGGEO et. al, 2021; HE et. al, 2015). O fato de PBX1 estar implicado em diversos *hallmarks* contribuindo para a progressão do câncer em diversos níveis, como na proliferação celular sustentada, resistência à apoptose e evasão do sistema imune, permite considerá-lo como um oncogene. Entretanto, *PBX1* pode também atuar como um gene supressor de tumor, aumentando a estabilidade genética através da regulação de *PREP1*, um supressor de tumor conhecido como um cofator que heterodimeriza com *PBX1* para regular a transcrição gênica (VEIGA, DE OLIVEIRA, GRADIA, 2021; DARDAEI, LONGORBADI, BLASI, 2014). Esta dualidade de papéis na oncogênese provavelmente deve-se à sua função de fator de transcrição pioneiro, promovendo a abertura da cromatina, facilitando a associação de outros fatores de transcrição, específicos para cada contexto celular (GREBBIN & SCHULTE, 2017; LIU et. al, 2022).

Apesar de estar relacionado a diversos *hallmarks* do câncer, durante a angiogênese, um evento fundamental para o processo metastático, a participação deste fator de transcrição não está bem caracterizada. Em estudos anteriores, foi demonstrada a interação de PBX1 com fatores HOX em um contexto não tumoral em células endoteliais (CHARBONEAU et. al, 2005), e na diferenciação vascular renal (HURTADO et., al, 2015), porém trabalhos com câncer ainda são poucos. Em câncer de pele melanoma, utilizando células A375 e A397 como modelo de estudo, o nocaute de *PBX1* diminuiu os níveis de genes pró-angiogênicos *MMP9*, *ANGPT-2* e *bFGF*, bem como o crescimento dessas células tumorais (SHIRAISHI et. al, 2009). Em câncer gástrico, foi demonstrado que a expressão de PBX1 leva ao aumento dos níveis de mRNA novamente dos genes *bFGF*, *MMP9* e *NRG2* (HE et. al., 2017).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais afeta mulheres no Brasil e no mundo, e por isso, foi selecionado para um estudo mais aprofundado. Ao comparar subtipos deste câncer, foi possível observar uma maior expressão de *PBX1* em subtipos luminais, comparados aos demais, além de um aumento na expressão em amostras que expressam os receptores hormonais ER e PR em relação às que não os expressam. Esses resultados corroboram os encontrados por Magnani e colaboradores (2011) e Ao e colaboradores (2020) em que o gene *PBX1* encontrou-se amplificado e mais associado com câncer de mama ER+, contribuindo para progressão e metástase nestes subtipos. Análises de sobrevida, entretanto, não indicam que a expressão aumentada ou diminuída deste gene seja um marcador prognóstico.

Para compreender melhor o papel de *PBX1* no câncer de mama, as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231, correspondentes aos subtipos Luminal A e basal, foram utilizadas neste trabalho. Os dados de RNAseq disponíveis no TCGA, indicam uma expressão reduzida de *PBX1* em amostras do subtipo basal. Esta informação foi corroborada em nossos ensaios onde usando técnicas menos sensíveis, não foi detectada a expressão do transcrito e da proteína *PBX1* na linhagem celular MDA-MB-231. No trabalho de Magnani e colaboradores (2011) a expressão também foi significativamente menor no câncer de mama ER-, chegando até a ser indetectável pelas técnicas utilizadas.

Por sua vez, nas células MCF7 correspondentes ao subtipo Luminal A (ER+), o silenciamento de *PBX1* foi capaz de reduzir sua expressão em 40%. Os ensaios celulares de viabilidade e proliferação, indicaram que a redução de *PBX1*, nos níveis obtidos neste estudo, não impactaram as células, nestes aspectos, de forma significativa.

A capacidade clonogênica das células MCF7 silenciadas para o *PBX1* foi afetada, tanto no número como no tamanho das colônias, com uma redução significativa em relação aos controles. Poucos trabalhos com estudos funcionais de *PBX1* em câncer de mama foram publicados. No modelo de estudo de câncer gástrico, He e colaboradores (2017) observaram que a superexpressão de *PBX1* promoveu um aumento na formação de colônia, proliferação e migração celular em células BFC823.

O resultado observado na capacidade clonogênica das células MCF7, levantou a questão sobre a possibilidade do envolvimento de *PBX1* nos

processos metastáticos. No câncer de mama, ainda não foram publicados trabalhos envolvendo *PBX1* no contexto de angiogênese, uma característica importante para o desenvolvimento de metástase. Assim, decidiu-se avaliar o efeito do silenciamento em genes relacionados à esta via.

Conhecendo o papel de *PBX1* nos processos de angiogênese em outros tipos tumorais (SHIRAISHI et. al, 2009, HE et. al., 2017), foi realizada uma análise de correlação de expressão entre *PBX1* e genes importantes desta via, usando dados de RNAseq de amostras de pacientes com câncer de mama. Os resultados mostram uma correlação inversa de *PBX1* com o gene *TIMP1*, tanto entre amostras do tipo Luminal quanto em basal (Tabela 1 e tabela 2).

O gene *TIMP1* é um importante fator inibidor de angiogênese, com função de inibir a expressão de metaloproteases (MMPs), proteínas que promovem a migração de células e angiogênese (QUINTERO-FÁBIAN et. al, 2019). O mecanismo de inibição das MMPs pelas moléculas TIMP foi elucidado baseado em estruturas de cristal do complexo TIMP-MMP. A forma de cunha da molécula TIMP e os resíduos Cys1-Thr-Cys-Val4 e Glu67-Ser-Val-Cys70 da porção N-terminal são capazes de ligar no sítio ativo das MMPs por uma ligação dissulfeto, inativando-as (NAGASE, VILLIAN, MURPHY, 2006).

Em nossas amostras de linhagem celular MCF7 silenciada para *PBX1*, observamos que a expressão de *TIMP1* aumentou significativamente ($p < 0,05$) em 48 horas comparada ao controle.

Embora *TIMP1* seja identificado tradicionalmente como um supressor tumoral, existem indícios de uma ação independente das MMPs em mecanismo pró-tumorigênico ainda pouco explorado. Anteriormente foi mostrado por Reed e colaboradores (2003) que a inibição de *TIMP1* foi capaz de promover a migração celular para formação de novos vasos e angiogênese em células endoteliais não tumorais (REED et. al, 2003). Já no câncer de mama, os resultados são um pouco controversos. No estudo de Nakopoulou e colaboradores (2003) com 133 casos de câncer de mama invasivos, a expressão de *TIMP1* reduzida foi correlacionada a um melhor prognóstico, especialmente em pacientes sem metástase linfonodal, porém neste artigo já foi levantada a hipótese de uma função à parte da supressão tumoral (NAKOPOULOU et. al, 2003). Entretanto, vale ressaltar que neste trabalho não foi considerada diferença entre status de receptor de estrogênio positivo e negativo, e esta

diferença pode ser a responsável pela discrepância entre papel de oncogene ou supressor de tumor. Em outro estudo, a superexpressão de *TIMP1* foi capaz de promover a malignidade em células MDA-MB-231 (câncer de mama) e o aumento da expressão de outros genes associados a progressão do tumor, como *DAPK1*, *FGFR4* e *MAPK13* (BIGELOW et. al, 2009). Outros contextos em que este gene contribuiu para o avanço do tumor foi, em progressão e metástase em câncer de cólon (SONG et. al., 2016) e próstata (GONG et. al, 2013) além do modelo murino em câncer de pulmão com metástase cerebral (ROJIANI et. al, 2015).

Por tratar-se de um processo que depende da regulação tanto de fatores pró como anti angiogênicos, decidimos avaliar também o impacto do silenciamento de *PBX1* em dois importantes fatores de promoção da formação de vasos sanguíneos, o *VEGFA* e a *ANGPTL4* (ZHOU et. al, 2017).

Ao analisarmos a expressão de *VEGFA*, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) no nível do seu transcrito no tempo de 48 horas pós silenciamento em células da linhagem MCF7. No trabalho de Jobim e colaboradores (2009) foi possível observar uma relação significativa ($p = 0,04$) entre alta expressão de *VEGF*, baixa expressão de *TIMP1* com alto perfil histológico em pacientes de câncer de mama. Em outro trabalho, com pacientes de câncer de mama familiar portadoras de *BRCA1/2*, os níveis de *VEGFA* estavam aumentados em pacientes mais graves e foi associado com um pior prognóstico e maior estímulo da angiogênese (SAPONARO et. al, 2013).

As Angiopoetinas (ANGPTs) e Angiopoetinas-like (ANGPTLs) constituem famílias de proteínas com funções abrangentes, tanto no cenário normal como no patológico. A principal diferença entre essas duas famílias é que apesar das estruturas serem similares (o que leva ao nome), as ANGPTLs são consideradas ligantes órfãos, uma vez que não se ligam aos receptores tradicionalmente ligados às ANGPT (SANTULLI, 2014). Com oito membros, nomeados de ANGPTL1 a 8, essas proteínas estão sendo cada vez mais estudadas como possíveis implicadores de efeitos em diversas vias, inclusive em processos fisiológicos normais (morfogênese de capilares, metabolismo energético de glicose, lipídeos e inflamação) e patológicos, como angiogênese no câncer (LIABOTIS et. al, 2022; SANTULLI, 2014; ENDO, 2019).

Considerando um contexto tumoral geral, as ANGPTLs possuem diversas funções. Enquanto as proteínas ANGPTL2, 3, 4, 6 e 7 são pró inflamatórias e regulam a progressão tumoral, ANGPTL1 possui uma função inibitória da angiogênese e metástase (ENDO, 2019). Alguns trabalhos já foram publicados em que a presença dessas moléculas pró inflamatórias contribuiu para a progressão do câncer, especialmente ANGPTL2 em metástase de câncer de pulmão (ENDO et. al, 2012), fígado (GAO et. al, 2015) e mama (MASUDA et. al, 2015; ZHANG et. al, 2012; ZHAO et. al, 2020); aumentou a permeabilidade vascular em sarcoma de Kaposi (MA et. al, 2010) e promoveu resistência à quimioterapia em câncer colorretal (HORIGUCHI et. al., 2014).

Em nossos resultados, pudemos observar uma redução no nível do transcrito de *ANGPL4* em 48 horas na célula MCF7. Uma das vias conhecidas para o mecanismo de ativação deste gene é pela indução de NF- κ B e MAPK dependente de IL-1 β no câncer de mama, levando à progressão do estado patológico e promoção de angiogênese (KOLB et. al, 2018). No estudo de Hu e colaboradores (2015), a expressão de *ANGPTL4* mediada por HIF-1 α foi detectada cerca de 50 vezes maior em material de biópsia de pacientes de melanoma, quantidade que foi suficiente para promover angiogênese *in vitro* (HU et. al, 2015). Houve progressão e metástase não somente em melanoma (IZRAELY et. al, 2017), como também em câncer colorretal (NAKAYAMA et. al, 2011) e gástrico (NAKAYAMA et. al, 2010), com uma invasão venosa dependente de angiogênese. No trabalho publicado por Cai e colaboradores (2020), a função de *ANGPTL4* pareceu ser supressora tumoral: a super expressão deste gene inibiu a adesão e migração nessas células do câncer triplo negativo, considerado o mais invasivo.

Nossas análises baseadas em informações disponíveis em banco de dados públicos mostram uma expressão variável de *PBX1* ao comparar diversos tipos de câncer, podendo estar aumentada ou reduzida em relação ao tecido normal, o que pode estar relacionado à característica ambivalente de oncogene ou supressor de tumor, dependendo do contexto celular, assim como observado para outros genes (XIAO et. al, 2016).

Além da diferença no perfil de expressão, o impacto na sobrevida dos pacientes foi também avaliado. Observa-se no câncer de células claras de rim, que a alta expressão de *PBX1* impactou em um aumento significativo na

sobrevida geral e sobrevida livre de doença. No câncer de rim este gene foi pouco estudado, porém em um estudo de Wei, Yu e Li (2018) com linhagens celulares o resultado encontrado foi divergente. Neste trabalho, os efeitos na sobrevida e funcionais foram benéficos com a baixa expressão/silenciamento de *PBX1* via JAK2/STAT3. Entretanto, o envolvimento de outras vias deve ser investigado, uma vez que esta não é a única. A proteína MEIS1 é um regulador negativo e interage com PBX1, e em estudo com câncer de células claras de rim, esta molécula suprimiu a proliferação celular, crescimento independente de ancoragem e morte de células não apoptóticas (ZHU et. al, 2017). De modo geral, mais estudos funcionais são necessários para demonstrar a atuação de *PBX1* em câncer de rim.

8 CONCLUSÕES

Com base no exposto, nossos dados sugerem que o fator de transcrição PBX1 exerce um papel oncogênico na linhagem de câncer de mama estrogênio positivo (Luminal A). Esta hipótese surge da combinação dos resultados observados após o silenciamento de PBX1 em MCF7 com a diminuição da capacidade clonogênica, aumentou a expressão de TIMP1 (anti angiogênico) e redução da expressão de VEGFA e ANGPTL4 (pró angiogênico).

Na linhagem de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) com as técnicas utilizadas neste trabalho, não foi possível detectar a expressão deste gene, tanto do transcrito como da proteína.

Com base nas análises de expressão realizadas em outros tipos de tumores sólidos, foi possível observar uma importância potencial de PBX1 em câncer de células claras de rim, visto que sua maior expressão se encontra associada a um aumento na sobrevida dos pacientes.

9 FUTURAS PERSPECTIVAS

Para melhor compreensão do papel do gene PBX1 na via de angiogênese, mais estudos são necessários. Um painel maior de genes envolvidos nessa via deve ser avaliado, tanto nos subtipos luminal A como basal, bem como análises de bioinformática englobando esses genes.

Além disso, ensaios de superexpressão de PBX1 podem contribuir elucidando melhor o papel deste fator de transcrição, em especial no subtipo Basal onde há baixa expressão deste gene.

Com relação ao câncer de rim, são necessários estudos funcionais em linhagem específicas deste fenótipo, afim de auxiliar no entendimento do papel deste gene como supressor tumoral neste tipo de câncer.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; GOGAL JR.; WALSH, J. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175994903964?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 maio. 2022.
- ALANKARAGE, D. et. al. Functional characterization of a novel de novo missense variant identified in a patient with syndromic congenital heart disease. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 7, p. 1068-1082, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31625560/>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- AO, X. et. al. PBX1 is a valuable prognostic biomarker for patients with breast cancer. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 20, n. 1, p. 385-394, 2020. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8705?text=fulltext>>. Acesso em: 14 abr. 2022.
- APOSTOLOU, P.; FOSTILA, F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-12, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/747318/>>. Acesso em: 17 jul. 2020.
- BELL, R. et. al. Final efficacy and updated safety results on the randomized phase III BEATRICE trial evaluating adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative early breast cancer. **Annals of oncology**, v. 28, n. 4, p. 754-760, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27993816/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.
- BERKES, C. et. al. Pbx Marks Genes for Activation by MyoD Indicating a Role for a Homeodomain Protein in Establishing Myogenic Potential. **Molecular Cell**, v. 14, p. 465-477, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276504002606?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 set. 2021.
- BIELENBERG, D. & ZETTER, B. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. **The cancer Journal**, v. 21, n. 4, p. 267-273, 2015. Disponível em: <https://journals.lww.com/journalppo/Fulltext/2015/07000/The_Contribution_of_Angiogenesis_to_the_Process_of.7.aspx>. Acesso em: 17 maio. 2022.
- BIGELOW, R. et. al. TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes in vivo distinct from those observed in vitro. **Breast cancer research and treatment**, v. 117, p. 31-44, 2009. Disponível em: <

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-008-0170-7>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

BLASI, F. et. al. A tale of TALE, PREP1, PBX1 and MEIS1: Interconnections and competition in cancer. **Bioessays**, v. 39, n. 5, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28322463/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

BOLJEVIC, I. et. al. Expression levels of genes involved in cell adhesion and motility correlate with poor clinicopathological features of epithelial ovarian cancer. **Journal of B.U.ON**, v. 24, n. 4, p. 1911-1917, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33099932/>>. Acesso em: 22 set. 2021.

BRUFISKY, A. et. al. RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 32, p. 4286-4293, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21990397/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

CAI, Y. et al. ANGPTL4 overexpression inhibits tumor cell adhesion and migration and predicts favorable prognosis of triple-negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 20, n. 878, 2020. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-020-07343-w>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69, 2005. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/88478>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

CASCONE, T., HAYMATCH, J. Targeting the Angiopoietin/Tie2 Pathway: Cutting Tumor Vessels With a Double-Edged Sword? **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 4, p. 442-444, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22184396/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

CHARBONEAU, A. et. al. Pbx1 is required for Hox D3-mediated angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 8, p. 289-296, 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10456-005-9016-7>>. Acesso em: 13 set. 2021.

CHEN, H.; CLECK, J. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. **Nature reviews clinical oncology**, v. 6, n. 8, p. 465-477, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19581909/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

DAI, X.; XIANG, L.; BAI, Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. **Journal of cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281-294, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4934037/#:~:text=In%202000%2C%20Weinberg%20et%20al,activating%20invasion%20and%20metastasis'%2011.>>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

DARDAEI, L.; LONGOBARDI, E.; BLASI, F. Prep1 and Meis1 competition for Pbx1 binding regulates protein stability and tumorigenesis. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 111, n. 10, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24578510/>>. Acesso em: 14 abr. 2022.

DEDERA, D. et. al. Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. **Cell**, v. 74, n. 5, p. 833-843, 1993. Disponível em: <[https://www.cell.com/fulltext/0092-8674\(93\)90463-Z](https://www.cell.com/fulltext/0092-8674(93)90463-Z)>. Acesso em: 13 set. 2021.

DIEDERICH, S. et. al. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. **EMBO molecular medicine**, v. 8, p. 442-457, 2016. Disponível em: <<https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/emmm.201506055>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

ENDO, M. The roles of ANGPTL families in cancer progression. **Journal of UOEH**, v. 41, n. 3, p. 317-325, 2019. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/juoeh/41/3/41_317/_article>. Acesso em: 15 abr. 2022.

ENDO, M. et. al. Tumor Cell-Derived Angiopoietin-like Protein ANGPTL2 Is a Critical Driver of Metastasis. **Cancer research**, v. 72, n. 7, 2012. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/7/1784/577921/Tumor-Cell-Derived-Angiopoietin-like-Protein>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

EROLE, P. et. al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 698-707, 2012. Disponível em: <[https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(11\)00244-1/fulltext](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(11)00244-1/fulltext)>. Acesso em: 01 jul. 2020.

FAN, Z. et. al. PTK2 promotes cancer stem cell traits in hepatocellular carcinoma by activating Wnt/ β -catenin signaling. **Cancer letters**, v. 450, p. 132-143, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30849480/>>. Acesso em: 22 set. 2021.

FENG, X., OFSTAD, W., HAWKINGS, D. Antiangiogenesis Therapy: A new Strategy for cancer treatment. **US Pharmacist**, v. 35, n. 7, p. 4-9, 2010. Disponível em: <<https://www.uspharmacist.com/article/antiangiogenesis-therapy-a-new-strategy-for-cancer-treatment>>. Acesso em: 24 ago. 2021

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, n. 285, p. 1182-1186, 1971. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM197111182852108>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

FONG, G. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. **Angiogenesis**, v. 11, p. 121-140, 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10456-008-9107-3>>. Acesso em: 10 set. 2021.

GALAUP, A. et. al. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 49, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17130448/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

GAO, L. et. al. ANGPTL2 promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 30, n. 2, p. 396-404, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25090954/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

GEORGIADI, A. et. al. Overexpression of angiopoietin-like protein 4 protects against atherosclerosis development. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**, v. 33, p. 1529-1537, 2013. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.113.301698?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 22 abr. 2022.

GIULIANO, A.; EDGE, S.; HORTOBAGYI, G. Eight edition of the AJCC Cancer staging manual: breast cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 25, n. 7, p. 1783-1785, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29671136/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

GOLDBERG, I.; MERKEL, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, n. 3, 2001. Disponível em: <<https://www.fbscience.com/Landmark/articles/10.2741/goldberg>>. Acesso em: 02 out. 2021.

GOLDHIRSCH, A. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, p. 2206-2223, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23917950/>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

GONG, Y. et. al. TIMP-1 Promotes Accumulation of Cancer Associated Fibroblasts and Cancer Progression. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077366>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

GREBBIN, B.; SCHULTE, D. PBX1 as Pioneer Factor: A Case Still Open. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. 9, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2017.00009/full>>. Acesso em: 13 set. 2021.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. Disponível em:

<<https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The *hallmarks* of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10647931/>>. Acesso em: 03 maio. 2021.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. *Hallmarks* of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>>. Acesso em: 03 maio. 2021.

HARRY, J.; ORMISTON, M. Novel pathways for targeting tumor angiogenesis in metastatic breast cancer. **Frontiers in oncology**, v. 11, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.772305/full>>. Acesso em: 01 abr. 2022.

HE, C. et. al. A hydrophobic residue in the TALE homeodomain of PBX1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of gastric carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p.46818-46833, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5564525/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

HEER, E.; JALVING, M.; HARRIS, A. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 10, p. 5074-5087, 2020. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/137552>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

HEIDET, L. et. al. Targeted Exome Sequencing Identifies *PBX1* as Involved in Monogenic Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 28, n. 10, p. 2901-2914, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28566479/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

HERMANOWICZ, J.; KWIATKOWSKA, I.; PAWLAK, D. Important players in carcinogenesis as potential targets in cancer therapy: an update. **Oncotarget**, v. 11, n. 32, p. 3078-3101, 2020. Disponível em: <<https://www.oncotarget.com/article/27689/text/>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

HORIGUCHI, H. et. al. Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase–phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. **Cancer Science**, v. 105, n. 12, p. 1550-1559, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317964/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

HU, K et. al. HIF-1 α upregulates ANGPTL4 to promote angiogenesis in Uveal Melanoma. **Investigative ophthalmology and visual science**, v. 56, n. 7, 2015. Disponível em: <<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2334270>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

HUILGOL, D. et. al. Transcription Factors That Govern Development and Disease: An Achilles Heel in Cancer. **Genes**, v. 10, n. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4425/10/10/794>>. Acesso em: 12 set. 2021.

HURTADO, R. et. al. Pbx1-dependent control of VMC differentiation kinetics underlies gross renal vascular patterning. **Development**, v. 142, n. 15, 2015. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/dev/article/142/15/2653/46955/Pbx1-dependent-control-of-VMC-differentiation>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer?** 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2019b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estatísticas de câncer**. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 27 jun. 2020.

ITO, Y. et. al. Inhibition of Angiogenesis and Vascular Leakiness by Angiopoietin-Related Protein 4. **Cancer research**, v. 63, n. 20, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14583458/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

IZRAELY, S. et. al. ANGPTL4 promotes the progression of cutaneous melanoma to brain metastasis. **Oncotarget**, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.oncotarget.com/article/19018/text/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

JOZWIK, K.; CARROLL, J. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 381-385, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrc3263>>. Acesso em: 13 set. 2021.

JOBIM, F. et. al. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 42, n. 10, p. 979-987, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/bjmb/a/5cKrN5GdLydjkbZbdXRXWHt/?lang=en#>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

JUNG, J. et. al. Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell Reprogramming Factor PBX1. **Cancer Research**, v. 76, n. 21, p. 6351-6361, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27590741/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

KAMPS, M. et. al. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B all. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 547-555, 1990. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(90\)90658-](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(90)90658-)

2.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867490906582%3Fshowall%3Dtrue>. Acesso em: 07 set. 2021.

KAO, J. et. al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *Plos One*, v. 4, n. 7, 2009. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006146>>. Acesso em: 17 maio. 2022.

KENNECKE, H. et. al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n.20, p. 3271-3277, 2010. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2009.25.9820>>. Acesso em: 01 jul. 2020.

KIM, H. et. al. Circulating numbers of endothelial progenitor cells in patients with gastric and breast cancer. **Cancer letters**, v. 198, n. 1, p. 83-88, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383503002684?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

KIM, J. et. al. Genetic and epigenetic inactivation of LPL gene in human prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 3, p. 734-738, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23972>>. Acesso em: 02 out. 2021.

KIM, S. et. al. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpl*^{-/-} mice promotes diabetes mellitus. **Nature Genetics**, v. 30, n. 4, p. 430-435, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11912494/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

KOLB, R. et. al. Obesity-associated inflammation promotes angiogenesis and breast cancer via angiopoietin-like 4. **Oncogene**, v. 38, p. 2351-2363, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41388-018-0592-6>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

KUBOTA-TANAKA, M. et. al. B-lymphoblastic lymphoma with *TCF3-PBX1* fusion gene. **Haematologica**, v. 104, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30262566/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

KROCK, B., SKULI, N., SIMON, M. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1117-1133, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411127/>>. Acesso em: 10 set. 2021.

KROSHINANI, H., AFSHAR, S., NAJAFI, R. Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy. **Cancer Investigation**, v. 34, n. 10, p. 536-545, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07357907.2016.1245317?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em: 10 set. 2021.

LAMBERT, M. Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1479>>. Acesso em: 12 set. 2021.

LAMBERT, S. et. al. The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 650-665, 2018a. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(18\)30106-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867418301065%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(18)30106-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867418301065%3Fshowall%3Dtrue)>. Acesso em: 12 set. 2021.

LEE, T., YOUNG, R. Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. **Cell**, v. 152, n. 6, p. 1237-1251, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413002031>>. Acesso em: 12 set. 2021.

LI, J. et. al. Triglyceride metabolism and angiopoietin-like proteins in lipoprotein lipase regulation. **Clinica Chimica Acta**, v. 503, p. 19-34, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898119321989?via%3Dihub>>. Acesso em: 02 out. 2021.

LI, W. et. al. Inhibition of non-small-cell lung cancer cell proliferation by Pbx1. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 26, n. 5, p. 573-578, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25400423/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

LIABOTS, A. et. al. Angiopoietin-like 4-Induced 3D Capillary Morphogenesis Correlates to Stabilization of Endothelial Adherens Junctions and Restriction of VEGF-Induced Sprouting. **Biomedicines**, v. 10, n. 206, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35203415/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

LIU, Y. et. al. Regulatory elements can be essential for maintaining broad chromatin organization and cell viability. **Nucleic Acids research**, v. 50, n. 8, p. 4340-4354, 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/50/8/4340/6564807>>. Acesso em: 24 maio. 2022.

LIU, Y. et. al. The regulation of PBXs and their emerging role in cancer. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 26, n. 5, p. 1363-1379, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.17196>>. Acesso em: 30 maio. 2022.

MA, T. et. al. Viral G protein-coupled receptor up-regulates Angiopoietin-like 4 promoting angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660728/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

MADU, C. et. al. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnostics and treatment. **Journal of cancer**, v. 11, n. 15, p. 4474-4494, 2020. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7255381/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

MAJ, E., PAPIERNIK, D., WIETRZYK, J. Antiangiogenic cancer treatment: the great discovery and greater complexity. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 5, p. 1773-1784, 2016. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3709?text=fulltext>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

MAGNANI, L. et. al. PBX1 Genomic Pioneer Function Drives ER α Signaling Underlying Progression in Breast Cancer. **Plos Genetics**, v. 7, n. 11, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002368>>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MAGNANI, L. et. al. The pioneer factor PBX1 is a novel driver of metastatic progression in ER α -positive breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 21878-21891, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26215677/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

MAGNANI, L.; LUPIEN, M. Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 633-641, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720713002037?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 set. 2021.

MASUDA, T. et. al. ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. **Scientific reports**, v. 5, n. 9170, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep09170>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

MASUDA, T. et. al. Anti-HER2 antibody therapy using gene-transduced adipocytes for HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer research treatment**, v. 180, n. 3, p. 625-634, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32124135/>>. Acesso em: 13 maio. 2022.

MCKEOWN, S. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. **The British Journal of Radiology**, v. 87, n. 1035, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24588669/>>. Acesso em: 10 set. 2021.

MELINCOVICI, C. et. al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology Embryology**, v. 59, n. 2, p. 455-467, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30173249/>>. Acesso em; 23 ago. 2021.

MILLER, K. et. al. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel alone for metasatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, n. 357, p. 2666-2676, 2007. Disponível em:

<<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa072113>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

MOCELLIN, S.; PROVENZANO, M. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. **Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 39, 2004. Disponível em: <<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-2-39>>. Acesso em: 11 maio. 2022.

MONICA, K. et. al. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. **Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 6149-6157, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC361792/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

MORGAN, R. et. al. Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. **Cancer research**, v. 67, n. 12, p. 5806-5813, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17575148/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

MORGAN, R. et. al. Targeting the HOX/PBX dimer in breast cancer. **Breast Cancer Research and treatment**, v. 136, n. 2, p. 389-398, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23053648/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

MUGGEO, S. et. al. PBX1-directed stem cell transcriptional program drives tumor progression in myeloproliferative neoplasm. **Stem cell reports**, v. 16, p. 2607-2616, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34678207/>>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MUKHERJEE, A. et. al. Recent advancements of nanomedicine towards antiangiogenic therapy in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 21, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31936832/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cardiovascres/article/69/3/562/272258?login=false>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

NAKAMURA, K. et. al. Aberrant Methylation of GCNT2 Is Tightly Related to Lymph Node Metastasis of Primary CRC. **Anticancer Research**, v. 35, n. 3, 2015. Disponível em: <<https://ar.iijournals.org/content/35/3/1411.long>>. Acesso em: 23 set. 2021.

NAKAYAMA, T. et. al. Expression of angiopoietin-like 4 in human gastric cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion. **Oncology reports**, v. 24, n. 3, p. 599-606, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20664963/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

NAKAYAMA, T. et. al. Expression of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in human colorectal cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion and distant metastasis. **Oncology reports**, v. 25, n. 4, p. 929-935, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21308352/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

NAKOPOULOU, L. et. al. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, v. 111, n. 11, p. 1027-1036, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0463.2003.apm1111105.x?sid=nlm%3Apubmed>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

NOURSE, J. et. al. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 535-545, 1990. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(90\)90657-Z.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749090657Z%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(90)90657-Z.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749090657Z%3Fshowall%3Dtrue)>. Acesso em: 07 set. 2021.

OKOCHI-TAKADA, E. et. al. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. **Oncogene**, v. 33, p. 2273-2278, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/onc2013174>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

OMIM. **PRE-B-CELL LEUKEMIA TRANSCRIPTION FACTOR 1; PBX1**. 2022. Disponível em: <<https://omim.org/entry/176310>>. Acesso em: 14 abr. 2022.

O'SULLIVAN, B. et. al. The TNM classification of malignant tumours – towards common understanding reasonable expectations. **Lancet Oncology**, v. 18, n. 7, p. 849-851, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5851445/>>. Acesso em: 13 maio. 2022.

PARKER, J. et. al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of clinical oncology**, n. 27, v. 8, p. 1160-1167, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2667820/>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

PAULSSON, J. et. al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor β -receptor expression in human breast cancer. **The american journal of pathology**, v. 175, n. 1, p. 334-341, 2009. Disponível em: <[https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(10\)60548-2/fulltext](https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(10)60548-2/fulltext)>. Acesso em: 24 ago. 2021

PENG, F. et. al. GCNT2 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma cells. **Cellular biochemistry and function**, v. 37, n. 1, p. 42-51, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30575058/>>. Acesso em: 23 set. 2021.

PEZZUTO, A.; CARICO, E. Role of HIF-1 in cancer progression: novel insights. A review. **Current molecular medicine**, v. 18, n. 6, p. 343-351, 2018.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30411685/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

PI, W. et. al. E2A-PBX1 functions as a coactivator for RUNX1 in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 136, n. 1, p. 11-23, 2020. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/136/1/11/454360/E2A-PBX1-functions-as-a-coactivator-for-RUNX1-in>>. Acesso em: 13 set. 2021.

PINTO, M. et. al. Malignant stroma increases luminal breast cancer cell proliferation and angiogenesis through platelet-derived growth factor signaling. **BMC Cancer**, v. 14, n. 735, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190420/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

PRAT, A. et. al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 68, p.1-18, set. 2010. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2635>>. Acesso em: 03 jul. 2020.

PROVENZANO, E.; ULANER, G.; CHIN, S. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 325-338, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30100073/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

PROVENZANO, P. et. al. Mammary Epithelial-Specific Disruption of Focal Adhesion Kinase Retards Tumor Formation and Metastasis in a Transgenic Mouse Model of Human Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 5, p. 1551-1565, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570144/>>. Acesso em: 02 out. 2021.

QUINTERO-FÁBIAN, S. et. al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 9, n. 1370, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01370/full#B199>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

RAKHA, E. et. al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast cancer research**, v. 12, n. 207, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20804570/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

REED, M. et. al. Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis in vivo and cell migration in vitro. **Microvascular research**, v. 65, n. 1, p. 9-17, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12535866/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

REIS, S. et. al. Polymorphism in the PBX1 gene is related to cystinuria in Brazilian families. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 2, p.

1593-1597, 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30450686/>>. Acesso em: 13 set. 2021.

ROJAS, K.; STUCKEY, A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors.

Clinical Obstetrics and Gynecology, v. 59, n. 4, p. 651–672, 2016. Disponível em:

<https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Abstract/2016/12000/Breast_Cancer_Epidemiology_and_Risk_Factors.3.aspx>. Acesso em: 14 jul. 2020.

ROJIANI, M. et. al. TIMP-1 overexpression in lung carcinoma enhances tumor kinetics and angiogenesis in brain metastasis. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 74, n. 4, p. 293-304, 2015. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25756591/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

ROSLAN, N. et. al. TPD52 represents a survival factor in ERBB2-amplified breast cancer cells. **Molecular carcinogenesis**, v. 53, n. 10, p. 807-819, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23661506/>>. Acesso em: 23 set. 2021.

ROZOVSKI, U. et. al. Metabolism pathways in chronic lymphocytic leukemia.

Leukemia & Lymphoma, v. 57, n. 4, 2015. Disponível em: <

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2015.1106533?journalCode=ilal20>>. Acesso em: 02 out. 2021.

RUAN, K., SONG, G., OUYANG, G.. Role of hypoxia in the *hallmarks* of human cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 6, p. 1053-1062, 2009.

Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jcb.22214>>.

Acesso em: 10 set. 2021.

SA-NGUANRASKA, D.; O-CHAROENRAT, P. The Role of *Vascular Endothelial Growth Factor A* Polymorphisms in Breast Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, 2012. Disponível em:

<<https://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/14845>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

SANTULLI, G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, n. 4, 2014. Disponível em: <

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2014.00004/full#B51>>.

Acesso em: 15 abr. 2022.

SAPONARO, C. et. al. VEGF, HIF-1a Expression and MVD as an Angiogenic Network in Familial Breast Cancer. **Plos One**, v. 8, n. 1, 2013. Disponível em: <

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053070>>.

Acesso em: 15 abr. 2022.

SAWAKI, M.; SHIEN, T.; IWATA, H. TNM classification of malignant tumors (breast cancer study group). **Japanese journal of clinical oncology**, v. 49, n. 3, p. 228-231, 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30541035/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

SELLERI, L. et. al. Requirement for *Pbx1* in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. **Development**, v. 128, n. 18, p. 3543-3557, 2001. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/dev/article/128/18/3543/41409/Requirement-for-Pbx1-in-skeletal-patterning-and>>. Acesso em: 07 set. 2021.

SENGER, D. Vascular Endothelial Growth factor: much more than an angiogenesis factor. **Molecular Biology of Cell**, n. 23, n. 1, p. 377-379, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2814783/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

SHAH, N. et. al. PBX1 is a favorable prognostic biomarker as it modulates 13-cis retinoic acid-mediated differentiation in neuroblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 16, p. 4400-4412, 2014. Disponível em: <>. Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24947929/>

SHAHI, P., LOVELLE, A.; MANGA, G. Tumoral angiogenesis and breast cancer. **Clin Transl Oncology**, v. 11, p. 138-142, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19293050/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

SHIRAISHI, K. et. al. Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. **Oncogene**, v. 26, p. 339-348, 2007. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/1209800>>. Acesso em: 13 set. 2021.

SHIRAKAWA, K. et. al. Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *British Journal of Cancer*, v. 87, p. 1454-1461, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/6600610>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

SIEGEL, R. et. al. Cancer Statistics, 2022. **CA: A cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 1, p.7-33. Disponível em: <<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21708>>. Acesso em: 01 abr. 2022.

SONG, G. et. al. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 35, n. 138, 2016. Disponível em: <<https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-016-0427-7>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

SORLIE, T. et. al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v.98, n.19, p.10869–10874, set. 2001. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/98/19/10869>>. Acesso em: 01 jul. 2020.

SORLIE, T. et. al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v.100, n.4,

p.8418-8423, jul. 2003. Disponível em:

<<https://www.pnas.org/content/100/14/8418>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

STANKUNAS, K. et. al. Pbx/Meis deficiencies demonstrate multigenetic origins of congenital heart disease. **Circulation research**, v. 103, n. 7, p. 702-709, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18723445/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

SUBIK, K. et. al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. Breast Cancer: **Basic and Clinical Research**, v. 4, p.35-41, 2010. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/117822341000400004>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

SUNG, H. et. al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>>. Acesso em: 14 maio. 2021.

TAN, M. et. al. Emerging roles of angiopoetina-like 4 in human cancer. **Molecular cancer research**, v. 10, n. 6, p. 677-688, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661548/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

TENNSTED, P. et. al. Patterns of TPD52 overexpression in multiple human solid tumor types analyzed by quantitative PCR. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 2, p. 609-615, 2014. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2013.2200>>. Acesso em: 02 out. 2021.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. **PTK2**. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169398-PTK2>>. Acesso em: 01 out. 2021.

TSANG, J.; TSE, G. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045583/>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

UMMANI, R. et. al. Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells. **The Febs Journal**, v. 275, n. 22, p. 5703-5713, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18959755/>>. Acesso em: 02 out. 2021.

VALTOLA, R. et. al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. **American Journal of pathology**, v. 154, n. 5, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10329591/#:~:text=VEGF%2DC%20was%20located%20in,blood%20vessels%20in%20breast%20cancer.>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

VASUDEV, N.; REYNOLDS, A. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v. 17, p. 471-494, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24482243/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

VEIGA, R.; DE CARVALHO, J.; GRADIA, D. PBX1: a key character of the *hallmarks* of cancer. **Journal of Molecular Medicine**, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-021-02139-2>>. Acesso em: 19 set. 2021.

VESELKA, R. et. al. Comparative Analysis of Putative Prognostic and Predictive Markers in Neuroblastomas: High Expression of PBX1 Is Associated With a Poor Response to Induction Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 1221, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01221/full>>. Acesso em: 21 set. 2021.

VILLAESCUSA, J. et. al. A PBX1 transcriptional network controls dopaminergic neuron development and is impaired in Parkinson's disease. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 18, p. 1963-1978, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27354364/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

WAISBERG, J. et. al. Overexpression of the *ITGAV* Gene Is Associated with Progression and Spread of Colorectal Cancer. *Anticancer research*, v. 34, n. 10, p. 5599-5607, 2014. Disponível em: <<https://ar.iiarjournals.org/content/34/10/5599.long>>. Acesso em: 22 set. 2021.

WANG, J. et. al. Lipid Metabolism Genes in Contralateral Unaffected Breast and Estrogen Receptor Status of Breast Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/content/6/4/321.full-text.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2021.

WANG, J. et. al. Overexpression of lipid metabolism genes and PBX1 in the contralateral breasts of women with estrogen receptor-negative breast cancer. **International Journal of cancer**, v. 140, n. 11, p. 2484-2949, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28263391/> >. Acesso em: 22 set. 2021.

WANG, J. et. al. Development and validation of a hypoxia-related prognostic signature for breast cancer. **Oncology letters**, v. 20, n. 2, p. 1906-1914, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32724434/>>. Acesso em: 23 set. 2021.

WANG, Z. et. al. Silencing of TPD52 inhibits proliferation, migration, invasion but induces apoptosis of pancreatic cancer cells by deactivating Akt pathway. **Neoplasia**, v. 67, n. 2, p. 277-285, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31847526/>>. Acesso em: 23 set. 2021.

WEI, X., YU, L., LI, Y. PBX1 promotes the cell proliferation via JAK2/STAT3 signaling in clear cell renal carcinoma. **Biochemistry and biophysical**

research communications, v. 500, n. 3, p.650-657, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29678569/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

WEISSER, M. et. al. *PTK2* expression and immunochemotherapy outcome in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 124, n. 3, p. 420-425, 2014. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/124/3/420/33129/PTK2-expression-and-immunochemotherapy-outcome-in>>. Acesso em: 02 out. 2021.

WELSH, I. et. al. Pbx loss in cranial neural crest, unlike in epithelium, results in cleft palate only and a broader midface. **Journal of Anatomy**, v. 233, n. 2, p. 222-242, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6036936/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

WISNIEWSKI, J.; GAUGAZ, F. Fast and Sensitive Total Protein and Peptide Assays for Proteomic Analysis. **Analytical chemistry**, v. 87, p. 4110-4116, 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac504689z>>. Acesso em> 06 abr. 2022.

WON, K. & SPRUCK, C. Triple-negative breast cancer therapy: current advances and future perspectives (review). **International Journal of oncology**, v. 57, n. 6, p. 1245-1261, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33174058/>>. Acesso em: 13 maio. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global health estimates: Leading causes of death**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

WU, H. et. al. FAK signaling in cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell migration and metastasis by exosomal miRNAs-mediated intercellular communication. **Oncogene**, v. 38, p. 2539-2549, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41388-020-1162-2>>. Acesso em: 02 out. 2021.

XIAO, X. et. al. Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the tumor growth of ovarian cancer cell line derived from a low-grade papillary serous carcinoma in p53-independent pathway. **BMC Cancer**, v. 16, n. 582, 2016. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2617-2>>. Acesso em: 30 maio. 2022.

YANG, G., SHI, R., ZHANG, Q. Hypoxia and Oxygen-Sensing Signaling in Gene Regulation and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8162/htm>>. Acesso em: 10 set. 2021.

YI, L. et. al. Circ-PTK2 promotes the proliferation and suppressed the apoptosis of acute myeloid leukemia cells through targeting miR-330-5p/FOXO1 axis. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 86, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126007/>>. Acesso em: 01 out. 2021.

YU, S. et. al. Development and clinical application of anti-HER2 monoclonal and bispecific antibodies for cancer treatment. **Experimental hematology & oncology**, v. 6, n. 31, 2017. Disponível em: <<https://ehoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40164-017-0091-4>>. Acesso em: 13 maio. 2022.

ZHANG, H. et. al. Engagement of I-Branching β -1, 6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase 2 in Breast Cancer Metastasis and TGF- β Signaling. **Molecular and Cellular Pathobiology**, v. 71, n. 14, 2011. Disponível em: <<https://cancerres.aacrjournals.org/content/71/14/4846.full-text.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2021.

ZHANG, H. et. al. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. **Oncogene**, v. 31, n. 14, p. 1757-1770, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21860410/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

ZHANG, L. et. al. MiR-520d-5p functions as a tumor-suppressor gene in cervical cancer through targeting PTK2. **Life Sciences**, v. 254, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32198053/>>. Acesso em: 01 out. 2021.

ZHANG, L. et. al. Analysis of Clinical Features and Outcome of 356 Triple-Negative Breast Cancer Patients in China. **Breast Care**, v. 7, p. 13-17, 2012. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/336539>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

ZHAO, J. et. al. ANGPTL4 overexpression is associated with progression and poor prognosis in breast cancer. **Oncology letters**, v. 20, n. 3, 2020. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.11768>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

ZHAO, Y. et. al. PBX1 participates in estrogen-mediated bladder cancer progression and chemo-resistance affecting estrogen receptors. **Currently cancer drug target**, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35422219/>>. Acesso em: 17 maio. 2022.

ZHOU, Z.; YAO, H.; HU, H. Disrupting Tumor Angiogenesis and “the hunger games” for breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1026, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29282684/>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

ZHU, J. et. al. MEIS1 inhibits clear cell renal cell carcinoma cells proliferation and in vitro invasion or migration. **BMC Cancer**, v. 17, n. 176, 2017. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3155-2>>. Acesso em: 14 abr. 2022.