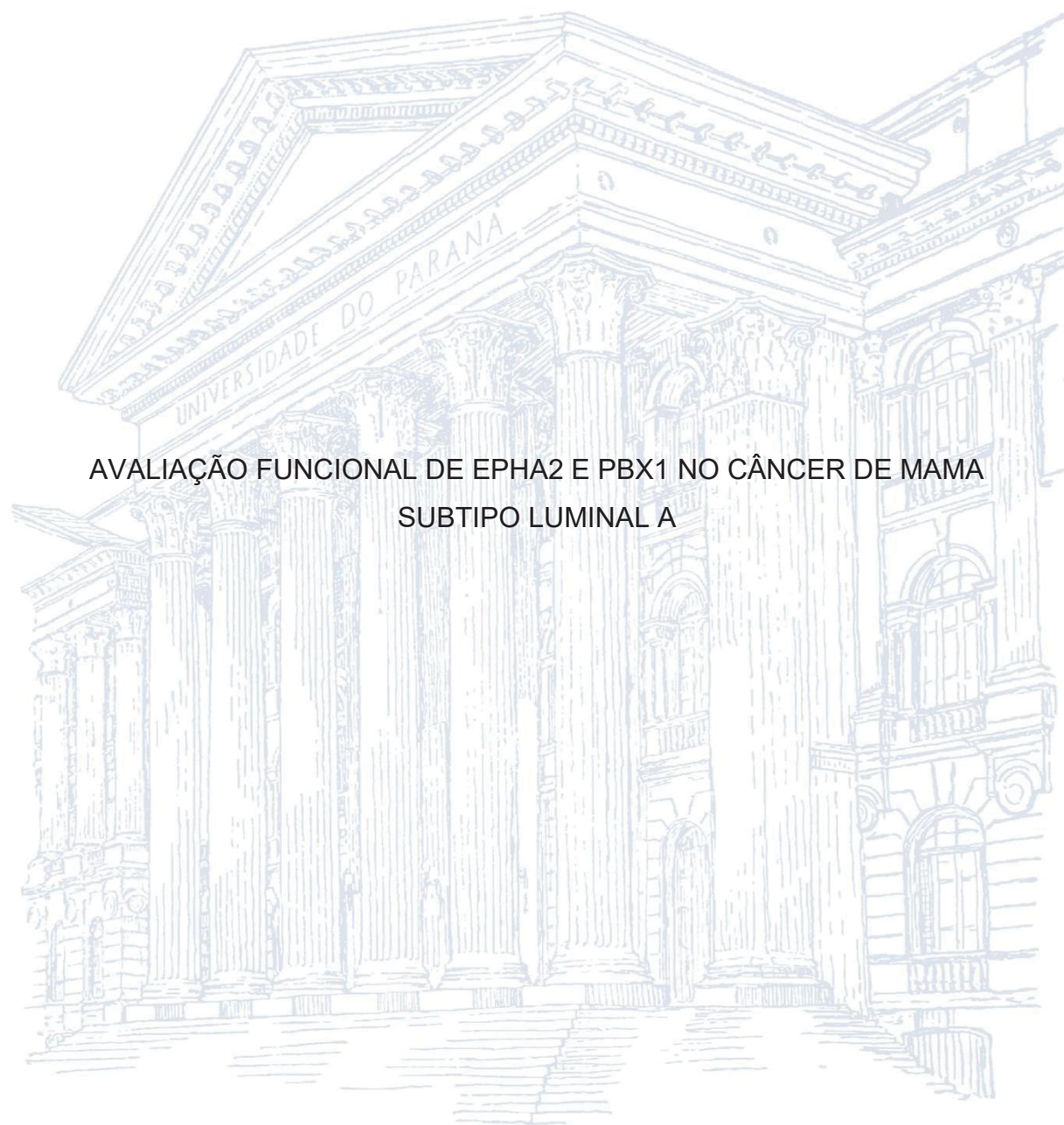


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA NASSER VEIGA



AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE EPHA2 E PBX1 NO CÂNCER DE MAMA
SUBTIPO LUMINAL A

CURITIBA

2022

RAFAELA NASSER VEIGA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE EPHA2 E PBX1 NO CÂNCER DE MAMA
SUBTIPO LUMINAL A

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Fiori Gradia

Coorientadores: Prof^a Dr^a Jaqueline Carvalho de Oliveira e Prof. Dr. Mauro Antonio Alves Castro

CURITIBA

2022

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

Veiga, Rafaela Nasser

Avaliação funcional de EPHA2 e PBX1 no câncer de mama
subtipo luminal A / Rafaela Nasser Veiga. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética.

Orientadora: Profa Dra Daniela Fiori Gradia.

Coorientadores: Profª Drª Jaqueline Carvalho de Oliveira e
Prof. Dr. Mauro Antonio Alves Castro.

1. Mamas - Câncer. 2. Tamoxifeno. 3. Receptor EphA2. 4.
Sistemas CRISPR-Cas. I. Gradia, Daniela Fiori, 1971-. II. Oliveira,
Jaqueline Carvalho de. III. Castro, Mauro Antônio Alves. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-graduação em Genética. V. Título.



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 tese de Doutorado de **RAFAELA NASSER VEIGA** intitulada: **Avaliação funcional de EphA2 e PBX1 no câncer de mama subtipo luminal A**, 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 doutora 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, 20 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

21/12/2022 16:36:48.0

DANIELA FIORI GRADIA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/12/2022 16:28:59.0

LUIZ CLAUDIO FERNANDES

Avaliador Externo (40001016)

Assinatura Eletrônica

22/12/2022 11:00:08.0

ÉRIKA PEREIRA ZAMBALDE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Assinatura Eletrônica

21/12/2022 10:43:29.0

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2022 11:12:53.0

JAQUELINE CARVALHO DE OLIVEIRA

Coorientador(a) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2022 11:22:45.0

MAURO ANTONIO ALVES CASTRO

Coorientador(a) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, hoje e sempre, pela vida e pelos aprendizados.

À Universidade Federal do Paraná, minha segunda casa, por todo o aprendizado técnico e científico, da graduação ao doutorado; mas, sobretudo, pela formação pessoal. Durante a minha passagem na UFPR, meu olhar para o mundo mudou. Que bom!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pelo desenvolvimento do pensamento crítico e pela oportunidade que me deu em trabalhar com o que amo. À CAPES, pelo apoio financeiro, que possibilitou a execução desse trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Daniela Fiori Gradia, que me propôs um desafio pelo qual eu sou imensamente grata e apaixonada: trabalhar com cultivo celular, biologia molecular e CRISPR/Cas9. Obrigada por esse lindo projeto e pela orientação em todas as etapas. Agradeço também o acolhimento em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Agradeço a ajuda em encontrar soluções, mesmo com uma pandemia tomando metade do período do doutorado, para reduzir o impacto inevitável no projeto. A todas as puxadas de orelha e a todas as perguntas, mesmo que você já sabia a resposta, só para exercitar meu raciocínio e me ensinar a pesquisar. Enfim, agradeço a confiança depositada em mim.

À minha coorientadora, Prof. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira, por todo o acolhimento, todas as correções e por toda a orientação, principalmente com os ensaios funcionais. Também por todos os áudios e mensagens visualizados e respondidos, mesmo a noite e nos fins de semana, quando eu precisava de ajuda e estava sozinha no laboratório.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Mauro Antônio Alves Castro, que confiou a mim esse trabalho, que nasceu no Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, sob sua orientação. Obrigada pela paciência ao lidar com a minha falta de conhecimento em bioinformática.

Aos demais professores que foram importantes para minha formação, seja como docentes em disciplinas cursadas, seja no dia a dia de bancada. Um agradecimento em especial para a Prof. Dra. Ana Cláudia Bonatto, que não

apenas cedeu seu laboratório, reagentes, insumos e equipamentos para que eu pudesse executar parte dos meus ensaios, mas também me orientou nas etapas de clonagem e sequenciamento.

À Prof. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, por toda a paciência, todas as correções e todo o ensinamento.

À Isabela Tiemy Pereira, por todo ensinamento teórico e prático. Sem você esse CRISPR não teria saído.

À Ana Luiza Mattana, pela ajuda no preparo de materiais, mas, principalmente, pelas conversas que me mantinham sã em momentos de estresse acumulado. E pelas conversas sobre livros, nossa paixão em comum.

À Ana Carolina Rodrigues, a prodígio a quem eu sempre recorria quando não sabia mais o que estava fazendo. Mas, sobretudo, pela amizade, pelas conversas e pela luta por um gel decente de *western blotting*.

Aos demais colegas de laboratório, do time LabCHO e do time do diagnóstico de COVID-19, do qual orgulhosamente fiz parte, mesmo que por um breve período. Agradeço o companheirismo e a parceria.

Aos meus amigos, que ainda não desistiram de mim, e continuam perguntando toda semana se eu vou para o bar, se eu vou para a festa e quando eu termino o doutorado, mesmo sabendo que a resposta vai ser: calma, ainda não dá, estou escrevendo a Tese! E eu sempre sei o que eles vão dizer de volta: a doutoranda está perdoada, mas a vida não é só trabalho, Rafa!

À minha família. Aquela na qual eu nasci, e aquela que eu ganhei quando conheci meu companheiro. Agradeço o apoio inabalável, as palavras motivacionais, os abraços apertados e a melhor torcida que eu poderia ter. Obrigada por toda compreensão em todos os fins de semana que não estive presente, porque estava ou no laboratório, ou escrevendo.

Ao Caetano, meu companheiro e maior incentivador. Você é aquele que diz que vai ficar tudo bem porque você faz ficar tudo bem. Agradeço pelo seu apoio, pelo seu cuidado, e pelo seu amor. Obrigada pelos abraços, pelos colos e por acreditar (teimosamente) em mim. No exato momento que escrevo essa frase é 1:17, da madrugada de domingo para segunda-feira, você está aqui, acordado do meu lado. Te amo.

Tudo que existe, existe talvez porque outra coisa existe.

Nada é, tudo coexiste: talvez assim seja certo.

Fernando Pessoa, *Livro do Desassossego*

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente no mundo. Dentre os subtipos imunoistoquímicos de carcinomas mamários, o luminal A é o mais comum. Além dos tratamentos tradicionais com cirurgia, quimioterapia e radioterapia, pacientes com esse subtipo tumoral se beneficiam com a terapia alvo endócrina, sendo que o tamoxifeno é um dos principais medicamentos prescritos. Entretanto, durante a terapia contínua e prolongada, é comum surgirem células tumorais resistentes ao tamoxifeno. Dessa forma, encontrar novos alvos terapêuticos e desenvolver novas terapias-alvo para tumores refratários é essencial para a manutenção de um tratamento eficiente. O receptor tipo 2 de fatores de crescimento fibroblástico (FGFR2) está associado com o câncer de mama luminal. A partir de análises *in silico*, duas proteínas envolvidas no interatoma de FGFR2 foram apontadas como potenciais moduladoras da sensibilidade ao tamoxifeno: EphA2 e PBX1. EphA2 é um receptor tirosina quinase que é comumente encontrado super expresso em diversos tumores e é associado à progressão tumoral. Esse receptor também vem sendo associado com a resistência a quimioterápicos, terapia-alvo e radioterapia. O PBX1 é um fator de transcrição pioneiro que já foi associado com o desenvolvimento e a progressão de diversos tipos de câncer e, apesar de não serem numerosos, alguns estudos indicam que PBX1 possui um papel no desenvolvimento da resistência à terapia. Dessa forma, a tecnologia CRISPR/Cas9 e o silenciamento gênico com siRNA foram utilizados para avaliar o papel dessas proteínas na resistência ao tamoxifeno. Ainda, outras análises funcionais foram conduzidas para aumentar a compreensão integral de como essas proteínas impactam na fisiologia de células de câncer de mama luminal A. Neste trabalho, EphA2 foi associado a redução da viabilidade e da proliferação celular. Porém, ele também foi relacionado com o aumento da capacidade clonogênica e da resistência ao tamoxifeno. Assim, sugere-se que o EphA2 atua como um supressor de tumor nos estágios iniciais de câncer de mama luminal A, mas, com a progressão tumoral, ele passa a exercer papéis oncogênicos fundamentais no processo metastático e no desenvolvimento de resistência à terapia. Para encontrar inibidores de EphA2 que neutralizem sua ação oncogênica, primeiramente é preciso investigar os mecanismos pelos quais EphA2 atua como supressor de tumor ou como oncoproteína em câncer de mama luminal. Em relação ao PBX1, este foi associado com o aumento da viabilidade celular, da capacidade clonogênica e da resistência ao tamoxifeno em MCF7, mas não em ZR-75-1, possivelmente em razão das diferenças nos programas transcricionais regulados por PBX1 em cada linhagem. Apesar do PBX1 ser um conhecido oncogene, ele pode atuar de modo diferente em um mesmo subtipo oncológico. Sendo assim, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de atuação de PBX1 em câncer de mama luminal A devem ser conduzidos para validar essa proteína como um potencial alvo terapêutico.

Palavras-chave: Câncer de mama. Tamoxifeno. EphA2. PBX1. CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in the world. Among the immunohistochemical subtypes of breast carcinomas, luminal A is the most common. In addition to traditional treatments such as surgery, chemotherapy and radiotherapy, patients with this tumor subtype benefit from endocrine-targeted therapy, with tamoxifen being one of the main prescribed drugs. However, during continuous and prolonged therapies, it is common for tamoxifen-resistant tumor cells to appear. Therefore, finding new therapeutic targets and developing new target therapies for refractory tumors is essential for maintaining an efficient treatment. Fibroblast growth factor receptor type 2 (FGFR2) is associated with luminal breast cancer. Through *in silico* analysis, two proteins involved in the FGFR2 interactome were identified as potential modulators of the sensitivity to tamoxifen: EphA2 and PBX1. EphA2 is a tyrosine kinase receptor that is commonly overexpressed in many tumors, and is associated with tumor progression. This receptor has also been associated with resistance to chemotherapy, targeted therapy and radiotherapy. PBX1 is a pioneer transcription factor that has been associated with the development and progression of several types of cancer and, although not numerous, some studies indicate that PBX1 has a role in the development of resistance to therapy. In this study, the CRISPR/Cas9 technology and gene silencing with siRNA were used to evaluate the role of these proteins in tamoxifen resistance. Furthermore, other functional analyses were conducted to deepen the understanding of how these proteins impact the physiology of luminal A breast cancer cells. In this work, EphA2 was associated with reduced cell viability and proliferation, although it was also related to an increased clonogenic capacity and tamoxifen resistance. Because of that, it is suggested that EphA2 acts as a tumor suppressor in the early stages of luminal A breast cancer, but with tumor progression it begins to play key oncogenic roles in the metastatic process and in the development of resistance to therapy. In order to find EphA2 inhibitors that neutralize its oncogenic action, it is first necessary to investigate the mechanisms through which EphA2 acts as a tumor suppressor or as an oncoprotein in luminal breast cancer. Regarding PBX1, it was associated with increased cell viability, clonogenic capacity and resistance to tamoxifen in MCF7, but not in ZR-75-1 — possibly due to differences in transcriptional programs regulated by PBX1 in each cell line. Although PBX1 is a known oncogene, it can act differently in the same oncological subtype. Therefore, more in-depth studies on the mechanisms of action of PBX1 in luminal A breast cancer should be conducted to validate this protein as a potential therapeutic target.

Key-words: Breast Cancer. Tamoxifen. EphA2. PBX1. CRISPR/Cas9.

LISTA DE SIGLAS

ACS: *American Cancer Society*

Cas9: *CRISPR associated protein 9*

Cas9n: *Cas9 nickase*

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DSRE: Degradadores seletivos do receptor de estrogênio

Eph: *Erythropoietin-producing hepatocelular*

EPHA2: *Erythropoietin-producing hepatocellular A2 receptor*

ER: *Estrogen receptor*

ER α : *Estrogen receptor alpha*

ER+: *Estrogen Receptor Positive*

EUA: Estados Unidos da América

EXO I: Exonuclease I

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FBS: *Fetal bovine serum*

FGFR2: *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*

GFP: *Green fluorescent protein*

gRNA: RNA guia

HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

HER2+: HER2 positivo

ICC: Instituto Carlos Chagas

INCA: Instituto Nacional de Câncer

Indel: Inserção e/ou deleção

LIPB: Laboratório de Interação Planta-Bactéria

MSRE: Moduladores seletivos do receptor de estrogênio

NC: *negative control*, siRNA controle negativo universal (SIC001, Merck)

NHEJ: *Non-homologous end joining*

PBX1: *Pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PDX: *Patient derived xenograft*

PF: *Pioneer transcription factor*

PR: Receptor de progesterona

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*

RFP: *Red fluorescent protein*

RT: *Reverse transcription*

SAP: *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

siPBX1: siRNA SASI Hs01_00154081/PBX1, Merck

SNP: *single-nucleotide polymorphism*

STK4: Serina/treonina quinase 4

TBST: *Tris Buffered Saline with Tween® 20*

TF: *Transcription factor*

UFPR: Universidade Federal do Paraná

WB: *Western Blotting*

WT: *Wild type*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura geral dos receptores Eph e seus ligantes efrinas.....	30
Figura 2: Estrutura do gene <i>EPHA2</i>	30
Figura 3: Estrutura do gene <i>PBX1</i>	33
Figura 4: Atuação de um fator pioneiro	33
Figura 5: Protocolo de transfecção reversa.....	37
Figura 6: Exemplo de mecanismo de edição gênica causada após atuação da via NHEJ	38
Figura 7: Clivagem em ambas as fitas de DNA por meio de um par de gRNA guiando duas Cas9n.	39
Figura 8: Diagrama do plasmídeo pX461	40
Figura 9: Etapas para a construção dos plasmídeos carregando as sequências dos gRNAs	41
Figura 10: Transformação de bactérias competentes e extração do DNA plasmidial	44
Figura 11: Transfecção dos vetores e seleção clonal via FACS	45
Figura 12: Estratégia de PCR para triagem dos clones com maior potencial de edição.....	47
Figura 13: Base do método da resazurina	57
Figura 14: Imagem da microscopia de fluorescência de células da linhagem MCF7 transfectadas com os plasmídeos PX461 e PX461 modificado, carregando as sequências para os gRNAs cujo alvo é o gene <i>EPHA2</i>	92
Figura 15: Imagem da microscopia de fluorescência, após seleção clonal, de uma célula da linhagem MCF7 transfectada com os plasmídeos PX461 e PX461 modificado, carregando as sequências para os gRNAs cujo alvo é o gene <i>EPHA2</i>	93
Figura 16: Exemplo de gel de eletroforese para triagem de clones potencialmente editados para o gene <i>EPHA2</i>	94
Figura 17: Edição gênica e alteração peptídica no clone <i>EPHA2</i> #6	97
Figura 18: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene <i>EPHA2</i> e das células MCF7 em diferentes tempos de cultivo	99
Figura 19: Proliferação celular mensurada a partir do método colorimétrico com cristal violeta, comparando o número de células <i>EPHA2</i> #6 e de células MCF7 wt em diferentes tempos de cultivo	100
Figura 20: Comparação da capacidade clonogênica das células <i>EPHA2</i> #6 e das células não-editadas.....	102
Figura 21: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene <i>EPHA2</i> e das células MCF7 wt em 72 e 96 horas de tratamento com diferentes concentrações de tamoxifeno.....	103
Figura 22: Níveis de expressão relativos de mRNA de <i>PBX1</i> após 48h decorrentes da transfecção de siPBX1 e NC	124

Figura 23: Níveis de expressão relativa de PBX1 após 24, 48 e 72 horas após a transfecção de siPBX1 e NC	125
Figura 24: Exemplo de gel de eletroforese para triagem de clones potencialmente editados para o gene <i>PBX1</i>	127
Figura 25: Edição gênica e alteração peptídica no clone PBX1 #1	130
Figura 26: Viabilidade celular relativa após silenciamento do gene <i>PBX1</i> nas células MCF7 e ZR-75-1 em diferentes tempos de cultivo	131
Figura 27: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene <i>PBX1</i> e das células MCF7 selvagens em diferentes tempos de cultivo	132
Figura 28: Proliferação celular mensurada a partir do método colorimétrico com cristal violeta, comparando o número de células MCF7 (à esquerda) e ZR-75-1 (à direita) tratadas com siPBX1 ou NC em diferentes tempos de cultivo	133
Figura 29: Proliferação celular comparando o número de células PBX1 #1 e de células MCF7 wt em diferentes tempos de cultivo	134
Figura 30: Capacidade clonogênica após o silenciamento de <i>PBX1</i>	135
Figura 31: Comparação da capacidade clonogênica das células PBX1 #1 e das células não-editadas	136
Figura 32: Viabilidade celular relativa das células transfectadas com NC ou siPBX1 e tratadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.....	137
Figura 33: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene <i>PBX1</i> e das células MCF7 wt em 72 e 96 horas de tratamento com diferentes concentrações de tamoxifeno.....	138
Figura 34: Expressão relativa de <i>CD44</i> em células com <i>PBX1</i> silenciado ou editado	140
Figura 35: Expressão relativa de <i>CD46</i> em células com <i>PBX1</i> silenciado ou editado	141
Figura 36: Expressão relativa de <i>CDKN1A</i> em células com <i>PBX1</i> silenciado ou editado	142
Figura 37: Expressão relativa de <i>SPINT2</i> em células com <i>PBX1</i> silenciado ou editado	143
Figura 38: Expressão relativa de <i>STK4</i> em células com <i>PBX1</i> silenciado ou editado	144

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação imunoistoquímica do câncer de mama	24
Quadro 2: Lista das sequências de oligonucleotídeos, para a construção dos gRNAs de reconhecimento dos genes <i>EPHA2</i> E <i>PBX1</i> , utilizadas para a clonagem nos vetores PX461 e PX461 modificado.....	42
Quadro 3: <i>Primers</i> utilizados para a confirmação de inserção dos oligos nos vetores por PCR e por sequenciamento	44
Quadro 4: Estratégias de transfecção dos plasmídeos	45
Quadro 5: Lista de <i>primers</i> utilizados para as qPCRs.....	54
Quadro 6: Resumo das informações obtidas a partir dos géis de eletroforese, e as estratégias escolhidas para o sequenciamento dos clones <i>EPHA2</i> #1 a <i>EPHA2</i> #16.....	95
Quadro 7: Efeitos das edições nas sequências de DNA dos clones <i>EPHA2</i> editados.....	96
Quadro 8: Resumo das informações obtidas a partir dos géis de eletroforese, e as estratégias escolhidas para o sequenciamento dos clones <i>PBX1</i> #1 a <i>PBX1</i> #14.	128
Quadro 9: Efeitos das edições nas sequências de DNA dos clones <i>EPHA2</i> editados.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de <i>primers</i> utilizados e estratégia de combinação para a triagem de clones potencialmente editados via PCR.	47
Tabela 2: Protocolo de reação de ligação dos produtos de PCR ao vetor pTZ57R/T.	48
Tabela 3: Protocolo de reação para a purificação dos produtos de PCR.	50
Tabela 4: Protocolo da reação de sequenciamento dos produtos de PCR purificados.	51
Tabela 5: Condições de ciclagem das reações de sequenciamento dos produtos de PCR purificados que não passaram por clonagem molecular.	51
Tabela 6: Condições de ciclagem das reações de sequenciamento dos produtos de PCR purificados que passaram por clonagem molecular.	51
Tabela 7: Etapas 1 e 2 na produção de cDNA.	53
Tabela 8: Condições de ciclagem para as reações de qPCR.	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. CÂNCER DE MAMA	20
2.1.1. Etiologia do câncer de mama.....	21
2.1.2. Classificação	22
2.3. EPHA2	29
2.4. PBX1.....	32
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. OBJETIVOS	35
3.1.1. Objetivo geral	35
3.1.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. CULTIVO CELULAR	35
4.2. SILENCIAMENTO GÊNICO DE <i>PBX1</i>	36
4.3. EDIÇÃO GÊNICA.....	37
4.3.1. Estratégia utilizada para edição gênica.....	37
4.3.2. Construção dos vetores carregando os RNAs guia (gRNA)	40
4.3.3. Transformação de bactérias e extração de DNA plasmidial	43
4.3.4. Transfecção dos vetores e seleção dos clones	44
4.4. CONFIRMAÇÃO DE EDIÇÃO DOS GENES <i>EPHA2</i> E <i>PBX1</i>	46
4.4.1. Extração de DNA e Amplificação gênica por PCR.....	46
4.4.2. Clonagem dos produtos de PCR e extração do DNA plasmidial	47
4.4.3. Purificação	49
4.4.4. Sequenciamento	50
4.5. EXTRAÇÃO DE RNA.....	52

4.6.	RT-PCR QUANTITATIVA	53
4.6.1.	Transcrição reversa	53
4.6.2.	PCR quantitativa	53
4.7.	WESTERN BLOTTING	55
4.8.	VIABILIDADE CELULAR	56
4.9.	PROLIFERAÇÃO CELULAR	58
4.10.	CAPACIDADE CLONOGÊNICA	59
4.11.	RESISTÊNCIA AO TAMOXIFENO	59
4.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5.	CAPÍTULO I.....	61
6.	CAPÍTULO II.....	92
6.1.	RESULTADOS.....	92
6.1.1.	Obtenção de clones potencialmente editados em <i>EPHA2</i>	92
6.1.2.	Sequenciamento dos clones <i>EPHA2</i>	93
6.1.3.	EphA2 reduz a viabilidade celular de células MCF7	98
6.1.4.	EphA2 reduz a proliferação celular em células MCF7	99
6.1.5.	EphA2 aumenta a capacidade clonogênica de células MCF7	101
6.1.6.	EphA2 aumenta a resistência ao tamoxifeno de modo dose-dependente e tempo-dependente.....	102
6.2.	DISCUSSÃO	104
6.3.	CONCLUSÕES.....	107
6.4.	PERSPECTIVAS.....	108
7.	CAPÍTULO III.....	109
8.	CAPÍTULO IV	124
8.1.	RESULTADOS.....	124
8.1.1.	O <i>PBX1</i> é eficientemente silenciado a nível de mRNA com siRNA .	124
8.1.2.	O <i>PBX1</i> é eficientemente silenciado a nível proteico após tratamento com siRNA.....	125
8.1.3.	Obtenção de clones potencialmente editados em <i>PBX1</i>	125

8.1.4. Sequenciamento dos clones PBX1	126
8.1.5. PBX1 aumenta a viabilidade de células MCF7, mas não de ZR-75-1 131	
8.1.6. PBX1 não altera a proliferação em câncer de mama subtipo luminal A 133	
8.1.7. PBX1 aumenta a capacidade clonogênica em células MCF7	134
8.1.8. PBX1 aumenta a resistência ao tamoxifeno	136
8.1.9. Expressão de genes potencialmente regulados por PBX1	139
8.1. DISCUSSÃO	144
8.2. CONCLUSÕES	147
8.3. PERSPECTIVAS	147
9. REFERÊNCIAS	148
APÊNDICE 1 – RESUMO DE ATIVIDADES REALIZADAS	166

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema de saúde pública que afeta principalmente as mulheres (ACS, 2019; INCA, 2022). Dos subtipos de carcinomas mamários, os que expressam o receptor de estrogênio são os mais frequentes, correspondendo a pelo menos dois terços de todos os casos (VALENTIN *et al.*, 2012; ACS, 2019). Apesar do prognóstico dos tumores luminal A (principalmente) e B serem relativamente melhores quando comparados aos outros subtipos, eles ainda são responsáveis pela morte de milhares de mulheres no Brasil e no mundo. Os medicamentos alvo-específicos aumentam a eficiência dos tratamentos e, com frequência, reduzem a quantidade e severidade dos efeitos colaterais. No entanto, uma parcela considerável dos tumores desenvolve resistência à terapia-alvo (WARDELL *et al.*, 2015; JORDAN, 2018; LOI *et al.*, 2019). Dessa forma, torna-se não só necessário, mas também urgente encontrar alvos-terapêuticos em potencial, de modo a possibilitar o futuro desenvolvimento de novos tratamentos.

O receptor tipo 2 de fatores de crescimento fibroblástico (FGFR2 – do inglês, *fibroblast growth factor receptor 2*) está associado com o câncer de mama, principalmente com os tumores que expressam o receptor de estrogênio (ER+ – do inglês, *estrogen receptor positive*). A compreensão do interatoma de FGFR2 quando envolvido com a regulação do receptor de estrogênio pode aprofundar o entendimento sobre o desenvolvimento e progressão de carcinomas mamários ER+, bem como auxiliar na busca de potenciais alvos-terapêuticos envolvidos nesse *regulon*. Análises *in silico* sugerem que EphA2 e PBX1, duas proteínas envolvidas no interatoma de FGFR2 em cânceres de mama luminais, modulam a resposta ao tamoxifeno durante o tratamento de tumores mamários luminais (OLIVEIRA, 2018), sendo o tamoxifeno um dos hormonioterápicos de escolha para o tratamento desses tumores.

EphA2 (do inglês, *erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma A2 receptor*) é um receptor tirosina-quinase envolvido com processos de

desenvolvimento (VAUGHT *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2013). No entanto, ele está frequentemente super expresso em diversos tipos de câncer, incluindo o de mama, sendo frequentemente associado à progressão tumoral (BRANTLEY-SIEDERS *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2022). Seu papel na resistência à quimioterapia e à terapia-alvo vem sendo estudada em diversos tipos de câncer, tais como câncer de pulmão (AMATO *et al.*, 2016), colorretal (YAO *et al.*, 2022) e hepático (CHEN *et al.*, 2020). Apesar de haver estudos associando esse receptor à resistência à terapia em câncer de mama, esses não são numerosos, sendo necessários mais estudos que corroborem ou refutem os resultados já publicados na literatura.

O PBX1 (do inglês, *pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1*) é um fator de transcrição pioneiro (PF – do inglês, *pioneer transcription factor*) que controla diversos programas do desenvolvimento. Assim como outros PFs, ele também já foi associado com o desenvolvimento e progressão tumoral em diversos tipos de câncer, incluindo os carcinomas mamários (revisado por VEIGA *et al.*, 2021). Apesar dos resultados de Oliveira (2018) indicarem PBX1 como um modulador da resposta ao tamoxifeno, não há evidências diretas na literatura que corroborem com esses resultados. Contudo, PBX1 já foi associado à resistência à quimioterapia (JUNG *et al.*, 2016) e à radioterapia (YU *et al.*, 2020) em outros tipos de câncer.

Sendo assim, esse trabalho utilizou ensaios funcionais para investigar como essas duas proteínas de interesse – EphA2 e PBX1 – atuam em linhagens de câncer de mama luminal A. Ainda, o papel dessas proteínas na resistência ao tamoxifeno foi investigado para melhor avaliá-las como potenciais alvos terapêuticos nesse subtipo de carcinoma mamário.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas por mudanças em um grupo de células no corpo, sendo que essas alterações levam as células a se proliferarem descontroladamente (ACS, 2019; INCA, 2022). Na maioria dos cânceres, essa proliferação desordenada tende a formar uma massa de células cancerosas, constituindo um tumor (ACS, 2019; INCA, 2022). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022), com a progressão da doença as células tumorais podem adquirir a capacidade de se espalharem para outras regiões do corpo via metástase.

Quando o câncer ocorre em tecido mamário, ele é denominado câncer de mama, podendo acometer regiões lobulares ou ductais. Atualmente, o câncer de mama é a neoplasia mais comum no mundo, correspondendo a 11,7% de todos os casos (SUNG *et al.*, 2021). Em se tratando especificamente de mulheres, o câncer de mama representa entre 24 e 33% de todos os novos casos de câncer diagnosticados nesse grupo (DAI *et al.*, 2016; SUNG *et al.*, 2021; SIEGEL *et al.*, 2022), e é também o tipo de neoplasia com maior índice de mortalidade (SUNG *et al.*, 2021). Embora a taxa de mortalidade seja a mais alta dentre os demais tipos de câncer entre as mulheres, a letalidade do câncer de mama é considerada relativamente baixa, visto que a mortalidade corresponde a menos de um terço da taxa de incidência (STEWART & WILD, 2014; SUNG *et al.*, 2021). Em países desenvolvidos têm-se observado um declínio na taxa de mortalidade de cânceres como o de mama, o que tem sido atribuído a avanços na detecção precoce e nos tratamentos (SERVIK, 2014; SIEGEL *et al.*, 2022). Nos Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, a taxa de mortalidade caiu 42% desde 1989 (SIEGEL *et al.*, 2022). Apesar de ser relativamente raro, esse tipo de câncer também acomete indivíduos do sexo masculino, representando 1% do total de casos da doença (INCA, 2022).

No Brasil, entre os anos de 2001 e 2012, a mortalidade decorrente do câncer de mama aumentou em uma taxa de 0,9% ao ano (DeSANTIS *et al.*, 2015). Somente em 2017, 16.724 óbitos em função dessa neoplasia foram

registrados (MS/INCA, 2019). Para 2022, estima-se que a incidência de novos casos registrados no país corresponda a 66.280 (MS/INCA, 2019). Em países em desenvolvimento como o Brasil, o diagnóstico do câncer de mama ocorre em estágios mais avançados da doença, afetando negativamente o tratamento, qualidade de vida e sobrevida dos pacientes; portanto, o diagnóstico precoce e controle do câncer de mama fazem parte da lista de prioridades da Política Nacional de Saúde do Brasil (MS/INCA, 2019).

2.1.1. Etiologia do câncer de mama

O câncer é, essencialmente, uma doença de natureza genética que leva a um descontrole da proliferação celular. No entanto, a etiologia do câncer de mama é multifatorial, envolvendo a idade, fatores endócrinos/reprodutivos, ambientais/comportamentais e fatores genéticos/hereditários (STEWART & WILD, 2014; INCA, 2022).

Fatores endócrinos e reprodutivos incluem nuliparidade, primeira gravidez após os 30 anos e histórico hormonal relacionado ao estímulo pelo estrogênio (menarca antes dos 12 anos, menopausa após os 55 anos, uso de determinados anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal prolongada) (STEWART & WILD, 2014; INCA, 2022). Fatores ambientais e comportamentais, por sua vez, referem-se ao consumo de bebidas alcoólicas, exposição à radiação ionizante, obesidade, sedentarismo (STEWART & WILD, 2014; INCA, 2022). Nos Estados Unidos, por exemplo, o leve aumento na taxa de incidência do câncer de mama em 0,5% ao ano, desde meados dos anos 2000, é parcialmente atribuído às quedas contínuas na taxa de fertilidade e ao aumento de sobrepeso populacional (SIEGEL *et al.*, 2022). No Brasil, entre 1990 e 2015, houve um aumento de 0,77% na mortalidade por câncer de mama atribuído à inatividade física (SILVA *et al.*, 2018).

Por fim, fatores genéticos e hereditários fazem referência a mutações (somáticas ou germinativas) em genes que conferem suscetibilidade à doença. A maioria dos cânceres – 90 a 95% – são esporádicos (PARTIPILO *et al.*, 2016), ou seja, não resultam de mutações herdadas, mas sim de alterações

somáticas gênicas, cromossômicas e/ou epigenéticas, que se acumulam em um indivíduo ao longo da vida. Todavia, fatores genéticos hereditários relacionados à herança de um alelo de alta penetrância contendo uma mutação germinativa, a qual confere um aumento no risco de desenvolvimento de um ou mais tipos específicos de câncer, contribuem para 5 a 10% dos casos (PARTIPILO *et al.*, 2016). Em se tratando do câncer de mama, os principais genes envolvidos em casos hereditários da doença são o *BRCA1* e o *BRCA2*, sendo que mulheres portadoras de alelos de risco de algum desses genes tenham um risco aumentado de 40 a 80% no desenvolvimento dessa neoplasia (EASTON *et al.*, 1995; STRUEWING *et al.*, 1997; ROBSON, 2002; FACKENTHAL & OLOPADE, 2007). Outros genes de risco baixo ou moderado também contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama. De um modo geral, as alterações genéticas, sejam elas somáticas ou germinativas, ocorrem principalmente em duas classes de genes: (1) proto-oncogenes, que quando mutados tornam-se oncogenes com ganho de função, e (2) genes supressores de tumor, os quais podem ser inativados levando à perda de sua função (WEINBERG, 2014). Resumidamente, esses genes estão normalmente envolvidos com o controle do ciclo celular e da integridade genética e cromossômica.

2.1.2. Classificação

Na realidade, o câncer de mama compreende um grupo de doenças heterogêneas e, portanto, a estratificação em subtipos histológicos e moleculares torna-se relevante do ponto de vista clínico, de modo a permitir um direcionamento para um tratamento mais eficaz e personalizado (DAI *et al.*, 2016). Além da importância para o diagnóstico e prognóstico, a estratificação também é pertinente na pesquisa científica, de modo a se obter maiores informações que serão utilizadas para melhorar o diagnóstico e tratamentos.

De acordo com a origem histológica, o câncer de mama pode ser dividido mais de 20 subtipos (ACS, 2019). Ele pode ser classificado como carcinoma ou sarcoma, se originado em tecido epitelial ou conjuntivo,

respectivamente. Entretanto, sarcomas no tecido mamário são bastante raros, correspondendo apenas de 0,5 a 1,0% dos cânceres de mama (POLLARD *et al.*, 1990; MELLO *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2016). Dessa forma, comumente nesse estudo estaremos nos referindo ao câncer de mama também como carcinoma mamário. Ainda em relação à classificação histológica, quando a proliferação desordenada das células cancerosas ocorre no revestimento dos ductos mamários, têm-se os carcinomas ductais; em oposição, quando a ocorrência se dá nos lóbulos, têm-se os carcinomas lobulares (ACS, 2019). Ambos podem ser classificados ainda como *in situ*, nos quais não ocorre extravasamento através da membrana basal, ou invasivos, os quais ultrapassam os limites da membrana basal e invadem o estroma circundante, sendo estes os mais frequentes (81%) (ACS, 2019; VUONG *et al.*, 2014). Alterações na proliferação de outros tipos de células mamárias podem levar ao desenvolvimento de neoplasia mais raras, tais quais a cribiforme, mucinoso, micropapilar, entre outros (VUONG *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi possível criar uma classificação dos carcinomas mamários de acordo com seu padrão molecular. O estudo de expressão gênica diferencial por meio de microarranjos, conduzido por Perou *et al.* (2000) avaliou a expressão gênica em amostras de tumores mamários e os classificou em quatro subgrupos moleculares: luminal/receptor de estrogênio positivo (ER+), semelhante ao basal, HER2 (receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 – do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) positivo (HER2+) e semelhante ao normal (PEROU *et al.*, 2000). Estudos posteriores do mesmo grupo corroboraram os resultados previamente encontrados, mas os pesquisadores propuseram dividir o subtipo luminal em dois novos subtipos, A e B (SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003). Posteriormente, Farmer *et al.*, (2005) identificaram uma sexta categoria de tumores mamários, a qual eles denominaram como apócrino molecular, sendo este caracterizado pela expressão positiva diferencial do receptor de andrógeno. Mais recentemente foi sugerida a inclusão do subtipo claudina baixa, o qual apresentava baixa expressão dos genes codificadores das claudinas 3, 4 e 7, e da E-caderina,

além do aumento da expressão de marcadores de transição epitelial para mesenquimal (PRAT *et al.*; 2010). Dessa forma, do ponto de vista molecular, o câncer de mama, passou a ser dividido em sete subtipos: luminal A, luminal B, semelhante ao basal, HER2+, semelhante ao normal, apócrino molecular e claudina baixa.

Apesar da classificação molecular ter revolucionado o conhecimento sobre a biologia dos diferentes subtipos de câncer de mama, melhorando a avaliação de diagnóstico, prognóstico e possibilitando uma evolução no tratamento específico para cada subtipo, a utilização de técnicas que permitem montar esses perfis não é uma prática comum na clínica, visto que o custo ainda é considerado relativamente alto (ACS, 2019). Sendo assim, foi sugerida uma classificação simplificada que se aproximasse à classificação molecular, com base em marcadores imunoistoquímicos, cuja implementação é mais viável tanto técnica quanto economicamente. Os marcadores escolhidos foram aqueles que permitem identificar a presença dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona (ER e PR – do inglês, *estrogen receptor* e *progesterone receptor*, respectivamente), HER2 e do marcador de proliferação celular Ki67 (STEWART & WILD, 2014; ACS, 2019). Assim, a classificação de tumores mamários conforme análise imunoistoquímica compreende quatro subtipos: luminal A, luminal B, HER2+ e triplo negativo, conforme o Quadro 1.

Quadro 1: Classificação imunoistoquímica do câncer de mama

Subtipo	Receptor Hormonal	HER2	Ki67 ^a	Prognóstico
Luminal A	ER+ e/ou PR+	Negativo	Baixo	Favorável
Luminal B	ER+ e/ou PR+	Negativo	Alto	Intermediário
	ER+ e/ou PR+	Superexpresso ou amplificado	Qualquer	Intermediário
HER2+ (enriquecido)	ER e PR ausentes	Superexpresso ou amplificado	Qualquer	Ruim
Triplo negativo	ER e PR ausentes	Negativo	Qualquer	Ruim

^a Ki67 alto ≥ 14%; baixo < 14%

Legenda: Classificação imunoistoquímica do câncer de mama e prognóstico, com base na expressão dos biomarcadores: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR),

Receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2) e Ki67. FONTE: Adaptado de Goldhirsch *et al.*, 2011; ACS, 2019.

O grupo luminal A é o subtipo mais frequente, correspondendo a 73% dos casos de câncer de mama, enquanto o luminal B e o triplo negativo apresentam frequências de 11 e 12%, respectivamente e, por fim, os carcinomas HER2+ são os menos comuns, sendo responsáveis por 4% dos casos (ACS, 2019).

A correta classificação do tumor mamário é de extrema importância não apenas para a definição do prognóstico, mas principalmente para a definição do tratamento. O tratamento para o câncer de mama é variável e depende de diversos fatores, como o subtipo do tumor mamário, grau, estadiamento e características individuais da paciente. Ainda assim, geralmente inclui um conjunto de abordagens terapêuticas, tais como: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, terapia alvo e imunoterapia (ACS, 2019).

Apesar do prognóstico referente ao câncer de mama luminal A ser considerado bom, esses tumores não são muito sensíveis à quimioterapia (IGNATIADIS & SOTIRIOU, 2013; BONACHO *et al.*, 2019). No entanto, a presença de receptores hormonais em células dos tumores mamários luminal A e B, em particular o receptor de estrogênio, possibilita o emprego da terapia endócrina, tornando o tratamento mais específico e eficaz. Essa estratégia terapêutica ocorre por meio da administração de medicamentos como os moduladores e/ou degradadores seletivos do receptor de estrogênio (MSREs e DSREs, respectivamente) e inibidores de aromatase (HAMMOND *et al.*, 2010; JORDAN, 2018). Um dos medicamentos mais prescritos na terapia endócrina de tumores de mama luminais é o tamoxifeno (revisado em BARAZETTI *et al.*, 2021).

O tamoxifeno é um MSRE que liga ao RE e bloqueia sua atividade transcricional, e é utilizado independentemente do estágio dos cânceres mamários, tanto em mulheres na pré ou pós-menopausa (Revisado em BARAZETTI *et al.*, 2021). As mulheres com carcinomas mamários do tipo

luminal apresentaram queda de 30 a 50% no risco de recidiva após 10 ou 5 anos de tratamento via terapia hormonal com tamoxifeno, respectivamente (IGNATIADIS & SOTIRIOU, 2013; PAN *et al.*, 2017). Ainda, o risco de mortalidade é 30% menor após 15 anos do início da administração de tamoxifeno, quando comparado à terapia livre de tratamento hormonal (PAN *et al.*, 2017). Entretanto, durante a terapia endócrina contínua e prolongada, os tumores frequentemente desenvolvem resistência a esses fármacos (WARDELL *et al.*, 2015; JORDAN, 2018).

Assim, considerando que carcinomas mamários que expressam receptor de estrogênio são os mais frequentes dentre os demais tipos de câncer de mama, e que eles podem não responder bem à quimioterapia, além do potencial desenvolvimento de resistência contra a terapia alvo-específica direcionada ao receptor de estrogênio, entende-se que há necessidade em se encontrar novos alvos terapêuticos para esses subtipos neoplásicos.

2.2. INTERATOMA DO FGFR2 E CÂNCER DE MAMA LUMINAL

O receptor tipo 2 do fator de crescimento fibroblástico (FGFR2) já foi extensamente associado ao câncer de mama, principalmente àqueles que expressam o receptor de estrogênio.

Zang & Pento (2001) utilizaram linhagens celulares de câncer de mama para testar o efeito de FGFR2 na motilidade das células ER-positivas e ER-negativas. Eles verificaram que além da motilidade ter sido mais estimulada nas linhagens ER+, a expressão de FGFR2 também era maior quando comparadas às células ER-negativas (ZANG & PENTO, 2001). Ainda, Stacey *et al.* (2008) reportaram que o SNP (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*) rs1219648 do gene *FGFR2* estava associado com o risco aumentado no câncer de mama ER+, mas não estava envolvido com tumores ER-negativos. Esses trabalhos indicam que o *FGFR2* exerce papel importante no desenvolvimento e progressão de tumores mamários ER+.

Tendo em vista as evidências de associação entre o FGFR2 e os carcinomas mamários que expressam o receptor de estrogênio (luminal A e B),

um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Universidade de Cambridge passaram a estudar a via de interação entre o FGFR2 e o receptor de estrogênio.

Primeiramente, Fletcher *et al.* (2013) utilizaram métodos de biologia de sistemas e ensaios funcionais em uma linhagem celular luminal A para estudar a rede regulatória do câncer de mama, como ela é perturbada pelo FGFR2 e como outros reguladores dessa rede estão relacionados com o risco da doença. Os resultados encontrados reforçam que a via de sinalização mediada por FGFR2 contribui para o risco de carcinomas mamários ER+ (FLETCHER *et al.*, 2013). Mais especificamente, o risco associado à sinalização alterada de FGFR2 está envolvido com a atividade alterada da rede transcricional do receptor alfa de estrogênio (ER α – do inglês, estrogen receptor alpha), o qual é codificado pelo gene *ESR1* (FLETCHER *et al.*, 2013). Os pesquisadores também identificaram outros três componentes-chave dessa rede: FOXA1, GATA3 e SPDEF, sendo todos esses fatores de transcrição (TFs) (FLETCHER *et al.*, 2013).

Em 2015, Castro *et al.* investigaram as vias de sinalização de FGFR2 e ER α para identificar reguladores associados a essas vias. Para isso, utilizaram uma abordagem de biologia de sistemas e ensaios funcionais em linhagens celulares de câncer de mama tanto positivos quanto negativos para o receptor de estrogênio. No caso das linhagens celulares de câncer de mama luminal, além de confirmar os TFs de risco encontrados por Fletcher *et al.* (2013), os resultados indicam outros fatores transcricionais de risco, entre eles: XBP1, RARA e AR (CASTRO *et al.*, 2015).

No ano seguinte, Campbell *et al.* (2016) publicaram um estudo cujo objetivo foi testar diferentes sistemas de sinalização por FGFR2, em cinco linhagens celulares de câncer de mama ER+ (quatro luminal A e uma luminal B) para examinar o efeito da ativação de FGFR2 nos perfis transcricionais das linhagens. Análises funcionais que testaram diferentes modelos de ativação do FGFR2, bem como experimentos de silenciamento desse receptor demonstraram que o FGFR2 causa um efeito inibitório no *regulon* de *ESR1*

(CAMPBELL *et al.*, 2016). Visto que a interação estrogênio-ER é o componente principal do câncer de mama ER+, os resultados encontrados por Campbell *et al.* (2016) sugerem que o risco aumentado no desenvolvimento neoplásico deve estar associado com a redução da expressão de FGFR2. Isso não era esperado, uma vez que outros estudos, inclusive um do mesmo grupo, indicavam que tumores mamários ER+ apresentavam maior expressão de FGFR2 (ZANG & PENTO, 2001; MEYER *et al.*, 2008). No entanto, o mecanismo de ação de polimorfismos no *FGFR2* parece ser mais complexo. Campbell *et al.* (2016), por exemplo, propõem que FOXA1 se liga com maior afinidade à sequência intrônica levando o alelo de risco SNP rs2981578 (T>C) em *FGFR2*, o que resultaria em um aumento da acessibilidade da cromatina; isso permitiria o acesso de repressores transcricionais, o que culminariam com a repressão, e não ativação, do promotor de FGFR2. Atualmente, sabe-se que alelos de risco afetam as cascatas de sinalização do FGFR2, mas o modo como isso ocorre ainda não é compreendido.

Em um trabalho mais recente, Oliveira (2018) utilizou uma abordagem puramente baseada em biologia de sistemas para encontrar potenciais alvos terapêuticos do câncer de mama luminal no interatoma de FGFR2. Inicialmente, foi realizada uma análise de interação proteica, utilizando diferentes bancos de dados, para identificar proteínas que interagem com FGFR2 em tecido mamário saudável, resultando em 434 proteínas (OLIVEIRA, 2018). Análises de modulação condicional foram conduzidas para pesquisar o perfil de expressão gênica entre cada uma dessas 434 proteínas em relação aos 23 TFs associados com câncer de mama encontrados por Castro *et al.* (2015) (OLIVEIRA, 2018). Essa análise permite identificar genes capazes de modificar a atividade de um fator de transcrição (TF – do inglês, *transcription factor*) por meio da detecção de mudanças no perfil de informação mútua entre o fator de transcrição e seus alvos, quando condicionados a valores de expressão de um gene modulador candidato. Com isso, chegou-se a oito proteínas diferencialmente expressas em câncer de mama ER+, as quais fazem parte da via de regulação entre FGFR2 e pelo menos um dos 23 TFs investigados (OLIVEIRA, 2018). Oliveira (2018) prosseguiu analisando bancos

de dados de xenoenxertos derivados de pacientes (PDX – do inglês, *patient derived xenograft*), na tentativa de entender como essas oito proteínas tinham impacto em respostas a tratamentos de carcinomas mamários, principalmente ao tratamento com tamoxifeno, o que levou a duas proteínas de maior interesse: EphA2 e PBX1. Entretanto, todas as análises conduzidas por Oliveira (2018) foram feitas unicamente via biologia de sistemas, sendo que não foi validado experimentalmente se – ou como – EphA2 e/ou PBX1 participariam de algum processo carcinogênico ou de resposta terapêutica.

2.3. EPHA2

Os 16 receptores Eph (do inglês, *Erythropoietin-producing hepatocelular*) compreendem a maior família de receptores tirosina-quinase e são subdivididos em duas classes, EphA e EphB, de acordo com a sequência e com a afinidade pelos seus ligantes, as efrinas A e B (PASQUALE, 2010; SAHOO & BUCK, 2021). Geralmente, as efrinas estão ancoradas à membrana celular ou de exossomos (GONG *et al.*, 2016; PASQUALE, 2016), sendo que as efrinas do tipo A estão ancoradas por uma molécula de glicofosfatidilinositol, enquanto as do tipo B possuem um domínio transmembrana (Figura 1) (SAHOO & BUCK, 2021).

Os receptores Eph apresentam três regiões: extracelular, transmembrana e intracelular (Figura 1). A porção extracelular é composta por um domínio globular de ligação ao ligante, uma região rica em cisteína e duas repetições de fibronectina tipo III (HIMANEN *et al.*, 2001). A região intracelular é composta por um motivo justamembrana, um domínio tirosina-quinase, um motivo alfa estéril e um motivo de ligação ao domínio PDZ (SAHOO & BUCK, 2021).

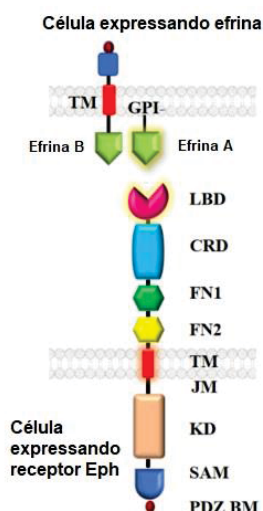


Figura 1: Representação esquemática da estrutura geral dos receptores Eph e seus ligantes efrinas A e B. **LBD**: Domínio de ligação; **CRD**: região rica em cisteína; **FN**: repetições de fibronectina tipo III; **TM**: região transmembrana; **JM**: região justamembrana; **KD**: domínio tirosina-quinase; **SAM**: motivo estéril alfa; **PDZBM**: motivo de ligação ao domínio PDZ; **GPI**: glicofosfatidilinositol. FONTE: Adaptado de SAHOO & BUCK, 2021.

O EphA2 é um receptor de 976 aminoácidos codificado pelo gene *EPHA2*, o qual possui 17 éxons e está localizado no cromossomo 1p36.13 (Figura 2).



Figura 2: Estrutura do gene *EPHA2*. Diagrama simplificado onde os retângulos numerados representam éxons de *EPHA2* e as linhas que os conectam representam os íntrons. Acima encontram-se as posições de início e fim do gene no cromossomo 1 humano. Esse diagrama não está em escala real. FONTE: elaborada pela autora.

O EphA2 é um importante membro da família de receptores Eph e possui afinidade com as efrinas-A1, -A2, -A3, -A4 e -A5 (DARLING *et al.*, 2019). Após a ligação receptor-ligante, ocorre a oligomerização e clusterização, sendo que a complexa natureza dos clusters Eph-efrinas podem levar a diferentes resultados nas vias de sinalização celular (JANES *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2019). Além disso, a ligação comumente promove uma

sinalização bidirecional, onde os sinais enviados a partir da ativação do EphA2 na célula apresentadora do receptor são chamados de sinais *forward*, enquanto os sinais enviados na célula apresentadora da efrina são denominados sinais *reverse* (PASQUALE, 2010; LIANG *et al.*, 2019). Entretanto, EphA2 também pode ser ativado por uma via não-canônica, independente de ligante, na qual ocorre a fosforilação da serina 897 em EphA2 (MIAO *et al.*, 2009).

O EphA2 participa do desenvolvimento ocular (SHI *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2013), do remodelamento ósseo (IRIE *et al.*, 2009) e da morfogênese da glândula mamária (VAUGHT *et al.*, 2009). Todavia, alterações na expressão desse receptor são relativamente comuns em tumores (WALKER-DANIELS *et al.*, 1999; KINCH & CARLES-KINCH, 2003; LIN *et al.*, 2007).

Quando comparado ao tecido mamário normal ou adjacente, os tumores de mama apresentam expressão elevada de EphA2 (BRANTLEY-SIEDERS *et al.*, 2011). Ainda, a alta expressão de *EPHA2* a nível de mRNA também foi correlacionada com um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (BRANTLEY-SIEDERS *et al.*, 2011). Em particular, no subtipo triplo negativo, foi demonstrado que EphA2 exerce papel importante na proliferação celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SONG *et al.*, 2017), além de promover a migração, angiogênese e metástase (HAN *et al.*, 2022). No estudo de Lévêque *et al.* (2019), o silenciamento de *EPHA2* causou resultados opostos, mas ambos significativos, em células de câncer de mama do tipo luminal A. Enquanto o silenciamento de *EPHA2* aumentou a capacidade clonogênica de células MCF7, houve também redução na formação de colônias em células T47D (LÉVÊQUE *et al.*, 2019).

O papel de EphA2 na carcinogênese mamária ainda não foi completamente elucidado. De modo geral, as evidências apontam que EphA2 é super expresso em tumores mamários e está associado com um pior prognóstico. Entretanto, a maioria dos estudos investigam os tumores triplo-negativos. Quanto aos carcinomas mamários especificamente luminais, o EphA2 ainda não foi extensivamente estudado, sendo que alguns resultados encontrados se mostraram contraditórios. Possivelmente, os resultados

conflitantes podem ser explicados, parcialmente, pela complexidade da sinalização celular gerada por EphA2. A ativação do receptor via ligação à efrina A1, seu principal ligante, parece suprimir a tumorigênese, visto que essa interação causa clusterização de EphA2, a qual é seguida por internalização subsequente dos receptores, levando à regulação negativa e inibição de vias MAPK e Akt (MACRAE *et al.*, 2005). Por outro lado, EphA2 pode ser ativado de modo independente de ligante, com a fosforilação da Ser897 (ZHOU *et al.*, 2015), ou pela interação com outros receptores de superfície celular, tais quais EGFR e HER2, levando à regulação positiva de vias MAPK, Akt e da atividade de GTPases da família Rho (LARSEN *et al.*, 2007; BRANTLEY-SIEDERS *et al.*, 2008).

Oliveira (2018) demonstrou, via biologia de sistemas, que EphA2 pode ter algum impacto na resposta ao tratamento de câncer de mama luminal. De fato, há evidências de que a expressão e ativação de EphA2 estão associadas com o desenvolvimento de resistência à terapia em diversos tipos de câncer, como melanoma (AZIMI *et al.*, 2017), câncer de pulmão (AMATO *et al.*, 2016) e câncer gástrico (HUANG *et al.*, 2020). Em câncer de mama, a expressão de EphA2 também pode estar reduzindo a sensibilidade à terapia hormonal (LU *et al.*, 2003), à imunoterapia (ZHUANG *et al.* 2010) e à quimioterapia (GAO *et al.*, 2021), mas não há muitos estudos que corroborem com esses resultados.

2.4. PBX1

O PBX1 é um fator de transcrição pioneiro (PF) que pertence à família altamente conservada PBX1-4 (MONICA *et al.*, 1991; WAGNER *et al.*, 2001) e controla diversos programas do desenvolvimento. O gene *PBX1*, que codifica esse PF, está localizado no cromossomo 1q23.3 e possui nove éxons (Figura 3). A proteína, quando traduzida, possui 430 aminoácidos.

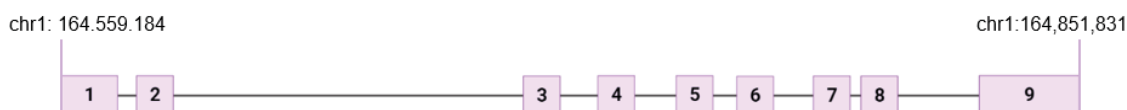


Figura 3: Estrutura do gene *PBX1*. Diagrama simplificado onde os retângulos numerados representam éxons de *PBX1* e as linhas que os conectam representam os íntrons. Acima encontram-se as posições de início e fim do gene no cromossomo 1 humano. Esse diagrama não está em escala real. FONTE: elaborada pela autora.

Fatores de transcrição pioneiros como o PBX1 são fatores de transcrição especiais, que são capazes de reconhecer e ligar aos seus sítios de ligação mesmo em cromatina altamente condensada, de modo a remodelá-la, tornando-a mais acessível para que outros fatores de transcrição possam ligar à região e ativar a transcrição efetivamente (Figura 4) (JOZWIK & CARROLL, 2012; GREBBIN & SCHULTE, 2017).

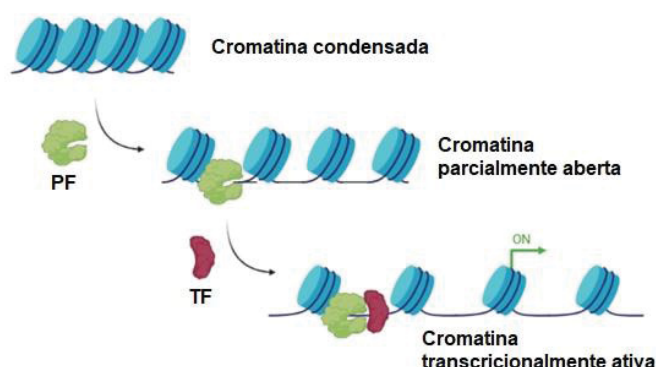


Figura 4: Atuação de um fator pioneiro. Fatores pioneiros podem reconhecer e ligar a regiões de cromatina altamente condensadas, relaxando-as e tornando-as mais acessíveis para outros fatores de transcrição. **PF**: fator pioneiro; **TF**: fator de transcrição. FONTE: Adaptado de VEIGA *et al.*, 2021.

O PBX1 exerce importantes funções durante a embriogênese, organogênese e diferenciação (KIM *et al.*, 2002; SCHNABEL *et al.*, 2003a), sendo que mutações potencialmente patogênicas em *PBX1* podem levar a severos fenótipos como anormalidades congênitas dos rins e trato urinário (RIEDHAMMER *et al.*, 2017), cardiopatia congênita sindrômica (ALANKARAGE *et al.*, 2020) e má formação óssea (RIEDHAMMER *et al.*, 2017; ALANKARAGE *et al.*, 2020).

Assim como outros PFs, PBX1 também foi extensivamente relacionado com o desenvolvimento e a progressão do câncer (VEIGA *et al.*, 2021). Especificamente no contexto do câncer de mama, o PBX1 foi associado com a proliferação celular em MCF7, uma linhagem luminal positiva para o receptor de estrogênio, e com um aumento de risco de metástase (MAGNANI *et al.*, 2011; MAGNANI *et al.*, 2013; MAGNANI *et al.*, 2015). Ainda, Magnani *et al.* (2011) defendem que mais de 70% dos genes-alvo do estrogênio tem sua transcrição dependente do PBX1. Por outro lado, PBX1 não exerceu influência na proliferação e na invasividade de células MCF10A, uma célula não-tumoral, e MDA-MB-231, que é uma linhagem de câncer de mama triplo negativo (WANG *et al.*, 2017). Juntos, esses resultados apontam para uma possível atuação de PBX1 especificamente em tumores de mama ER+. De fato, Ao *et al.* (2020) sustentam que a super expressão de *PBX1* está associada com o câncer de mama ER+ e ainda pode ser considerado um biomarcador de prognóstico ruim. Além disso, PBX1 parece aumentar a sobrevivência celular, uma vez que o silenciamento de *PBX1* aumentou o nível de apoptose em células de câncer de mama positivas e negativas para o receptor de estrogênio (ZHANG *et al.*, 2017).

Segundo Oliveira (2018), PBX1 é um bom candidato a modulador da resposta à terapia em câncer de mama luminal. No entanto, não há nenhuma forte evidência, na literatura, que corrobore com os resultados *in silico* de Oliveira (2018). Todavia, PBX1 já foi associado à resistência à quimioterapia em câncer de ovário (JUNG *et al.*, 2016) e à resistência à radioterapia em câncer de esôfago (YU *et al.*, 2020).

Claramente, PBX1 possui papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer de mama ER+. Entretanto, é necessário um maior aprofundamento nas investigações para que o PBX1 possa ser validado como um alvo terapêutico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivo geral

Investigar o papel de *EphA2* e *PBX1*, por meio de análises funcionais em linhagens de câncer de mama luminal A, na busca de potenciais alvos terapêuticos.

3.1.2. Objetivos específicos

- Produzir células de câncer de mama luminal A com o gene *EphA2* permanentemente editado, para serem utilizadas como modelo de estudo nesta e em outras pesquisas;
- Produzir células de câncer de mama luminal A com o gene *PBX1* permanentemente editado, para serem utilizadas como modelo de estudo nesta e em outras pesquisas;
- Avaliar como as alterações de *EphA2* e *PBX1* podem afetar o desenvolvimento e progressão tumoral em linhagem de câncer de mama luminal A;
- Avaliar como as alterações de *EphA2* e *PBX1* interferem na resistência ao tamoxifeno em linhagem de câncer de mama luminal A;
- Avaliar o efeito na expressão de possíveis alvos transcricionais após silenciamento gênico e edição de *PBX1*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e ZR-75-1, ambas do subtipo luminal A, foram cultivadas em meio DMEM – *Dulbecco's Modified*

Eagles Medium – (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – do inglês, *fetal bovine serum*) e 1% da solução de antibióticos penicilina/estreptomicina a 100 U/mL e 100µg/mL, respectivamente (Gibco, EUA). Todas as células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. As células eram cultivadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência, momento no qual eram removidas por dissociação enzimática com tripsina para utilização em distintos experimentos. Ambas as linhagens foram utilizadas para silenciamento gênico do *PBX1*, mas apenas a MCF7 foi utilizada para edição gênica dos genes *EPHA2* e *PBX1*, de modo independente.

4.2. SILENCIAMENTO GÊNICO DE *PBX1*

O silenciamento gênico de *PBX1* em MCF7 e ZR-75-1 foi realizado por meio da transfecção transiente de um siRNA cujo alvo específico era o gene *PBX1* humano (SASI_Hs01_00154081/*PBX1*, Merck). Para garantir que quaisquer resultados obtidos a partir dessa transfecção se desse exclusivamente devido à alteração de expressão de *PBX1*, um siRNA controle negativo universal (SIC001, Merck) também foi utilizado, o qual será referido neste trabalho como NC (do inglês, *negative control*). Todas as transfecções foram realizadas com o reagente de transfecção Lipofectamina 3000® (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

Após alguns testes de otimização, definiu-se um protocolo de transfecção reversa que foi utilizado em todos os ensaios de silenciamento (Figura 5). Na transfecção reversa, as células são plaqueadas no mesmo momento da transfecção, ou seja, elas ainda estão em suspensão quando entram em contato com a lipofectamina. Dessa forma, a superfície de contato com o agente de transfecção é maior, aumentando a eficiência da técnica. A suspensão celular era preparada com meio de cultivo DMEM, sem suplementação de FBS e antibióticos. Após um período de seis horas as células eram visualizadas em microscópio óptico e, se constatada aderência, as células poderiam ser utilizadas nos ensaios subsequente, com substituição do meio de cultivo pelo meio DMEM suplementado.

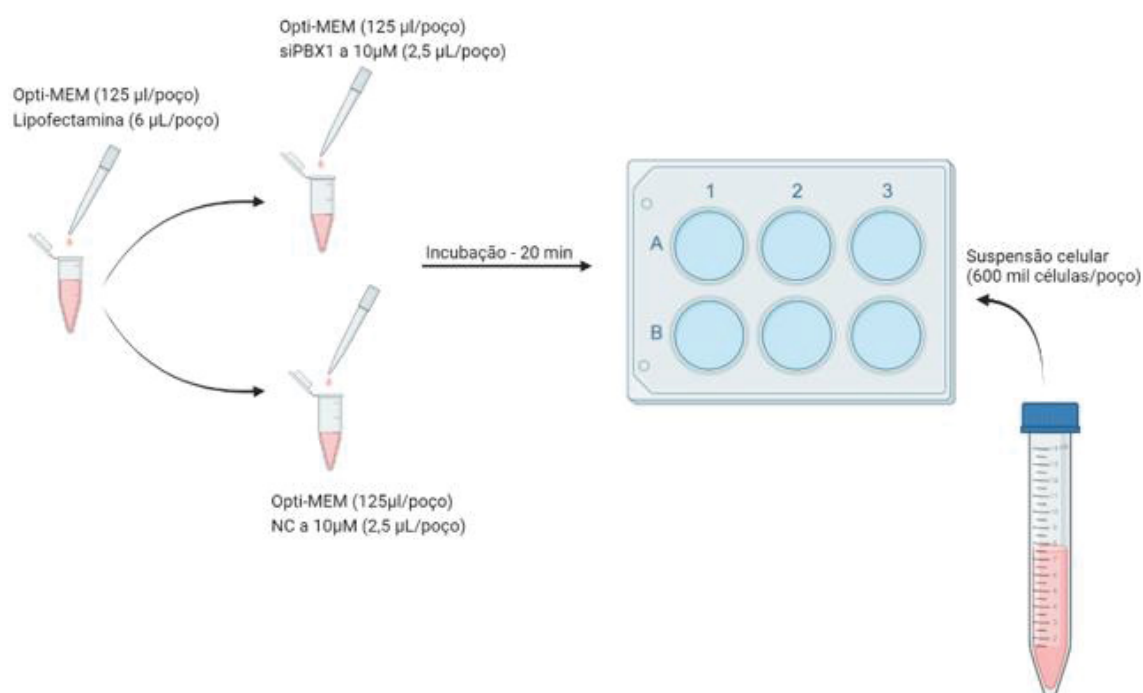


Figura 5: Protocolo de transfecção reversa. **siPBX1**: siRNA cujo alvo é o gene *PBX1* humano. **NC**: siRNA controle negativo universal. FONTE: elaborada pela autora.

O silenciamento gênico foi confirmado por RT-qPCR e por *Western Blotting*. As células transfectadas e silenciadas foram utilizadas nos ensaios funcionais de viabilidade celular, proliferação, capacidade clonogênica e de resistência ao tamoxifeno. O RNA total extraído dessas células também foi utilizado em ensaios de correlação de expressão gênica. Todos os ensaios foram realizados em, pelo menos, três replicatas biológicas independentes.

4.3. EDIÇÃO GÊNICA

4.3.1. Estratégia utilizada para edição gênica

A tecnologia CRISPR/Cas9 (onde, do inglês, CRISPR refere-se a *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, e Cas9 refere-se a *CRISPR associated protein 9*) foi utilizada para a edição dos genes *EPHA2* e *PBX1* humanos na linhagem de câncer de mama luminal A MCF7. Essa técnica pode ser executada de diversas formas de acordo com o tipo de edição desejado, enzima, sistema de *delivery* e de seleção dos mutantes.

Para essa pesquisa, optou-se pela indução de mutações do tipo inserções e/ou deleções (indel) aleatórias, sem que fosse fornecido um DNA doador. Nesse tipo de estratégia, após a clivagem em ambas as fitas de DNA, conta-se com a atuação da via de reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ – do inglês, *non-homologous end joining*) (PEREIRA, 2016). Com isso, espera-se que, em parte dos clones obtidos, obtenha-se indels não-múltiplos de três, de modo a causar uma alteração da fase de leitura na sequência que leve a uma drástica alteração na sequência peptídica da proteína resultante, e/ou à formação de *stop códons* prematuros (PEREIRA, 2016) (Figura 6).

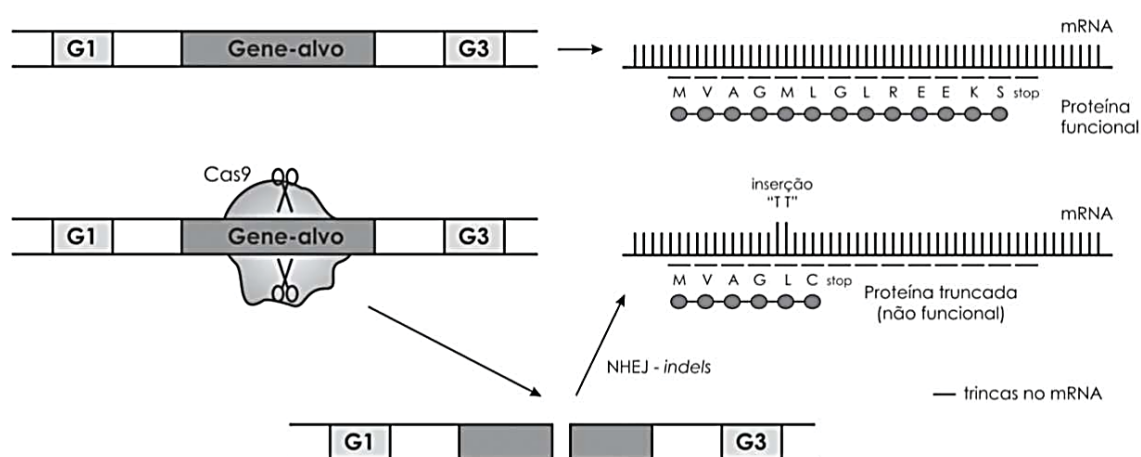


Figura 6: Exemplo de mecanismo de edição gênica causada após atuação da via NHEJ. G1 e G3 referem-se aos genes 1 e 3 hipotéticos, separados do gene-alvo por íntrons (em branco). FONTE: PEREIRA, 2016.

A enzima escolhida foi a Cas9 *nickase* (Cas9n), a qual possui um dos sítios de clivagem da enzima Cas9 inativado (Figura 7). Dessa forma, para que ocorra a clivagem em ambas as fitas de DNA dos genes de interesse – o que é necessário para a edição da sequência de DNA – é preciso construir dois complexos gRNA/Cas9n para cada gene a ser editado, sendo que cada gRNA deve ter como alvo específico uma das fitas de DNA (Figura 7). Essa estratégia pode reduzir a taxa de obtenção de quebra dupla-fita, uma vez que se torna necessária a entrada de não um, mas dois complexos gRNA/Cas9n na célula, que devem agir simultaneamente. Entretanto, trata-se de uma abordagem mais

eficaz, uma vez que ela reduz a taxa de mutações *off-target* (não-desejadas) de 50 a 1500 vezes (RAN *et al.*, 2013a).

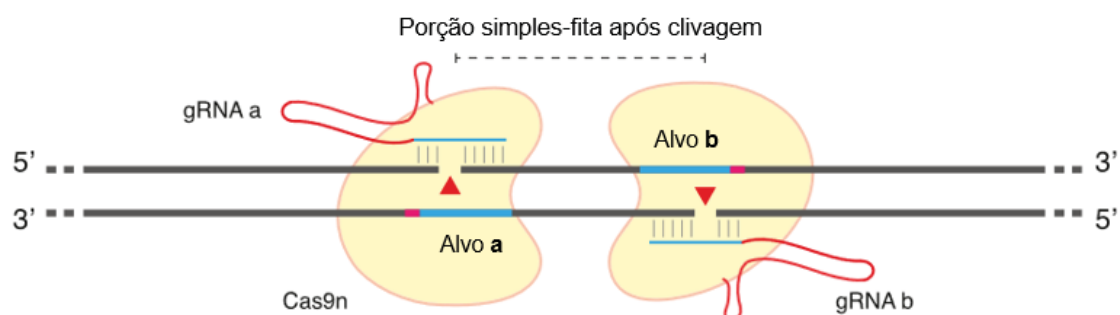


Figura 7: Clivagem em ambas as fitas de DNA por meio de um par de gRNA guiando duas Cas9n. FONTE: Adaptado de RAN *et al.*, 2013a.

Nessa pesquisa, optou-se pelo *delivery* via vetor plasmidial. Os plasmídeos escolhidos para essa pesquisa foram o pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461) (Addgene, *Plasmid* #48140) (Figura 8), construído por Ran *et al.* (2013b), e o PX461 modificado, no qual o gene codificante da proteína verde fluorescente (GFP – do inglês, *green fluorescent protein*) foi previamente substituído pelo gene que codifica a proteína vermelha fluorescente (RFP, – do inglês, *red fluorescent protein*). Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Bruno Dallagiovanna Muñoz, do Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fiocruz Paraná. Esses plasmídeos carregam a sequência da enzima Cas9n, a qual está representada como Cas9(D10A) na Figura 8. Uma vez que esses plasmídeos possuem as sequências para os genes codificantes da GFP (PX461) e da RFP (PX461 modificado), a seleção dos mutantes foi realizada posteriormente via *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS).

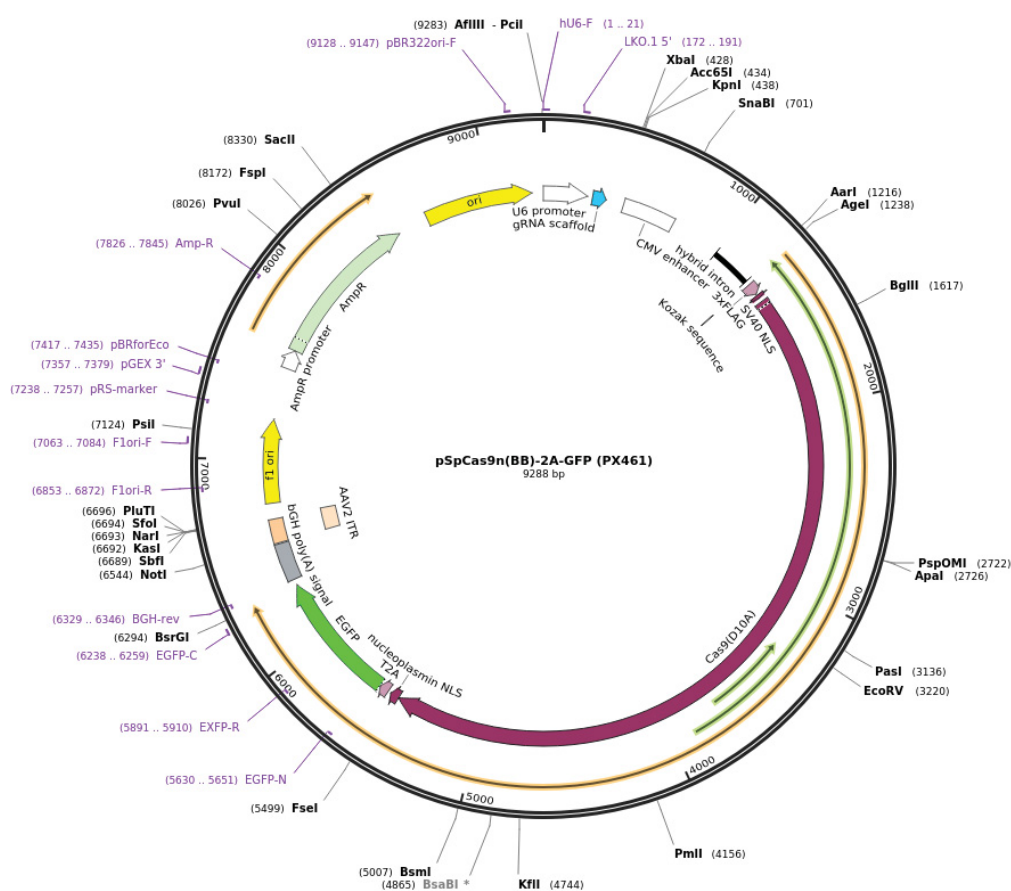


Figura 8: Diagrama do plasmídeo pX461. FONTE: Addgene, 2018.

4.3.2. Construção dos vetores carregando os RNAs guia (gRNA)

Para produzir as linhagens editadas, primeiramente foi necessário a construção dos plasmídeos carregando os gRNAs específicos para os genes de interesse (Figura 9).

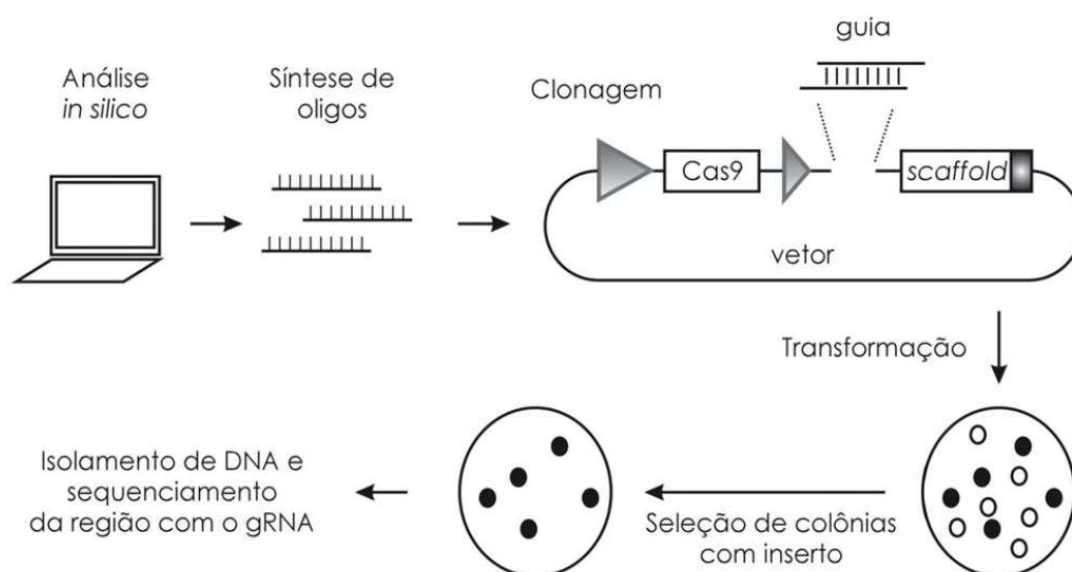


Figura 9: Etapas para a construção dos plasmídeos carregando as sequências dos gRNAs. FONTE: PEREIRA, 2016.

O processo foi iniciado com a análise das sequências gênicas de *EPHA2* e *PBX1*, com o objetivo de determinar as sequências que seriam utilizadas para a síntese dos gRNAs. Essa etapa foi realizada com o auxílio da ferramenta UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), priorizando sequências localizadas nos primeiros éxons, e que apresentassem *scores* altos de especificidade e eficiência. Além disso, considerando a utilização da Cas9n, a distância entre as sequências que dariam origem ao par de gRNAs para cada gene de interesse foram otimizadas seguindo as recomendações de Ran *et al.*, 2013a. Sendo assim, as sequências para a construção do sistema de expressão do complexo gRNA/Cas9n são apresentadas na Quadro 2.

Quadro 2: Lista das sequências de oligonucleotídeos, para a construção dos gRNAs de reconhecimento dos genes *EPHA2* E *PBX1*, utilizadas para a clonagem nos vetores PX461 e PX461 modificado.

Alvo	Sequência
<i>EPHA2 - a</i>	5' CACCG CAACTGGCTCCGCACCAACT 3'
	5' AAAC AGTTGGTGCGGAGCCAGTTGC 3'
<i>EPHA2 - b</i>	5' CACCG CACACGGAGTACATGTAGAT 3'
	5' AAAC ATCTACATGTACTCCGTGTGC 3'
<i>PBX1 - a</i>	5' CACCG TGTCCAGCCGCATCAGCTGG 3'
	5' AAAC CCAGCTGATGCGGCTGGACAC 3'
<i>PBX1 - b</i>	5' CACCG TGTTAGCGGAAGGCGTGGCG 3'
	5' AAAC CGCCACGCCTTCCGCTAACAC 3'

Legenda: Em vermelho estão os nucleotídeos adicionais para a montagem nos vetores PX461 e PX461 modificado.

Cada par de sequências de oligonucleotídeos foi fosforilado e anelado adicionando-se 1µL da sequência 1 do alvo a 100µM, 1µL da sequência 2 do alvo a 100µM, 0,5µL de tampão T4 1X, 1µL de T4 polinucleotídeo quinase (NEB) e 6,5µL de água. Essa solução foi incubada a 37°C por 30 minutos, seguido da incubação a 95°C por 5 minutos, e então a temperatura foi reduzida até 25°C, em uma taxa de 5°C por minuto. Posteriormente, as soluções obtidas foram diluídas a um fator 1:250.

Os plasmídeos PX461 e PX461 modificado foram digeridos com a enzima de restrição Anza™ 4 Bpil (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA) e purificados em gel de agarose. Em seguida, a extração dos plasmídeos do gel foi realizada utilizando o kit QIAquick Gel Extration Kit (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante.

Com os oligonucleotídeos fosforilados e anelados, e com os plasmídeos digeridos e purificados, prosseguiu-se com a reação de ligação, misturando-se 50ng do vetor digerido com 1µL dos oligos fosforilados e anelados 4µL de tampão T4 DNA ligase 5X, 1µL de T4 DNA ligase, e completando com água

ultra-pura para um volume total de 20µL. A solução foi deixada *overnight* e a temperatura ambiente. Os oligos *EPHA2-a* e *PBX1-a* foram ligados, separadamente, ao plasmídeo PX461 (GFP), enquanto os oligos *EPHA2-b* e *PBX1-b* foram ligados, separadamente, ao plasmídeo PX461 modificado (RFP). Essa estratégia foi adotada para facilitar a posterior seleção via FACS, uma vez que nosso objetivo é a recuperação das células contendo ambos os complexos gRNA/Cas9n (Figura 7), assim, buscamos as células que emitissem ambas as fluorescências verde e vermelha.

4.3.3. Transformação de bactérias e extração de DNA plasmidial

Após a reação de ligação, obtém-se uma mistura de plasmídeos com o oligo inserido, plasmídeos que se fecharam novamente sem a inserção do oligo, plasmídeos que se mantiveram abertos e residuais dos demais reagentes.

Sendo assim, para cada alvo (Quadro 2), 50µL de uma suspensão de bactérias *E. coli* da cepa DH5α competentes foram transformadas com 3µL da reação de ligação. Após 20 minutos de incubação em gelo, procedeu-se com um choque térmico de 40 segundos em termobloco a 42°C, seguidos de mais dois minutos de incubação em gelo. As bactérias transformadas foram recuperadas adicionando-se 1mL de meio LB 1X nos microtubos e as mantendo a 37°C por uma hora, sob agitação.

Em seguida, 100µL de cada suspensão foram plaqueados em meio LA contendo ampicilina, antibiótico necessário para selecionar as bactérias que foram, de fato, transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 37°C para o crescimento bacteriano por aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte, colônias bem isoladas foram inoculadas em 5mL de meio LB 1X suplementado com Ampicilina (100µg/mL) e cultivadas a 37°C, sob agitação, por aproximadamente 16 horas. Em seguida, o DNA plasmidial foi extraído por meio do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Essas etapas estão resumidamente representadas na Figura 10.

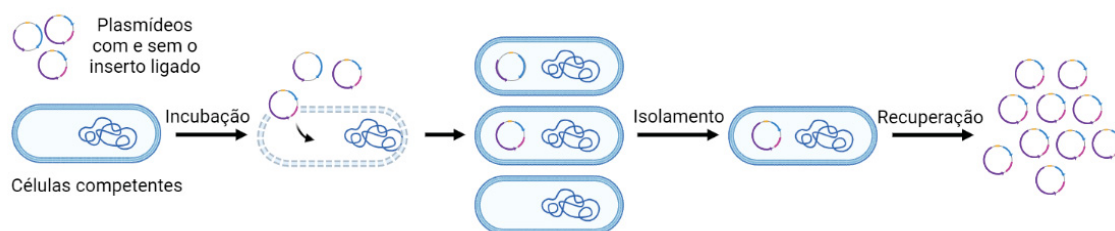


Figura 10: Transformação de bactérias competentes e extração do DNA plasmidial. FONTE: elaborada pela autora.

A inserção dos oligos foi confirmada por reação com enzimas de restrição, reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *polymerase chain reaction*) e sequenciamento de Sanger. Para as reações de restrição, foram utilizadas as enzimas Anza™ 4 Bpil (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA) e Apal (gentilmente cedida pelo ICC, Fiocruz-PR). Para as PCRs, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados estão apresentados nos Quadros 2 e 3. A confirmação dos clones foi realizada via sequenciamento de Sanger utilizando os *primers* apresentados no Quadro 3, e com o sequenciador ABI3730xl.

Quadro 3: *Primers* utilizados para a confirmação de inserção dos oligos nos vetores por PCR e por sequenciamento

Alvo	Sequência do <i>primer</i>
<i>hU6</i>	<i>Forward</i> : 5' GAGGGCCTATTTCCTGATT 3'
<i>CMV</i>	<i>Reverse</i> : 5' CCGTAAATACTCCACCCATTGA 3'

4.3.4. Transfecção dos vetores e seleção dos clones

Após a confirmação da inserção dos oligos nos vetores PX461 e PX461 modificado, estes foram transfectados nas células de câncer de mama MCF7, para expressão da Cas9n e dos gRNAs, e posterior seleção clonal via FACS (RAN *et al.*, 2013b) (Figura 11).

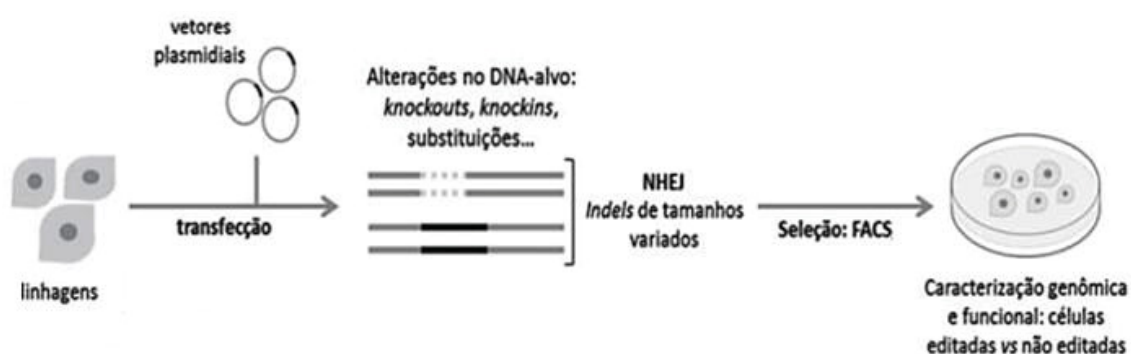


Figura 11: Transfecção dos vetores e seleção clonal via FACS. FONTE: Adaptado de PEREIRA, 2016.

Para a transfecção dos vetores plasmidiais, foi adotada a metodologia de transfecção direta. Dessa forma, foram plaqueadas $5,5 \times 10^5$ células por poço, em placas de seis poços. Após 24 horas, as transfecções foram realizadas conforme instruções do fabricante, sendo que o volume dos poços foi completado para 1mL com meio de cultivo DMEM, sem suplementação de FBS e antibióticos. As transfecções seguiram as estratégias apresentadas no Quadro 4. Decorridas mais quatro horas, o meio de cultivo foi substituído pelo meio DMEM/F12 suplementado. O reagente de transfecção utilizado foi a Lipofectamina 3000® (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

Quadro 4: Estratégias de transfecção dos plasmídeos

Alvo	Objetivo
<i>PBX1 - a</i>	Expressão de GFP - definição de parâmetros no citômetro
<i>PBX1 - b</i>	Expressão de RFP - definição de parâmetros no citômetro
<i>EPHA2 - a + EPHA2 - b</i>	Edição do gene <i>EPHA2</i>
<i>PBX1 - a + PBX1 - b</i>	Edição do gene <i>PBX1</i>

Após um período de 24 horas a partir da transfecção, as células foram removidas por dissociação enzimática com tripsina, centrifugadas e ressuspensas em PBS. O mesmo procedimento foi realizado com a linhagem MCF7 não-transfectada, para definição de parâmetros no citômetro.

As células transfectadas para expressão dos pares de gRNAs foram purificadas por *cell sorting*, em plataforma de citometria de fluxo (Fiocruz – RPT08L – ICC). Foram utilizadas duas placas de 96 poços para cada gene alvo (*EPHA2* e *PBX1*).

4.4. CONFIRMAÇÃO DE EDIÇÃO DOS GENES *EPHA2* E *PBX1*

Antes que se iniciassem os ensaios de confirmação de edição gênica e os ensaios funcionais com os clones obtidos a partir da seleção clonal, esses foram cultivados para expansão celular, de modo a manter um estoque das células editadas em potencial. Após essa etapa, as sequências de DNA das regiões alvo nos clones foram analisadas por sequenciamento de Sanger.

4.4.1. Extração de DNA e Amplificação gênica por PCR

O DNA genômico de todos os clones recuperados a partir da seleção clonal foram extraídos com o kit Bio Gene Extração de gDNA (Bioclin Quibasa), conforme instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por meio da leitura da densidade óptica, em NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, EUA).

Uma estratégia de PCR foi elaborada para iniciar a triagem dos clones com maior potencial de edição gênica (Figura 12). Foram desenhados *primers forward* e *reverse* que flanqueassem a região potencialmente editada, bem como um *primer forward* interno a essa região, para ambos os genes estudados (Tabela 1). No caso de edição gênica, espera-se que a região alvo tenha sido alterada a tal ponto que o *primer* interno não consiga reconhecer a sequência de DNA, impossibilitando que o segmento seja amplificado. Nesse caso, os *primers* flanqueadores funcionariam como um controle positivo da reação. Além disso, conforme o tamanho das mutações *indel*, poderia ser possível observar uma alteração no tamanho do *amplicon* esperado. Por outro lado, caso a região não tenha sido afetada, o *primer* interno reconheceria a sequência, possibilitando a amplificação da região. Essa é uma primeira etapa de triagem, uma vez que pequenas alterações na sequência nucleotídica ainda

são passíveis de reconhecimento por pareamento inespecífico do *primer* interno.

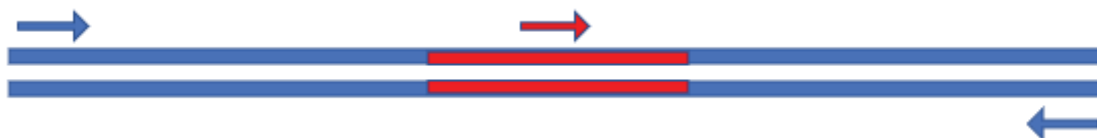


Figura 12: Estratégia de PCR para triagem dos clones com maior potencial de edição. As flechas indicam os *primers*, as regiões das quais eles são complementares e o sentido de polimerização. As duas barras horizontais indicam a dupla fita de DNA. Em vermelho está representada a região alvo para a edição gênica. FONTE: elaborada pela autora.

Tabela 1: Lista de *primers* utilizados e estratégia de combinação para a triagem de clones potencialmente editados via PCR.

Gene amplificado	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho da sequência amplificada
EPHA2	Forward: 5' CCTGCAGGCTCACAACTAAT 3'	505 pb
	Reverse: 5' AACAGGCGCTTCTGGAAGTT 3'	
EPHA2	Forward: 5' ACGTGATGTCTGGCGACCAAG 3'	205 pb
	Reverse: 5' AACAGGCGCTTCTGGAAGTT 3'	
PBX1	Forward: 5' TTGGAACAAAGCAAGTCCCTCC 3'	455 pb
	Reverse: 5' GGTGGTTCTGGTTACCTGCTC 3'	
PBX1	Forward: 5' GCTGGACAACATGCTGTTAGC 3'	205 pb
	Reverse: 5' GGTGGTTCTGGTTACCTGCTC 3'	

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para determinar se seriam encaminhados diretamente para as reações de purificação e sequenciamento, ou se seriam previamente clonados em vetor plasmidial.

4.4.2. Clonagem dos produtos de PCR e extração do DNA plasmidial

Para aqueles clones celulares que eram triados como potencialmente editados, o fragmento maior de DNA amplificado era clonado no vetor plasmidial pTZ57R/T, gentilmente cedido pela prof. Ana Claudia Bonatto, do

Laboratório de Interação Planta-Bactéria (LIPB – UFPR). Essa molécula de DNA recombinante era utilizada para transformar bactérias competentes, as quais seriam selecionadas e cultivadas para extração do DNA plasmidial.

O pTZ57R/T é um vetor pré-digerido e tratado com uma enzima para a adição de nucleotídeos deoxitimidina às terminações 3'-OH do DNA. Dessa forma, para ligar os fragmentos de interesse ao vetor, a reação de PCR era realizada no mesmo dia da clonagem, utilizando a enzima Taq DNA polimerase, de modo a garantir que a cauda poli-A – complementar à região poli-T do pTZ57R/T – não seria degradada. A reação de ligação era então realizada conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Protocolo de reação de ligação dos produtos de PCR ao vetor pTZ57R/T.

Etapa	Componente	Quantidade	Condições
1	pTZ57R/T (55 ng/ μ L)	0,5 μ L	65°C, 10min
	Produto da PCR	5 μ L	
	Água ultrapura	3 μ L	
2	Tampão T4 DNA Ligase 10X	1 μ L	Temperatura ambiente, overnight
	T4 DNA Ligase	0,5 μ L	

O volume total das reações de ligação (10 μ L) foi utilizado para transformar 100 μ L de uma suspensão de bactérias *E. coli* da cepa DH5 α competentes. As células ficavam incubadas por 20 minutos no gelo, seguidos de um choque térmico de 40 segundos a 42°C, e mais dois minutos de incubação em gelo. As bactérias transformadas foram recuperadas adicionando-se 400 μ L de meio LB 1X nos microtubos e as mantendo a 37°C por uma hora, sob agitação.

Em seguida, 180 μ L da suspensão foram plaqueados em meio LA contendo ampicilina em uma concentração de 250 μ g/mL, e X-Gal em uma concentração de 30 μ g/mL, para selecionar as bactérias transformadas e com o DNA recombinante, respectivamente. As placas foram mantidas em estufa a

37°C para o crescimento bacteriano por aproximadamente 16 horas. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5mL de meio LB 1X suplementado com ampicilina (250µg/mL) e cultivadas a 37°C, sob agitação, por aproximadamente 16 horas.

Para a extração do DNA plasmidial, 1mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 14500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 150µL de tampão GET (glicose 50mM, EDTA 10mM, Tris HCl pH 8,0 25mM), seguido da adição de 150µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18M) e homogeneização. Após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com 150µL de KacF (acetato de potássio 3M, ácido fórmico 1,8M, pH 4,8), misturando-a por inversão e a incubando por 10 minutos no gelo. Depois desse período, foram adicionados 50µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguido de agitação por vórtex. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 14500 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA foi precipitado adicionando-se 1mL de etanol absoluto e centrifugando por 10 minutos a 14500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial foi lavado com etanol 80% seguida de uma nova centrifugação por cinco minutos, na mesma velocidade. O DNA foi seco a temperatura ambiente e então dissolvido em 15µL de água ultrapura.

O DNA plasmidial recuperado foi utilizado em uma nova PCR com os oligonucleotídeos iniciadores que levam à síntese dos fragmentos maiores de *EPHA2* e *PBX1* (Tabela 1). Após a confirmação da reação via eletroforese em gel de agarose 1%, o produto era purificado e sequenciado.

4.4.3. Purificação

Após a reação de amplificação por PCR, utilizando os *primers* que levam à obtenção dos fragmentos maiores de *EPHA2* e *PBX1* (Tabela 1), encontram-se em solução, além do fragmento de DNA de interesse, os *primers* não hibridizados, dNTPs não utilizados, enzimas, componentes do tampão e

resíduos de DNA de fita simples que possam ter sobrado ou se originado na reação de amplificação anterior.

A presença dos *primers* não hibridizados e dos dNTPs pode comprometer a análise do sequenciamento (WERLE et al., 1994). Assim, os fragmentos de DNA de interesse devem ser primeiramente purificados. A purificação foi realizada por meio do método enzimático com as enzimas exonuclease I (EXO I) e fosfatase alcalina de camarão (do inglês, *Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) (WERLE et al., 1994). A enzima EXO I é responsável por degradar os *primers* e qualquer DNA de fita simples residual. A SAP desfosforila os dNTPs que se encontram em solução. As enzimas, diluídas em solução tampão, são adicionadas diretamente aos produtos da PCR (Tabela 3) e incubadas a 37°C por um período 60 minutos, seguido de inativação a 80°C por 15 minutos.

Tabela 3: Protocolo de reação para a purificação dos produtos de PCR.

Componente	Volume
EXO I a 10 U/ μ L	1,0 μ L
SAP a 1 U/ μ L	2,0 μ L
Tampão SAP 10X	1,0 μ L
Produto de PCR	6,0 μ L

4.4.4. Sequenciamento

As amostras purificadas foram submetidas à reação de sequenciamento com o Kit BigDye™ Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*) e os mesmos *primers* que foram utilizado nas PCRs (Tabela 1, *primers* para as regiões flanqueadoras). Todavia, as reações de sequenciamento foram realizadas com cada *primer* separadamente.

O protocolo das reações de sequenciamento está descrito na Tabela 4. As condições de ciclagem dos fragmentos que não foram submetidos à clonagem molecular estão descritas na Tabela 5, enquanto as condições para

os fragmentos que passaram pela etapa de clonagem molecular estão descritas na Tabela 6.

Tabela 4: Protocolo da reação de sequenciamento dos produtos de PCR purificados.

Componente	Volume
Tampão de sequenciamento 5X	1,0 μ L
<i>BigDye Terminator</i>	0,7 μ L
Primer a 10 μ M	0,7 μ L
Produto de PCR purificado	2,0 μ L
Água ultrapura	5,6 μ L

Tabela 5: Condições de ciclagem das reações de sequenciamento dos produtos de PCR purificados que não passaram por clonagem molecular.

Número de ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
25	Desnaturação	95°C	20 segundos
	Anelamento	50°C	15 segundos
	Alongamento	60°C	1 minuto

Tabela 6: Condições de ciclagem das reações de sequenciamento dos produtos de PCR purificados que passaram por clonagem molecular.

Número de ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	3 minutos
35	Desnaturação	95°C	20 segundos
	Anelamento	60°C	15 segundos
	Alongamento	60°C	2,5 minutos

Após as reações de sequenciamento, os produtos eram precipitados. A precipitação dos fragmentos de tamanhos distintos marcados pelos terminadores fluorescentes é importante para eliminar, no sobrenadante, os *primers* e os terminadores fluorescentes residuais. Assim, 2,5 μ L de EDTA 125mM e 25 μ L de etanol absoluto eram adicionados à reação, seguidos de

centrifugação a 2000g, por 30 minutos e *spin* invertido. Os fragmentos precipitados eram então lavados com 50 µL de etanol 80%, seguido de mais uma etapa de centrifugação a 2000g, por 5 minutos e *spin* invertido. O etanol residual era evaporado em termociclador, a 60°C, durante 5 minutos. Ao produto precipitado e seco foi adicionado 12µL de formamida para desnaturação das fitas de DNA no termociclador, a 95°C, durante dois minutos, seguido de choque térmico no freezer -80°C durante 40 segundos, a fim de estabilizar as fitas separadas para seu sequenciamento pela metodologia de Sanger em sequenciador ABI3500 (*Applied Biosystems*).

4.5. EXTRAÇÃO DE RNA

As células transfectadas com siPBX1 ou com NC foram coletadas de poços em placas de seis poços 48 horas após a transfecção por dissociação enzimática com tripsina, seguida de centrifugação para recuperação dos *pellets* celulares. O tempo de 48 horas foi definido a partir de testes que comprovaram um silenciamento eficiente nessa condição. Foram realizadas pelo menos três replicatas biológicas independentes para cada condição (siPBX1 ou NC).

As células com o gene *PBX1* editado via tecnologia CRISPR/Cas9, bem como a linhagem MCF7 selvagem, foram cultivadas em garrafas de cultivo celular e removidas por dissociação enzimática com tripsina para obtenção de *pellet* celular após centrifugação. Para cada clone com o *PBX1* editado, bem como para seu controle (linhagem MCF7), foram coletadas as triplicatas biológicas independentes.

Os *pellets* obtidos eram ressuspensos em 1 mL de TRIzol™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA) para extração do RNA total de acordo com instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi mensurada por meio da leitura da densidade óptica, em NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, EUA). O RNA total obtido foi submetido à transcrição reversa (RT – do inglês, *reverse transcription*) seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR – do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*) para

análise da expressão, em nível de mRNA, de *PBX1* e seus potenciais alvos de regulação gênica.

4.6. RT-PCR QUANTITATIVA

4.6.1. Transcrição reversa

Previamente às reações de transcrição reversa, o material obtido a partir da extração de mRNA foi tratado com DNase I (EN0521, ThermoFisher Scientific, EUA) conforme as instruções do fabricante, para a remoção de DNA dupla fita residual.

Em seguida, as reações de transcrição reversa foram realizadas em duas etapas (Tabela 7), utilizando-se o kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA), para conversão de mRNA em cDNA.

Tabela 7: Etapas 1 e 2 na produção de cDNA.

Etapa	Componente	Volume	Condições
1	dNTP (10nM)	1 µL	65°C, 5min 4°C, 2min
	Random Primers	1 µL	
	RNA tratado com Dnase I (1µg)	12 µL	
2	Mistura da etapa 1	14 µL	25°C, 5min 50°C, 60min 70°C, 15min
	Tampão 5X	4 µL	
	DTT (0,1M)	1 µL	
	SuperScript™ III RT (200U/µL)	0,5 µL	
	Rnase Out (5000U)	0,5 µL	

4.6.2. PCR quantitativa

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para a mensuração dos mRNA foram conduzidas com *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do

fabricante. Para isso, foram utilizados *primers* específicos para os genes de interesse e para dois genes controle (*housekeeping*) (*GUSB* e *HPRT*) (Quadro 5). O termociclador utilizado foi o *Viiia 7 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). Todas as reações foram realizadas em triplicata técnica, conforme o protocolo descrito na Tabela 8. Para estimar o nível de expressão dos genes avaliados, os dados de RT-qPCR foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ com o *software* QuantStudio™ Real-Time v1.3 (ThermoFisher Scientific, EUA).

Quadro 5: Lista de *primers* utilizados para as qPCRs.

Gene amplificado	Sequência do <i>primer</i>
CD44	Forward : 5' CCAGACGAAGACAGTCCCTG 3'
	Reverse : 5' TCTTGCCTCTTGGTTGCTGT 3'
CD46	Forward : 5' AGCACGATTTATTGTGGTGACA 3'
	Reverse : 5' TCGCTGCCATCGAGGTAAAA 3'
CDKN1A	Forward : 5' AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC 3'
	Reverse : 5' GCATGGGTTCTGACGGACAT 3'
PBX1	Forward : 5' TCGTTCCCGATTTCTGGAT 3'
	Reverse : 5' AGACTGTGATGCCACACTTC 3'
SPINT2	Forward : 5' GCCAGCTGTTTGTGTATGGG 3'
	Reverse : 5' CTGCCTTCTGGGAGCACTT 3'
STK4	Forward : 5' AGGAAAGCCCCCTTATGCTG 3'
	Reverse : 5' TTTCGGAATGTGGGAGGAGG 3'
GUSB	Forward : 5' GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT 3'
	Reverse : 5' CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA 3'
HPRT	Forward : 5' TGAGGAATTTGGAAAGGGTGT 3'
	Reverse : 5' GAGCACACAGAGGGCTACAA 3'

Tabela 8: Condições de ciclagem para as reações de qPCR.

Número de ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	Ativação da UDG	50°C	2 minutos
	Dual-Lock DNA polimerase	95°C	10 minutos
40	Desnaturação	95°C	15 segundos
	Anelamento/Extensão	60°C	1 minuto

4.7. WESTERN BLOTTING

A técnica de *Western Blotting* (WB) foi utilizada para a análise quantitativa da proteína codificada pelo gene *PBX1* nos ensaios de silenciamento. Todos os ensaios foram realizados em, ao menos, três replicatas independentes.

Após a coleta das células, foi realizada a extração de proteínas totais com tampão de lise (Tris 20mM, NaCl 137mM, triton 1%, EDTA 2mM, PMSF 0,002M, pH 8,0). As proteínas foram quantificadas com base no método do triptofano (WIŚNIEWSKI & GAUGAZ, 2015), com leitura da fluorescência em um leitor de placas (BioTek, USA) com parâmetros de emissão 350nm e de excitação 295nm. As concentrações dos extratos proteicos foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente preparada.

Foi utilizado um sistema vertical de eletroforese (Bio-Rad, EUA) para o WB, no qual as amostras eram aplicadas em um sistema com dois géis *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), sendo o gel inferior destinado à separação das proteínas, e o gel superior para empilhamento.

Previamente à aplicação da amostra no gel, um volume de extrato contendo 65µg de proteína foi misturado em tampão de amostra (Tris-HCl 40mM, SDS 1%, beta-mercaptoetanol 2,5%, Glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%) e levado à desnaturação a 95°C, por cinco minutos. A corrida eletroforética foi realizada a 110V por aproximadamente 2h30. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE

Healthcare Life Science) por um sistema de transferência imerso (West-i10 – Locus), a 100V, no gelo por duas horas. As membranas foram coradas com solução de Ponceau (Sigma-Aldrich, EUA) para confirmar que as proteínas foram devidamente transferidas. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com *Tris Buffered Saline with Tween® 20* (TBST) para a remoção do corante Ponceau. Prosseguiu-se com o bloqueio da membrana com leite 5% em TBST por 40 minutos, sob agitação, seguido de lavagem com TBST e incubação, por aproximadamente 16 horas, com anticorpos primários de coelho, anti-humano, específicos para PBX1 (#PA5-17223, Invitrogen) ou beta-actina (controle endógeno, #PA1-183, Invitrogen), todos diluídos em TBST-BSA 5%, em uma concentração de 1:1000.

Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada três vezes com TBST e incubada com anticorpo secundário de cabra, anti-coelho, conjugado com HRP (*Horseradish Peroxidase*), para detecção por quimioluminescência (#7074, Cell Signaling), diluído em TBST-BSA 5%, em uma concentração de 1:2000, sob agitação em gangorra, por uma hora. Após a lavagem, as proteínas foram detectadas utilizando-se o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific, EUA), com captura de imagem por meio do fotodocumentador Amersham Imager 680 Blot (GE Healthcare Life Science).

4.8. VIABILIDADE CELULAR

Ensaio funcionais de viabilidade celular foram conduzidos tanto nas células cujo gene *PBX1* estava silenciado quanto nas células cujos genes *EPHA2* ou *PBX1* estavam editados, utilizando sempre os respectivos controles.

Após seis horas da transfecção em placas de seis poços, ambas as células tratadas com siPBX1 ou NC foram plaqueadas, em quintuplicata técnica, em placas de 96 poços. As células da linhagem ZR-75-1, foram plaqueadas em uma concentração de 5000 células por poço, enquanto a concentração selecionada para a linhagem MCF7 foi de 3500 células por poço. Como as edições de *EPHA2* e de *PBX1* foram realizadas em MCF7, as células

editadas via tecnologia CRISPR/Cas9 e as células selvagens também foram plaqueadas em uma concentração de 3500 células por poço, em quintuplicata técnica e em placas de 96 poços.

A viabilidade celular relativa foi mensurada empregando-se o método da resazurina após 24, 48, 72, 96 e 120 horas da transfecção ou do plaqueamento, no caso das células editadas. A resazurina é um composto não-fluorescente, de coloração azul intensa que é reduzido à resofurina, de coloração rosa, em células metabolicamente ativas (Figura 13). Para isso, o meio de cultivo era removido e substituído por uma solução composta por 90% meio DMEM suplementado e 10% de uma solução de resazurina inicialmente a 0,25 mg/mL. As células eram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por mais quatro horas. Em seguida, a absorbância era lida nos comprimentos de onda 570nm e a 600nm em leitor de microplacas para posterior análise (Figura 13). Todos os ensaios foram realizados com pelo menos três replicatas biológicas independentes.

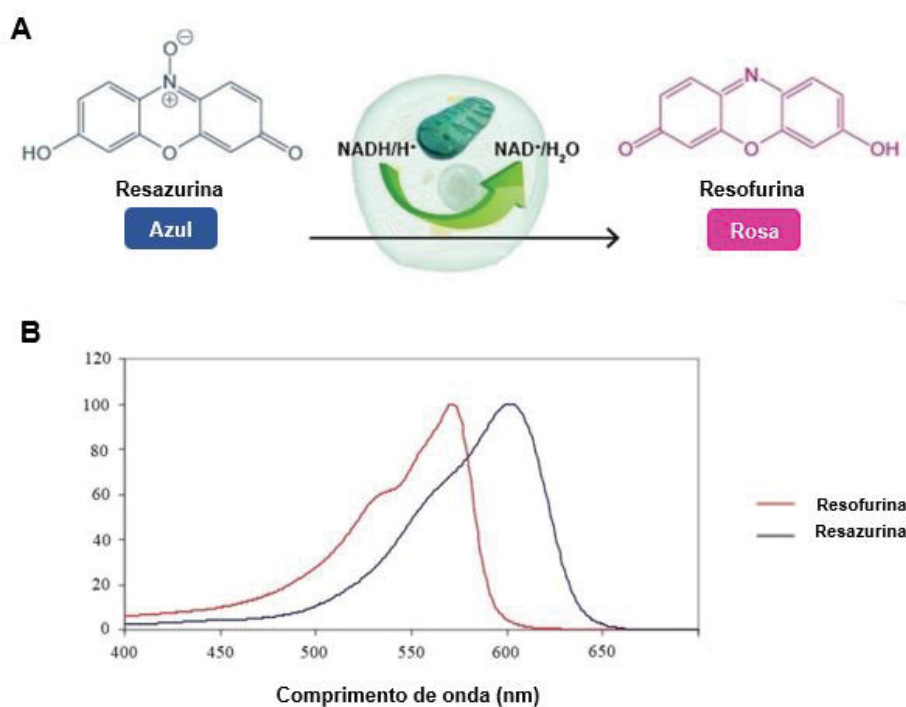


Figura 13: Base do método da resazurina. **A:** a resazurina, de cor azul intensa, é reduzida à resofurina, de coloração rosa, devido ao metabolismo celular, sendo assim um indicativo de viabilidade. **B:** A absorvância do meio é lida em 570 e 600nm, correspondentes ao pico obtido pela resofurina e pela resazurina, respectivamente. FONTE: Adaptado de Coelho, 2018.

4.9. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Após o ensaio de viabilidade, a mesma placa de 96 poços era utilizada para o ensaio de proliferação celular. Dessa forma, o ensaio também foi conduzido em quintuplicata técnica e em, pelo menos, três replicatas biológicas independentes para todas as condições.

Para o ensaio de proliferação celular, o meio de cultivo com resazurina/resofurina era removido e as células eram fixadas com solução de metanol absoluto por 15 minutos. Essas células eram posteriormente coradas com uma solução de cristal violeta a 0,25 mg/mL em água ultrapura e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. A solução era então removida e os poços eram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, 100µL de uma solução de extração (ácido acético glacial a 33% em água ultrapura) era adicionada às células, incubando-as por 20 minutos de modo a permitir a homogeneização do corante na solução de extração. A absorbância da solução de extração com o corante era medida em leitor de microplacas a 570nm.

Todavia, para que fosse possível analisar os valores de absorbância, previamente aos ensaios de proliferação, procedeu-se com a construção de uma curva padrão para as linhagens trabalhadas durante essa pesquisa: MCF7 e ZR-75-1. Para a MCF7, foi preparada uma suspensão celular na concentração de 640 mil células/mL, procedendo-se com uma diluição seriada no fator 1:2, até que se alcançasse a concentração de 20 mil células/mL, obtendo-se seis suspensões diferentes. Para a ZR-75-1, foi realizado o mesmo procedimento, mas se partindo de uma concentração inicial de $1,28 \times 10^6$ células/mL, obtendo-se ao final sete suspensões com concentrações distintas. Para ambas as linhagens, foram plaqueados, em placas de 96 poços, 100µL de cada suspensão em quintuplicata técnica. Após um período de oito horas, quando as células já estavam aderidas, o meio de cultivo era removido, prosseguindo-se com os passos descritos no parágrafo anterior. Dessa forma, como a quantidade de células em cada poço era conhecida, foi possível determinar uma equação que relacionasse os valores de absorbância com o número de células para cada linhagem.

4.10. CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Os ensaios funcionais de capacidade clonogênica foram realizados nas células silenciadas para o gene *PBX1*, bem como nas células nas quais os genes *EPHA2* ou *PBX1* estavam editados, sempre comparando os resultados com os respectivos controles.

Após seis horas da transfecção, ambas as células tratadas com siPBX1 ou NC foram plaqueadas, em triplicata técnica e em placas de seis poços, a uma concentração de 500 células por poço. No caso das linhagens submetidas à edição gênica via CRISPR/Cas9, após chegar em aproximadamente 80% de confluência, as células editadas e seu controle (MCF7 selvagem) eram plaqueadas da mesma forma que nos ensaios de silenciamento.

As células da linhagem MCF7 foram cultivadas por 15 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂, enquanto as células ZR-75-1 foram cultivadas por 28 dias, sob as mesmas condições. Transcorrido esses períodos, o meio de cultivo era removido e as células eram fixadas com metanol absoluto por cinco minutos. Em seguida, as colônias eram coradas com solução de cristal violeta a 0,25 mg/mL em água ultrapura e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. A solução era então removida e os poços eram lavados com PBS duas vezes, de modo a remover o excesso de corante. O número de colônias observadas era contado para posterior análise estatística. Esses ensaios eram realizados em, no mínimo, três replicatas biológicas independentes.

4.11. RESISTÊNCIA AO TAMOXIFENO

Por se tratar de um MSRE, o tamoxifeno é um dos principais medicamentos utilizados como terapia endócrina contra os cânceres de mama luminais. Todavia, durante o tratamento endócrino contínuo e prolongado, frequentemente os tumores desenvolvem resistência ao tamoxifeno (WARDELL *et al.*, 2015; JORDAN, 2018; revisado por BARAZETTI *et al.*, 2021). EphA2 e PBX1 são potenciais candidatos a moduladores da resposta ao tamoxifeno (LU *et al.*, 2003; Oliveira, 2018). Dessa forma, a viabilidade celular após o tratamento com tamoxifeno em diversas concentrações foi analisada,

tanto nas células tratadas com siPBX1 quanto nas células editadas via tecnologia CRISPR/Cas9.

Para as células tratadas com siRNA (siPBX1 e NC), após seis horas da transfecção em placas de seis poços, as células foram plaqueadas, em quintuplicata técnica, em placas de 96 poços. As células da linhagem MCF7 foram plaqueadas em uma concentração de 5000 células por poço, enquanto a linhagem ZR-75-1 foi plaqueada a 7000 células por poço. Por serem originárias da MCF7, as células editadas e seus controles também foram plaqueadas em uma concentração de 5000 células por poço, em quintuplicata técnica e em placas de 96 poços.

As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e, ao final das 24 horas da transfecção ou do plaqueamento das células editadas, o meio de cultivo era substituído por um meio contendo tamoxifeno em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 20 e 40 µM) ou por um meio contendo DMSO (controle), visto que a solução estoque de tamoxifeno foi preparada diluindo-o em DMSO. Nos resultados, o controle será apresentado como concentração 0 µM de tamoxifeno.

A viabilidade celular relativa foi mensurada empregando-se o método da resazurina, conforme descrito na seção “4.8. Viabilidade celular”, após 72 e 96 horas de tratamento. Todos os ensaios foram realizados em ao menos três replicatas biológicas independentes.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de expressão de mRNA e de proteínas, bem como os dados provenientes dos ensaios funcionais (viabilidade celular, proliferação celular, capacidade clonogênica e resistência ao tamoxifeno) foram avaliados por meio do teste t não pareado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises e gráficos foram realizados com o programa GraphPad Prism 7.04.

5. CAPÍTULO I

Os resultados e as discussões desse trabalho foram divididos em quatro capítulos. O Capítulo I apresenta um artigo científico, intitulado ***Targeting EphA2: a promising strategy to overcome chemo-resistance and drug resistance in cancer***. Trata-se de uma revisão bibliográfica sobre a resistência a diferentes classes de medicamentos contra o câncer, induzida por um aumento de expressão do receptor EphA2. Nessa revisão, foram investigados, principalmente, os tipos de câncer que são responsáveis pelos maiores números de óbitos relacionados ao processo neoplásico na população mundial. Ainda, foram exploradas algumas alternativas medicamentosas que tem como alvo específico o EphA2. Esse artigo sugere que o EphA2 está envolvido com a progressão e agressividade carcinogênica, além de ser um potencial modulador da resistência à terapia. Ainda, o artigo aponta que os tumores que super expressam esse receptor podem se beneficiar de terapia-alvo contra o EphA2, principalmente em regimes de terapia combinada, independentemente de terem alcançado um estágio de resistência à terapia convencional. Esse artigo foi submetido à revista *International Journal of Molecular Sciences* em outubro de 2022 e já passou por dois ciclos de revisão, a pedido dos revisores. A versão apresentada é a mais atual. O manuscrito está formatado conforme as normas da revista.

Targeting EphA2: a promising strategy to overcome chemoresistance and drug resistance in cancer

Rafaela Nasser Veiga¹, Jaqueline Carvalho de Oliveira^{1*}, Daniela Fiori Gradia¹

¹Laboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Postgraduate Program in Genetics. Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Rua Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100, Jardim das Américas, CEP 81531-980, Curitiba, Brazil.

* Corresponding author: Jaqueline Carvalho de Oliveira jaqueline.carvalho@ufpr.br

ABSTRACT

Erythropoietin-producing hepatocellular A2 (EphA2) is a vital member of the Eph tyrosine kinase receptor family and has been associated with developmental processes. However, it is often overexpressed in tumors and correlates with cancer progression and worse prognosis due to the activation of its noncanonical signaling pathway. Throughout cancer treatment, the emergence of drug-resistant tumor cells is relatively common. Since the early 2000s, researchers have focused on understanding the role of EphA2 in promoting drug resistance in different types of cancer, as well as finding efficient and secure EphA2 inhibitors. In this review, the current knowledge regarding induced resistance by EphA2 in cancer treatment is summarized, and the types of cancer that lead to the most cancer-related deaths are highlighted. Some EphA2 inhibitors were also investigated. Regardless of whether the cancer treatment has reached a drug resistance stage in EphA2-overexpressing tumors, once EphA2 is involved in cancer progression and aggressiveness, targeting EphA2 is a promising therapeutic strategy, especially in combination with other target-drugs for synergistic effect. For that reason, monoclonal antibodies against EphA2 and inhibitors of this receptor should be investigated for efficacy and drug toxicity.

Keywords: EphA2; chemoresistance; drug resistance; cancer

INTRODUCTION

Ephs receptors and ephrins

In the late 1980s, Hirai et al. [1] identified and characterized an Erythropoietin-producing hepatocellular (Eph) receptor tyrosine kinase (RTK) by molecular cloning. As its particular features could distinguish the receptor from the RTKs known so far, it was suggested that this Eph receptor should belong to a new class of RTKs [1]. Since then, other Eph receptors have been identified, and the 16 Eph receptors currently known comprise the largest family of tyrosine kinase receptors [2,3]. Based on their sequence homology and their interaction with ephrin ligands, these receptors are subdivided into two classes: EphA and EphB [3]. In humans, 14 Eph receptors have been identified [3], although two of them — EphB6 and EphA10 — are tyrosine pseudokinases [4].

Being RTKs, Eph receptors display three regions: an extracellular region (ECR), a transmembrane domain (TM) and an intracellular region (ICR) (Figure 1). The ECR consists of a ligand-binding globular domain, a cysteine-rich region and two fibronectin type-III repeats [5]. The ICR comprises four main structures: a juxta membrane (JM) motif, a tyrosine kinase (TK) domain, a sterile alpha motif (SAM) and a PDZ-domain binding motif (PDZBM). The highly conserved JM motif contains two tyrosine residues that act as autophosphorylation sites for Eph receptors [6,7]. The SAM domain is in charge of performing protein-protein interaction with other SAM domains or with SH2-containing proteins through the phosphorylation of a conserved tyrosine [8–10]. Due to its mechanism, the SAM domain possibly promotes homo- and hetero-oligomerization and clustering [9,10]. Through its interaction with PDZ domain-containing proteins, the C-terminal PDZBM acts in the localization and clustering of Eph receptors on the surface of the cell [11,12].

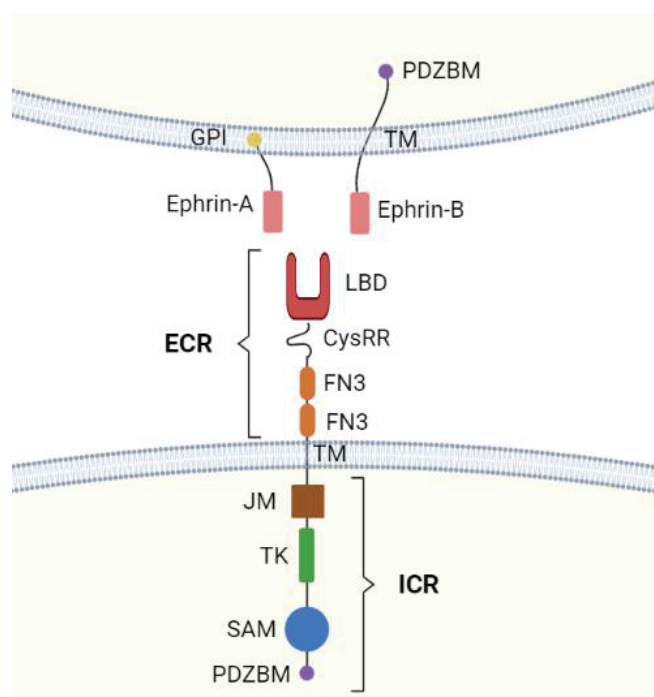


Figure 1: **Eph receptor and ephrins.** Cell-to-cell interaction through an Eph receptor and ephrins, highlighting their domains. ECR: extracellular region; LBD: ligand binding domain; CysRR: cysteine-rich region; FN3: fibronectin type-III repeats; TM: transmembrane domain; ICR: intracellular region; JM: juxta membrane motif; TK: tyrosine kinase domain; SAM: sterile alpha motif; PDZBM: PDZ-domain binding motif; GPI: glycosylphosphatidylinositol. This figure was created with BioRender.com.

The Eph receptor ligands — the ephrins — are also divided into two subclasses: ephrin-A and ephrin-B ligands (Figure 1). Unlike other RTK ligands, which are soluble, ephrins are anchored to the cell or exosome membranes [13,14]. While type A ephrins are tethered by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) molecule, type B ephrins have a transmembrane domain [2]. However, soluble forms of ephrin-A1 have been identified *in vitro* [15,16] and *in vivo* [15] and were shown to activate EphA2 receptors in cancer. Preferentially, but not exclusively, EphA receptors bind to ephrin-A ligands and EphB receptors bind to ephrin-B ligands [2]. Although ephrins are main ligands of Eph receptors, the progranulin growth factor [17] has been implicated in the activation of Eph receptors.

Eph-ephrin binding is followed by oligomerization and clustering, which might involve diverse combinations of Eph receptors and ephrins [4,18]. This complex nature of Eph-Ephrin clusters leads to different downstream signaling outcomes [4,18]. It is interesting that once both Eph receptors and ephrins are anchored to the surface of cells, Eph-ephrin complexes act in cell communication, promoting bidirectional signaling [2,4]. The signals emanating from the Eph receptor-presenting cell are called forward signals, while those emanating from the ephrin-expressing cell are known as reverse signals [2,4]. Forward signaling usually relies on the kinase activity of the catalytic domain, after the ligand-dependent activation of the receptor, although there is evidence that Eph receptors also have non-catalytic [19] and ligand-independent functions [20,21]. Once type B ephrins have a transmembrane domain followed by a short cytosolic tail, which harbors tyrosine residues that could potentially be phosphorylated, ephrin B ligands promote reverse signaling similar to that of membrane receptors [22]. In addition, there is growing evidence of reverse signaling promoted by type A ephrins, though they do not present an intracellular domain [23].

Just like other RTK families, Eph receptors are known for their involvement in several cellular processes, such as cell migration [20], adhesion [24], repulsion [25], proliferation [26], differentiation [27] and morphogenesis [17]. They have been associated with the development of the nervous system [28–31], female reproductive tract processes [25,32,33], tissue repair (Reviewed in Wu et al. [34]), immunity (Reviewed in Darling & Lamb [35]), vasculogenesis and angiogenesis [36–39].

EphA2

EphA2 is a vital member of the Eph receptors. It was first identified in the screening of a HeLa cell cDNA library by Lindberg & Hunter [40], who used degenerated oligonucleotides designed to hybridize highly conserved regions of tyrosine kinase proteins. Due to its presence in epithelial cells, it was first named Eck, standing for epithelial cell kinase [40]. In humans, the gene which encodes EphA2 (*EPHA2*) maps to chromosome 1p36.1 [41].

EphA2 binds with ephrin-A1, -A2, -A3, -A4, -A5 [35,42–44] and progranulin [17]. Physiological functions of this member of the Eph receptor family include important roles in lens development [45,46], bone remodeling [47] and mammary gland branching morphogenesis [48]. However, an altered expression of RTK or pathological mutations and polymorphisms in RTK genes are frequently present in many tumors. For this reason, the role of EphA2 in tumorigenesis began to be investigated soon after its identification.

EphA2 exhibits a complex and bidirectional behavior throughout cancer development and progression. An overexpression of EphA2 in mRNA and protein levels was observed in many types of cancers, considering both tumor and cancer cell lines [49–52]. In a carcinogenic context, *EPHA2* was reported as an oncogene both *in vitro* and *in vivo*, since the receptor promotes proliferation [53], migration [54,55], invasion [54–56], metastasis [55] and cancer stem properties [55]. In addition, an overexpression of EphA2 was also associated with a decrease in overall and recurrence-free survival [57]. Although the expression of EphA2 was positively associated with proliferation in lung cancer [58], it was also found that it acts as a tumor suppressor, since EphA2 inhibits *KRAS* expression and consequently inactivates ERK1/2 MAP kinase signaling pathway, thus keeping the lung cancer cell in an antiproliferative state [59]. A possible reason for this bidirectional behavior of EphA2 concerns how this receptor is activated (Figure 2).

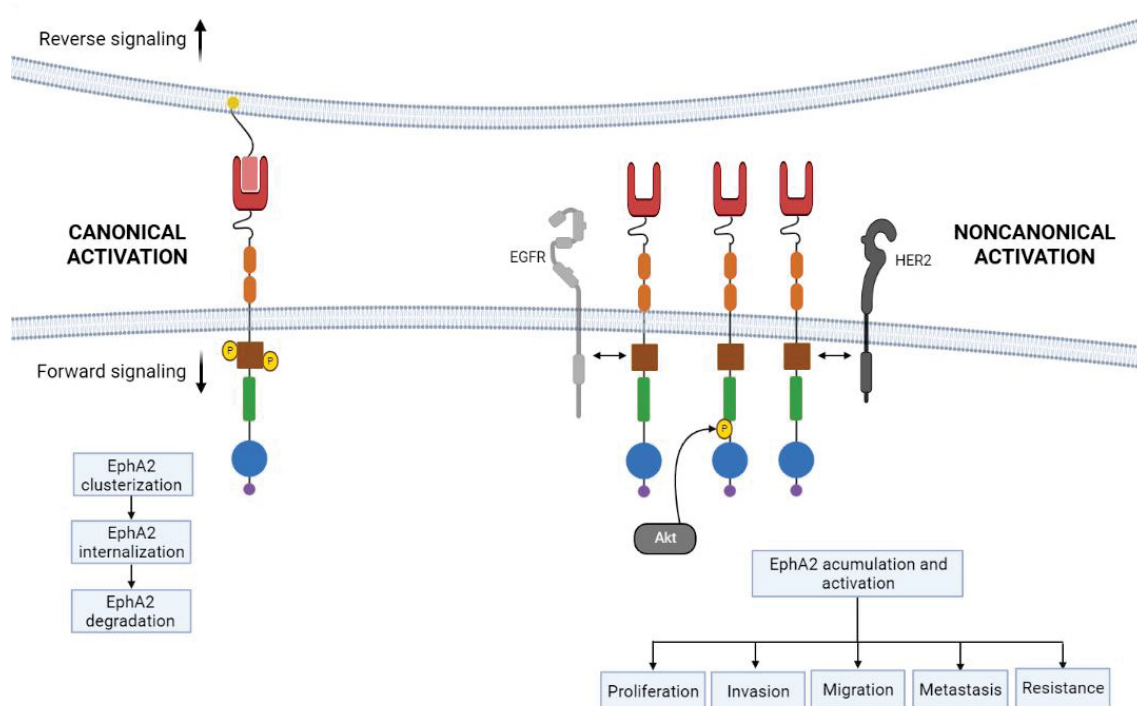


Figure 2: EphA2 activation. On the left: canonical activation of EphA2 by ephrin binding promotes a bidirectional signal: the ephrin initiates the reverse signaling pathway, while the tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region (brown) activates the forward signaling inside the EphA2-expressing cell. Forward signaling usually leads to partial EphA2 clusterization, internalization and degradation, which balances EphA2 expression. On the right: reduced expression of ephrins, EphA2 overexpression, EphA2 interaction with some cell receptors or the phosphorylation of serine 897 in EphA2 by Akt or other kinases might lead to noncanonical activation. Noncanonical activation might contribute to important oncogenic processes such as cell proliferation, invasion, migration, metastasis and drug resistance. This figure was created with BioRender.com.

The canonical activation of EphA2 depends on ephrin binding and it seems to exert a protective role against cancer development and progression. EphA2 activation with Ephrin A1 inhibited the Ras/ERK1/2/MAPK cascade and reduced cell proliferation in several cell types, including cancer cells [60,61]. In addition, Ephrin A1-EphA2 binding leads to EphA2 autophosphorylation, which promotes co-clusterization and the

association between EphA2 and c-Cbl, followed by the internalization of this complex and EphA2 degradation [62].

On the other hand, when activated by a noncanonical pathway, EphA2 might act as an oncoprotein. The noncanonical activation is ephrin-independent and requires the phosphorylation of EphA2 at serine 897 by Akt, PKA, RSK and other kinases [20,63,64]. When progranulin binds to EphA2, it evokes an Akt/Erk1/2 positive feedback loop that leads to Ser897 phosphorylation and promotes cell motility, anchorage-independent growth and cisplatin-resistance in bladder cancer cells [65]. Evidence suggests that the interaction between EphA2 and other cell receptors, such as EGFR and HER2, might also lead to a noncanonical EphA2 activation [66,67]. Kim et al. [68] demonstrated that EGFR and EphA2 directly interact through the RR domain in EGFR and the kinase domain in EphA2. The EGFR/Ras pathway activates Akt, which induces EphA2 phosphorylation at Ser897 and promotes binding to EGFR in the presence of Ephexin1, leading to tumor progression [68]. EphA2 accumulation is another mechanism for noncanonical activation. By binding to EphA2, ANXA1 enhances EphA2 stabilization through the inhibition of polyubiquitination and proteasomal degradation, also promoting Ser897 phosphorylation through the Akt pathway [69]. This interaction also induces nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis [69].

In the early 2000s, there was evidence suggesting that EphA2 could diminish tumor sensitivity to therapy [70]. In the past decade, the interest in unraveling the role of EphA2 in promoting drug resistance during cancer treatment has been rising. Because of the unquestionable involvement of EphA2 in tumorigenesis, along with compelling evidence of its engagement on drug resistance, EphA2 is currently becoming a highly interesting therapeutic target. As a result, many research groups are focused on finding EphA2 modulators or inhibitors.

In this review, our aim is to summarize the current knowledge regarding EphA2-induced drug resistance in cancer treatment, focusing on the types of cancer that lead to most of the cancer-related deaths. We will also explore potential alternatives for targeting EphA2.

EPHA2-INDUCED RESISTANCE IN CANCER TREATMENT

The development of drug resistance is commonly reported in cancer treatment. The overexpression of EphA2 receptor by tumor cells is often observed and it has been associated with resistance to different therapeutic strategies in several types of cancer. Here, we summarize these associations in tumors that cause the most expressive death rates (Table 1).

Table 1. Strategies of Anti-EphA2 therapy to overcome drug resistance in cancer treatment.

Type of cancer	Treatment	Function	EphA2 inhibitor	REF
Lung cancer	Erlotinib (TKI)	EGFR antagonist	ALW-II-41-27	[71]
Colorectal cancer	5-FU and cisplatin (CT)		ALW-II-41-27	[72]
	Cetuximab (Mab)	EGFR antagonist	ALW-II-41-27	[73–75]
Liver cancer	Sorafenib (TKI)	MAPK pathway inhibitor	Prazosin	[76]
Gastric cancer	5-FU (CT)		Verteporfin (EphA2-YAP pathway)	[77]
	Afatinib (TKI)	Pan-HER inhibitor	ALW-II-41-27	[78]
Breast cancer	Tamoxifen (ER+ patients)	SERM	Anti-EphA2 mab	[70,79]
	Trastuzumab (HER2+ patients)	HER2 antagonist	Anti-EphA2 antibody	[57]

Therapy-resistant tumors associated with EphA2 overexpression and treatment strategies. STKI – tyrosine kinase inhibitors; CT – chemotherapy; ER+ — Estrogen receptor-positive; HER2+ — Human epidermal growth factor receptor-2-positive; SERM — selective estrogen receptor mod-ulator; Mab – monoclonal antibody.

Lung Cancer

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in the world [80]. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) are common among lung cancer patients (Reviewed in Camidge et al. [81]). Although EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) present high response rates, most patients eventually develop acquired resistance (Reviewed in Camidge et al. [81]).

Compared to healthy tissues, EphA2 is overexpressed in lung tumors, mainly in the ones harboring *EGFR* mutations [71]. Preliminary results indicate that targeting EphA2 with the small-molecule inhibitor ALW-II-41-27 might be a promising therapeutic strategy to overcome erlotinib resistance in lung cancer patients [71]. EphA2 expression is greatly increased in HCC827-GR, a non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line resistant to gefitinib [82]. However, silencing *EPHA2* has restored gefitinib sensitiveness, suggesting that EphA2 is an active player in promoting gefitinib resistance in lung cancer [82].

Besides drug resistance, EphA2 might also contribute to radiation resistance in lung cancer, as reported in the lung carcinoma cell lines A549R [83], H1975 and U-1810 [84].

Colorectal Cancer

Colorectal cancer (CRC) ranks second in cancer mortality worldwide [80]. CRC chemotherapy regimens often include 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin. However, a considerable number of patients eventually present intrinsic or acquired chemoresistance. EphA2 is upregulated in CRC cells resistant to 5-FU and cisplatin, but after being treated with ALW-II-41-27, an enhancement in the cells' chemosensitivity was observed, mainly when ALW-II-41-27 was combined with 5-FU or cisplatin [72].

Cetuximab is an EGFR antagonist used in monotherapy or combined therapy to treat EGFR-expressing, K-Ras wild-type metastatic CRC. Evidence strongly suggests that EphA2 promotes resistance to cetuximab in CRC [73–75]. Data from both *in vitro* and *in vivo* experiments suggest that combined therapies with cetuximab and ALW-II-41-27 lead to a synergistic, antiproliferative and pro-apoptotic effect, resulting in tumor growth suppression [75].

Liver Cancer

Liver cancer is the sixth most common type of cancer in the world, but it is the third one in number of cancer-related deaths [80]. Late diagnosis, rapid progression and limited therapeutic options contribute to poor prognosis [85].

Acting as a kinase inhibitor, sorafenib was the first target drug approved by the FDA for liver cancer treatment. However, acquired resistance to sorafenib is often reported. Chen et al. [76] found that both EphA2 expression and noncanonical activation of EphA2 through phosphorylation of Ser897 are highly increased in sorafenib-resistant HuH-7^R hepatocellular carcinoma (HCC) cells. Combined treatment with sorafenib and prazosin, an EphA2 agonistic inhibitor, promotes apoptosis and reduces cell motility *in vitro*, while showing, in a synergistic manner, tumor growth inhibition and prolonged survival *in vivo* [76].

EphA2 also seems to have a role in radiation resistance in HCC cell lines, since EphA2 knockdown in 97H HCC cells diminished the cell proliferation rate and invasion ability, while increasing apoptosis after low-dose irradiation [86]. Opposite results were obtained after treating 97H cells with an EphA2 overexpression vector [86].

Although liver cancer therapy still relies on systemic approaches, the FDA has recently approved several target drugs to improve liver cancer treatment, such as atezolizumab, bevacizumab, nivolumab and ipilimumab [87]. To date, no studies have been found that connect EphA2 with resistance to recently approved target drugs for treating liver cancer. However, as EphA2 expression might point to HCC progression [15,88], its role in promoting resistance to these recently approved drugs for treating liver cancer should be further investigated.

Gastric Cancer

Globally, gastric cancer (GC) is the fourth type of cancer with the highest mortality rate [80]. EphA2 is overexpressed in GC tumors when compared to the adjacent normal gastric mucosa, while in GC cells EphA2 seems to promote cell proliferation, colony formation, migration and invasion [77].

One of the most frequently used chemotherapy approaches is based on 5-FU monotherapy or its combination with other therapeutics [77]. However, tumors often develop resistance [77]. *In vitro* experiments indicate that EphA2 overexpression in GC cells might increase the resistance to 5-FU treatment. Mechanistically, EphA2 activation seems to induce YAP T357 phosphorylation, leading to YAP's stability and translocation to the nucleus [77]. Treatment with verteporfin, a small molecule that inhibits TEAD-YAP association, led to a suppressive effect *in vivo*, mainly in combined therapy with 5-FU.

Human epidermal growth factor receptors are a family of tyrosine kinase receptors that are frequently overexpressed in gastric cancer, highlighting EGFR and HER2 members [89]. Afatinib, an FDA-approved pan-HER inhibitor used to treat specific types of lung cancer, is being evaluated in some clinical trials for the treatment of advanced or inoperable GC. EphA2 expression was upregulated in afatinib-resistant PDX models, and the combined therapy with ALW-II-41-27 showed significantly better results than afatinib or ALW-II-41-27 alone [78].

Breast Cancer

Breast cancer is the most common type of cancer, corresponding to 11.7% of all new cancer cases, besides being the fifth leading cause of deaths by cancer worldwide [80]. Breast tumors and breast cancer cell lines often overexpress EphA2 [90], which has been linked to drug resistance.

Estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer types are the most frequent breast carcinomas, and they usually benefit from hormonotherapy. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, is one of the main drugs for ER+ breast cancer treatment, though acquired resistance to it is often reported. EphA2 overexpression reduces tamoxifen sensitivity, which might be reestablished with monoclonal antibodies against the receptor [70,79].

The human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) is frequently overexpressed in breast cancer. In such a scenario, target therapy with trastuzumab is

highly recommended. However, increased levels of EphA2 contribute to trastuzumab resistance [57]. Consequently, for HER2 enriched breast carcinomas that also present overexpressed EphA2, a combination of trastuzumab and an EphA2 inhibitor might be a promising therapeutic approach [57].

Gao et al. [23] showed that EphA2 is upregulated in exosomes from Epirubicin-resistant and adriamycin-resistant breast cancer cell lines. The levels of exosomal EphA2 are higher in the plasma of breast cancer patients who underwent chemotherapy than in the plasma of patients at the time of initial diagnosis [23]. Although drug sensitivity assays were not conducted in this study, the results suggest a possible role of EphA2 in increasing resistance to these drugs.

Other Cancers

The EphA2 role in inducing drug resistance throughout the treatment was evaluated for many other types of cancer, and evidence suggests that EphA2 might promote target therapy resistance and chemoresistance in multiple solid cancer types.

Like erlotinib-resistance in *EGFR* mutated lung cancer [71], *in vitro* and *in vivo* models indicate that EphA2 overexpression also seems to promote resistance to erlotinib in *KRAS* mutated pancreatic cancer [91]. In addition, EphA2 might also promote sunitinib resistance in renal cell carcinoma, leading to cancer progression through metastasis, as demonstrated by Ruan et al. [92].

In melanoma, patients carrying BRAF-activating mutations often benefit from target therapy involving BRAF inhibitors (BRAFi) such as vemurafenib or dabrafenib. However, intrinsic or acquired resistance to these therapeutics is still a challenge that must be overcome [93]. Increased expression of total EphA2 as well as p-EphA2^{Ser897} in BRAFi-resistant melanoma cells suggest that EphA2 might drive BRAFi resistance through the noncanonical signaling pathway [94–96].

Besides resistance to target therapy, EphA2 might be an important player on chemoresistance. The released exosomes from gemcitabine-resistant PANC-1 pancreatic cancer cell line overexpressed EphA2 and were able to increase

chemoresistance in MIA-PaCa-2 and BxPC-3 pancreatic cancer cells [97]. However, EphA2 knockdown in PANC-1 cells was sufficient to inhibit the exosome-mediated chemoresistance in these gemcitabine-sensitive pancreatic cancer cells [97]. Through the PI3K/Akt signaling pathway, paclitaxel-resistance might be achieved via EphA2 overexpression in nasopharyngeal carcinoma [98]. Overexpressing EPHA2 glioblastoma cells present a higher IC₅₀ to imatinib than that of EPHA2-silenced cells [99]. EphA2 was also related to chemoresistance in gynecological cancer types. *In vitro* and *in vivo* experiments point a potential role for EphA2 noncanonical pathway in promoting cisplatin and carboplatin resistance in ovarian cancer [100]. As demonstrated by Shen et al. [101], a combined therapy with docetaxel and an EphA2 inhibitor might improve the treatment of chemotherapy-resistant ovarian tumors. In cervical cancer, EphA2 might promote chemoresistance to epirubicin by inducing CDK6 expression [102].

EphA2 is a protein associated with resistance to both target therapy and chemotherapy in different types of cancer. In addition, it also promotes resistance to radiation in some solid tumors. Although EphA2 overexpression could be a biomarker of worse prognosis and worse response to treatment, it might be considered a potential therapeutic target as well, thus it should be further investigated.

PERSPECTIVES

Through the years, we have witnessed an outstanding evolution in cancer treatment. Despite significant improvements in surgery technologies, chemotherapy and radiotherapy, we now live in the era of target therapies. Target therapeutics include monoclonal antibodies, cancer growth inhibitors, antiangiogenics and PARP inhibitors.

However, during treatment, cancer genomic instability and epigenetic reprogramming contribute to the emergence of resistant tumor cells. Continuous drug selection pressure might also induce resistance to therapy and allow cancer progression to more aggressive phenotypes [93]. In addition, resistance to more than one target therapy is not unusual.

Kuo et al. [103] exemplified the complexity of cancer acquired resistance against treatment. Argininosuccinate synthetase 1 (ASS1)-negative tumors are being treated with recombinant arginine deiminase (ADI) in clinical trials, though the reactivation of ASS1 expression might lead to ADI-resistance [103]. EphA2 overexpression in ADI-resistant melanoma cells provides an additional resistance to EGFR inhibitors [103]. Considering multidrug resistance scenarios, modern and more efficient cancer treatments frequently combine diverse strategies to fight tumors.

One interesting strategy includes the use of one or more immunotherapeutic agents. Immunotherapy strategies stimulate the patient's own immune system to fight tumors. Nevertheless, many cancer types present resistance to immunotherapy. The abundance of T cells in the tumor microenvironment (TME) is of utmost importance to maintain tumor sensitivity to immunotherapies [104]. Human pancreatic adenocarcinoma, for example, is generally refractory to immunotherapy due to an immunosuppressive TME that is often poor in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes [105,106]. EphA2 is a potential driver for immunosuppression, since *Epha2* deletion in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma cells have led to an increase in total and activated CD8⁺ T cells and total CD4⁺ T cells, but to a decrease in suppressor cells [106]. In addition, the ablation of EphA2 increased tumor sensitivity to immunotherapy in this mouse model [106].

EphA2 is often correlated with drug resistance in cancer, which makes it an interesting potential target for cancer treatment, especially when targeted in combined therapy with another drug of choice. But targeting EphA2 might be efficient not only for treating tumors with acquired resistance. Lee et al. [107] reported that LipoplatinTM sensitivity was enhanced when EphA2 was downregulated by silencing in lung tumor cells. The HDACs-EphA2 axis inhibition through the combination of WW437 (HDAC inhibitor) and ALW-II-41-27 synergistically reduced cell viability and migration of breast cancer cells [108]. Salem et al. [109] developed a peptide-drug conjugate with an agonistic EphA2-targeting agent, using a dimeric version of the peptide 123B9 conjugated with paclitaxel. This was able to activate *EPHA2* at nanomolar concentrations and to target circulating breast cancer tumor cells, suppressing lung metastasis *in vivo*. Ovarian tumor-bearing mice were treated with a complex of the

neutral liposome 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) incorporated with a small interfering RNA (siRNA) which targets *EPHA2* [110]. A complex of DOPC and a nonsilencing RNA was used as control. After the treatment, the siRNA-DOPC reduced tumor growth when compared to the control group. In addition, when combined to paclitaxel, siRNA-DOPC was more effective in stunting tumor growth than paclitaxel alone [110]. Later, Wagner et al. [111] conducted a preclinical study to evaluate the potential toxicological effects of the siRNA-DOPC complex in mice and Rhesus monkeys. As the results indicate a good tolerance to the complex, it is now being tested in the NCT01591356 ongoing phase I clinical trial [111]. Recently published works reported novel peptides targeting EphA2. Targefrin-dimers bind to EphA2 ligand binding domain and promote the receptor internalization and degradation in pancreatic cancer cell lines [112]. Targefrin-dimers might also be conjugated with chemotherapeutics such as paclitaxel to boost the drug's effectiveness *in vivo*, and preliminary results suggest that targefrin is well tolerated [112]. UniPR126, a carrier that targets EphA2, showed a significant and synergistic effect against prostate cancer when conjugated with niclosamide [113].

Finding potential drug targets is an ongoing effort for researchers and clinicians. There are studies evaluating monoclonal antibodies as well as inhibitors against EphA2, and ALW-II-41-27 — a small molecule inhibitor — has provided some interesting results. There are yet no clinical trials for the use of this molecule to treat EphA2-overexpressing cancer types. However, there are some clinical trials in course exploring antibodies, siRNA and other classes of EphA2 inhibitors [114,115]. In this review, we have compiled enough evidence to strongly suggest that EphA2 is a promising target in cancer treatment, mainly for overcoming drug resistance. Thus, EphA2 inhibitors should be deeply investigated for efficacy and drug toxicity mitigation.

Author Contributions: Conceptualization, R.N.V and D.F.G.; investigation, R.N.V.; writing—original draft preparation, R.N.V.; writing—review and editing, R.N.V., J.C.O. and D.F.G.; visualization, R.N.V., J.C.O. and D.F.G.; supervision, J.C.O. and D.F.G.; project administration, D.F.G.; funding acquisition, J.C.O. and D.F.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This piece of research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Acknowledgments: The authors would like to thank Caetano Krassuski Negrão for proofreading the English version of this piece of work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

REFERENCES

1. Hirai, H.; Maru, Y.; Hagiwara, K.; Nishida, J.; Takaku, F. A Novel Putative Tyrosine Kinase Receptor Encoded by the Eph Gene. *Science* (80-.). 1987, 238, 1717–1720, doi:10.1126/science.2825356.
2. Pasquale, E.B. Eph Receptors and Ephrins in Cancer: Bidirectional Signalling and Beyond. *Nat. Rev. Cancer* 2010, 10, 165–180, doi:10.1038/nrc2806.
3. Sahoo, A.R.; Buck, M. Structural and Functional Insights into the Transmembrane Domain Association of Eph Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, doi:10.3390/ijms22168593.
4. Liang, L.Y.; Patel, O.; Janes, P.W.; Murphy, J.M.; Lucet, I.S. Eph Receptor Signalling: From Catalytic to Non-Catalytic Functions. *Oncogene* 2019, 38, 6567–6584, doi:10.1038/s41388-019-0931-2.
5. Himanen, J.P.; Rajashankar, K.R.; Lackmann, M.; Cowan, C.A.; Henkemeyer, M.; Nikolov, D.B. Crystal Structure of an Eph Receptor-Ephrin Complex. *Nature* 2001, 414, 933–938, doi:10.1038/414933a.
6. Ellis, C.; Kasmi, F.; Ganju, P.; Walls, E.; Panayotou, G.; Reith, A.D. A Juxtamembrane Autophosphorylation Site in the Eph Family Receptor Tyrosine Kinase, Sek, Mediates High Affinity Interaction with P59fyn. *Oncogene* 1996, 12, 1727–1736.
7. Holland, S.J.; Gale, N.W.; Gish, G.D.; Roth, R.A.; Songyang, Z.; Cantley, L.C.; Henkemeyer, M.; Yancopoulos, G.D.; Pawson, T. Juxtamembrane Tyrosine

- Residues Couple the Eph Family Receptor EphB2/Nuk to Specific SH2 Domain Proteins in Neuronal Cells. *EMBO J.* 1997, 16, 3877–3888, doi:10.1093/emboj/16.13.3877.
8. Schultz, J.; Ponting, C.P.; Hofmann, K.; Bork, P. SAM as a Protein Interaction Domain Involved in Developmental Regulation. *Protein Sci.* 1997, 6, 249–253, doi:10.1002/pro.5560060128.
 9. Stapleton, D.; Balan, I.; Pawson, T.; Sicheri, F. The Crystal Structure of an Eph Receptor SAM Domain Reveals a Mechanism for Modular Dimerization. *Nat. Struct. Biol.* 1999, 6, 44–49, doi:10.1038/4917.
 10. Thanos, C.D.; Goodwill, K.E.; Bowie, J.U. Oligomeric Structure of the Human EphB2 Receptor SAM Domain. *Science* 1999, 283, 833–836, doi:10.1126/science.283.5403.833.
 11. Hock, B.; Böhme, B.; Karn, T.; Yamamoto, T.; Kaibuchi, K.; Holtrich, U.; Holland, S.; Pawson, T.; Rübsamen-Waigmann, H.; Strebhardt, K. PDZ-Domain-Mediated Interaction of the Eph-Related Receptor Tyrosine Kinase EphB3 and the Ras-Binding Protein AF6 Depends on the Kinase Activity of the Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 9779–9784, doi:10.1073/pnas.95.17.9779.
 12. Torres, R.; Firestein, B.L.; Dong, H.; Staudinger, J.; Olson, E.N.; Huganir, R.L.; Bredt, D.S.; Gale, N.W.; Yancopoulos, G.D. PDZ Proteins Bind, Cluster, and Synaptically Colocalize with Eph Receptors and Their Ephrin Ligands. *Neuron* 1998, 21, 1453–1463, doi:10.1016/s0896-6273(00)80663-7.
 13. Gong, J.; Körner, R.; Gaitanos, L.; Klein, R. Exosomes Mediate Cell Contact-Independent Ephrin-Eph Signaling during Axon Guidance. *J. Cell Biol.* 2016, 214, 35–44, doi:10.1083/jcb.201601085.
 14. Pasquale, E.B. Exosomes Expand the Sphere of Influence of Eph Receptors and Ephrins. *J. Cell Biol.* 2016, 214, 5–7, doi:10.1083/jcb.201606074.
 15. Cui, X.D.; Lee, M.J.; Yu, G.R.; Kim, I.H.; Yu, H.C.; Song, E.Y.; Kim, D.G. EFNA1 Ligand and Its Receptor EphA2: Potential Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010, 126, 940–949, doi:10.1002/ijc.24798.
 16. Lee, P.C.; Chen, S.T.; Kuo, T.C.; Lin, T.C.; Lin, M.C.; Huang, J.; Hung, J.S.; Hsu, C.L.; Juan, H.F.; Lee, P.H.; et al. C1GALT1 Is Associated with Poor

- Survival and Promotes Soluble Ephrin A1-Mediated Cell Migration through Activation of EPHA2 in Gastric Cancer. *Oncogene* 2020, 39, 2724–2740, doi:10.1038/s41388-020-1178-7.
17. Neill, T.; Goyal, A.; Buraschi, S.; Sharpe, C.; Natkanski, E.; Schaefer, L.; Morrione, A.; Iozzo, R. V. EphA2 Is a Functional Receptor for the Growth Factor Progranulin. *J. Cell Biol.* 2016, 215, 687–703, doi:10.1083/jcb.201603079.
 18. Janes, P.W.; Griesshaber, B.; Atapattu, L.; Nievergall, E.; Hii, L.L.; Mensinga, A.; Chheang, C.; Day, B.W.; Boyd, A.W.; Bastiaens, P.I.; et al. Eph Receptor Function Is Modulated by Heterooligomerization of A and B Type Eph Receptors. *J. Cell Biol.* 2011, 195, 1033–1045, doi:10.1083/jcb.201104037.
 19. Wimmer-Kleikamp, S.H.; Janes, P.W.; Squire, A.; Bastiaens, P.I.H.; Lakmann, M. Recruitment of Eph Receptors into Signaling Clusters Does Not Require Ephrin Contact. *J. Cell Biol.* 2004, 164, 661–666, doi:10.1083/jcb.200312001.
 20. Miao, H.; Li, D.Q.; Mukherjee, A.; Guo, H.; Petty, A.; Cutter, J.; Basilion, J.P.; Sedor, J.; Wu, J.; Danielpour, D.; et al. EphA2 Mediates Ligand-Dependent Inhibition and Ligand-Independent Promotion of Cell Migration and Invasion via a Reciprocal Regulatory Loop with Akt. *Cancer Cell* 2009, 16, 9–20, doi:10.1016/j.ccr.2009.04.009.
 21. Hiramoto-Yamaki, N.; Takeuchi, S.; Ueda, S.; Harada, K.; Fujimoto, S.; Negishi, M.; Katoh, H. Ephexin4 and EphA2 Mediate Cell Migration through a RhoG-Dependent Mechanism. *J. Cell Biol.* 2010, 190, 461–477, doi:10.1083/jcb.201005141.
 22. Sato, S.; Vasaikar, S.; Eskaros, A.; Kim, Y.; Lewis, J.S.; Zhang, B.; Zijlstra, A.; Weaver, A.M. EPHB2 Carried on Small Extracellular Vesicles Induces Tumor Angiogenesis via Activation of Ephrin Reverse Signaling. *JCI Insight* 2019, 4, 1–18, doi:10.1172/jci.insight.132447.
 23. Gao, Z.; Han, X.; Zhu, Y.; Zhang, H.; Tian, R.; Wang, Z.; Cui, Y.; Wang, Z.; Niu, R.; Zhang, F. Drug-Resistant Cancer Cell-Derived Exosomal EphA2 Promotes Breast Cancer Metastasis via the EphA2-Ephrin A1 Reverse Signaling. *Cell Death Dis.* 2021, 12, doi:10.1038/s41419-021-03692-x.
 24. Vreeken, D.; Bruikman, C.S.; Cox, S.M.L.; Zhang, H.; Lalai, R.; Koudijs, A.;

- van Zonneveld, A.J.; Hovingh, G.K.; van Gils, J.M. EPH Receptor B2 Stimulates Human Monocyte Adhesion and Migration Independently of Its EphrinB Ligands. *J. Leukoc. Biol.* 2020, 108, 999–1011, doi:10.1002/JLB.2A0320-283RR.
25. Fujii, H.; Tatsumi, K.; Kosaka, K.; Yoshioka, S.; Fujiwara, H.; Fujii, S. Eph-Ephrin A System Regulates Murine Blastocyst Attachment and Spreading. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2006, 235, 3250–3258, doi:10.1002/dvdy.20977.
 26. N'Tumba-Byn, T.; Yamada, M.; Seandel, M. Loss of Tyrosine Kinase Receptor Ephb2 Impairs Proliferation and Stem Cell Activity of Spermatogonia in Culture†. *Biol. Reprod.* 2020, 102, 950–962, doi:10.1093/biolre/ioz222.
 27. Wang, Z.; Miura, N.; Bonelli, A.; Mole, P.; Carlesso, N.; Olson, D.P.; Scadden, D.T. Receptor Tyrosine Kinase, EphB4 (HTK), Accelerates Differentiation of Select Human Hematopoietic Cells. *Blood* 2002, 99, 2740–2747, doi:10.1182/blood.v99.8.2740.
 28. Ethell, I.M.; Irie, F.; Kalo, M.S.; Couchman, J.R.; Pasquale, E.B.; Yamaguchi, Y. EphB/Syndecan-2 Signaling in Dendritic Spine Morphogenesis. *Neuron* 2001, 31, 1001–1013, doi:10.1016/s0896-6273(01)00440-8.
 29. Henkemeyer, M.; Itkis, O.S.; Ngo, M.; Hickmott, P.W.; Ethell, I.M. Multiple EphB Receptor Tyrosine Kinases Shape Dendritic Spines in the Hippocampus. *J. Cell Biol.* 2003, 163, 1313–1326, doi:10.1083/jcb.200306033.
 30. Penzes, P.; Beeser, A.; Chernoff, J.; Schiller, M.R.; Eipper, B.A.; Mains, R.E.; Huganir, R.L. Rapid Induction of Dendritic Spine Morphogenesis by Trans-Synaptic EphrinB-EphB Receptor Activation of the Rho-GEF Kalirin. *Neuron* 2003, 37, 263–274, doi:10.1016/s0896-6273(02)01168-6.
 31. Murai, K.K.; Nguyen, L.N.; Irie, F.; Yu, Y.; Pasquale, E.B. Control of Hippocampal Dendritic Spine Morphology through Ephrin-A3/EphA4 Signaling. *Nat. Neurosci.* 2003, 6, 153–160, doi:10.1038/nn994.
 32. Buensuceso, A. V; Deroo, B.J. The Ephrin Signaling Pathway Regulates Morphology and Adhesion of Mouse Granulosa Cells in Vitro. *Biol. Reprod.* 2013, 88, 25, doi:10.1095/biolreprod.112.100123.
 33. Fujii, H.; Fujiwara, H.; Horie, A.; Sato, Y.; Konishi, I. Ephrin A1 Induces

- Intercellular Dissociation in Ishikawa Cells: Possible Implication of the Eph-Ephrin A System in Human Embryo Implantation. *Hum. Reprod.* 2011, 26, 299–306, doi:10.1093/humrep/deq340.
34. Wu, B.; Rockel, J.S.; Lagares, D.; Kapoor, M. Ephrins and Eph Receptor Signaling in Tissue Repair and Fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2019, 21, 23, doi:10.1007/s11926-019-0825-x.
 35. Darling, T.K.; Lamb, T.J. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1473, doi:10.3389/fimmu.2019.01473.
 36. Vivanti, A.; Ozanne, A.; Grondin, C.; Saliou, G.; Quevarec, L.; Maurey, H.; Aubourg, P.; Benachi, A.; Gut, M.; Gut, I.; et al. Loss of Function Mutations in EPHB4 Are Responsible for Vein of Galen Aneurysmal Malformation. *Brain* 2018, 141, 979–988, doi:10.1093/brain/awy020.
 37. Chen, D.; Hughes, E.D.; Saunders, T.L.; Wu, J.; Vasquez, M.N.H.; Makinen, T.; King, P.D. Angiogenesis Depends upon EPHB4-Mediated Export of Collagen IV from Vascular Endothelial Cells. *JCI insight* 2022, 7, doi:10.1172/jci.insight.156928.
 38. Gerety, S.S.; Wang, H.U.; Chen, Z.F.; Anderson, D.J. Symmetrical Mutant Phenotypes of the Receptor EphB4 and Its Specific Transmembrane Ligand Ephrin-B2 in Cardiovascular Development. *Mol. Cell* 1999, 4, 403–414, doi:10.1016/s1097-2765(00)80342-1.
 39. Li, J.; Dong, W.; Gao, X.; Chen, W.; Sun, C.; Li, J.; Gao, S.; Zhang, Y.; He, J.; Lu, D.; et al. EphA4 Is Highly Expressed in the Atria of Heart and Its Deletion Leads to Atrial Hypertrophy and Electrocardiographic Abnormalities in Rats. *Life Sci.* 2021, 278, 119595, doi:10.1016/j.lfs.2021.119595.
 40. Lindberg, R.A.; Hunter, T. CDNA Cloning and Characterization of Eck, an Epithelial Cell Receptor Protein-Tyrosine Kinase in the Eph/Elk Family of Protein Kinases. *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10, 6316–6324, doi:10.1128/mcb.10.12.6316-6324.1990.
 41. Sulman, E.P.; Tang, X.X.; Allen, C.; Biegel, J.A.; Pleasure, D.E.; Brodeur, G.M.; Ikegaki, N. ECK, a Human EPH-Related Gene, Maps to 1p36.1, a Common Region of Alteration in Human Cancers. *Genomics* 1997, 40, 371–374, doi:10.1006/geno.1996.4569.

42. Dai, D.; Huang, Q.; Nussinov, R.; Ma, B. Promiscuous and Specific Recognition among Ephrins and Eph Receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1844, 1729–1740, doi:10.1016/j.bbapap.2014.07.002.
43. Himanen, J.P.; Goldgur, Y.; Miao, H.; Myshkin, E.; Guo, H.; Buck, M.; Nguyen, M.; Rajashankar, K.R.; Wang, B.; Nikolov, D.B. Ligand Recognition by A-Class Eph Receptors: Crystal Structures of the EphA2 Ligand-Binding Domain and the EphA2/Ephrin-A1 Complex. *EMBO Rep.* 2009, 10, 722–728, doi:10.1038/embor.2009.91.
44. Seiradake, E.; Schaupp, A.; del Toro Ruiz, D.; Kaufmann, R.; Mitakidis, N.; Harlos, K.; Aricescu, A.R.; Klein, R.; Jones, E.Y. Structurally Encoded Intraclass Differences in EphA Clusters Drive Distinct Cell Responses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013, 20, 958–964, doi:10.1038/nsmb.2617.
45. Shi, Y.; De Maria, A.; Bennett, T.; Shiels, A.; Bassnett, S. A Role for EphA2 in Cell Migration and Refractive Organization of the Ocular Lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012, 53, 551–559, doi:10.1167/iovs.11-8568.
46. Cheng, C.; Ansari, M.M.; Cooper, J.A.; Gong, X. EphA2 and Src Regulate Equatorial Cell Morphogenesis during Lens Development. *Development* 2013, 140, 4237–4245, doi:10.1242/dev.100727.
47. Irie, N.; Takada, Y.; Watanabe, Y.; Matsuzaki, Y.; Naruse, C.; Asano, M.; Iwakura, Y.; Suda, T.; Matsuo, K. Bidirectional Signaling through EphrinA2-EphA2 Enhances Osteoclastogenesis and Suppresses Osteoblastogenesis. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 14637–14644, doi:10.1074/jbc.M807598200.
48. Vaught, D.; Chen, J.; Brantley-Sieders, D.M. Regulation of Mammary Gland Branching Morphogenesis by EphA2 Receptor Tyrosine Kinase. *Mol. Biol. Cell* 2009, 20, 2572–2581, doi:10.1091/mbc.e08-04-0378.
49. Walker-Daniels, J.; Coffman, K.; Azimi, M.; Rhim, J.S.; Bostwick, D.G.; Snyder, P.; Kerns, B.J.; Waters, D.J.; Kinch, M.S. Overexpression of the EphA2 Tyrosine Kinase in Prostate Cancer. *Prostate* 1999, 41, 275–280, doi:10.1002/(sici)1097-0045(19991201)41:4<275::aid-pros8>3.0.co;2-t.
50. Ogawa, K.; Pasqualini, R.; Lindberg, R.A.; Kain, R.; Freeman, A.L.; Pasquale, E.B. The Ephrin-A1 Ligand and Its Receptor, EphA2, Are Expressed during Tumor Neovascularization. *Oncogene* 2000, 19, 6043–6052,

- doi:10.1038/sj.onc.1204004.
51. Saito, T.; Masuda, N.; Miyazaki, T.; Kanoh, K.; Suzuki, H.; Shimura, T.; Asao, T.; Kuwano, H. Expression of EphA2 and E-Cadherin in Colorectal Cancer: Correlation with Cancer Metastasis. *Oncol. Rep.* 2004, 11, 605–611, doi:10.3892/or.11.3.605.
 52. Lin, Y.G.; Han, L.Y.; Kamat, A.A.; Merritt, W.M.; Landen, C.N.; Deavers, M.T.; Fletcher, M.S.; Urbauer, D.L.; Kinch, M.S.; Sood, A.K. EphA2 Overexpression Is Associated with Angiogenesis in Ovarian Cancer. *Cancer* 2007, 109, 332–340, doi:10.1002/cncr.22415.
 53. Song, W.; Hwang, Y.; Youngblood, V.M.; Cook, R.S.; Balko, J.M.; Chen, J.; Brantley-Sieders, D.M. Targeting EphA2 Impairs Cell Cycle Progression and Growth of Basal-like/Triple-Negative Breast Cancers. *Oncogene* 2017, 36, 5620–5630, doi:10.1038/onc.2017.170.
 54. Dunne, P.D.; Dasgupta, S.; Blayney, J.K.; McArt, D.G.; Redmond, K.L.; Weir, J.-A.; Bradley, C.A.; Sasazuki, T.; Shirasawa, S.; Wang, T.; et al. EphA2 Expression Is a Key Driver of Migration and Invasion and a Poor Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2016, 22, 230–242, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0603.
 55. Li, J.-Y.; Xiao, T.; Yi, H.-M.; Yi, H.; Feng, J.; Zhu, J.-F.; Huang, W.; Lu, S.-S.; Zhou, Y.-H.; Li, X.-H.; et al. S897 Phosphorylation of EphA2 Is Indispensable for EphA2-Dependent Nasopharyngeal Carcinoma Cell Invasion, Metastasis and Stem Properties. *Cancer Lett.* 2019, 444, 162–174, doi:10.1016/j.canlet.2018.12.011.
 56. Sachdeva, A.; Hart, C.A.; Kim, K.; Tawadros, T.; Oliveira, P.; Shanks, J.; Brown, M.; Clarke, N. Non-Canonical EphA2 Activation Underpins PTEN-Mediated Metastatic Migration and Poor Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Br. J. Cancer* 2022, doi:10.1038/s41416-022-01914-3.
 57. Zhuang, G.; Brantley-Sieders, D.M.; Vaught, D.; Yu, J.; Xie, L.; Wells, S.; Jackson, D.; Muraoka-Cook, R.; Arteaga, C.; Chen, J. Elevation of Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy. *Cancer Res.* 2010, 70, 299–308, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1845.
 58. Ishigaki, H.; Minami, T.; Morimura, O.; Kitai, H.; Horio, D.; Koda, Y.; Fujimoto,

- E.; Negi, Y.; Nakajima, Y.; Niki, M.; et al. EphA2 Inhibition Suppresses Proliferation of Small-Cell Lung Cancer Cells through Inducing Cell Cycle Arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 519, 846–853, doi:10.1016/j.bbrc.2019.09.076.
59. Yeddula, N.; Xia, Y.; Ke, E.; Beumer, J.; Verma, I.M. Screening for Tumor Suppressors: Loss of Ephrin Receptor A2 Cooperates with Oncogenic KRas in Promoting Lung Adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, 112, E6476–85, doi:10.1073/pnas.1520110112.
 60. Miao, H.; Wei, B.R.; Peehl, D.M.; Li, Q.; Alexandrou, T.; Schelling, J.R.; Rhim, J.S.; Sedor, J.R.; Burnett, E.; Wang, B. Activation of EphA Receptor Tyrosine Kinase Inhibits the Ras/MAPK Pathway. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3, 527–530, doi:10.1038/35074604.
 61. Guo, H.; Miao, H.; Gerber, L.; Singh, J.; Denning, M.F.; Gilliam, A.C.; Wang, B. Disruption of EphA2 Receptor Tyrosine Kinase Leads to Increased Susceptibility to Carcinogenesis in Mouse Skin. *Cancer Res.* 2006, 66, 7050–7058, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0004.
 62. Walker-Daniels, J.; Riese, D.J. 2nd; Kinch, M.S. C-Cbl-Dependent EphA2 Protein Degradation Is Induced by Ligand Binding. *Mol. Cancer Res.* 2002, 1, 79–87.
 63. Zhou, Y.; Yamada, N.; Tanaka, T.; Hori, T.; Yokoyama, S.; Hayakawa, Y.; Yano, S.; Fukuoka, J.; Koizumi, K.; Saiki, I.; et al. Crucial Roles of RSK in Cell Motility by Catalysing Serine Phosphorylation of EphA2. *Nat. Commun.* 2015, 6, 7679, doi:10.1038/ncomms8679.
 64. Barquilla, A.; Lamberto, I.; Noverini, R.; Heynen-Genel, S.; Brill, L.M.; Pasquale, E.B. Protein Kinase A Can Block EphA2 Receptor-Mediated Cell Repulsion by Increasing EphA2 S897 Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 2016, 27, 2757–2770, doi:10.1091/mbc.E16-01-0048.
 65. Buraschi, S.; Neill, T.; Xu, S.-Q.; Palladino, C.; Belfiore, A.; Iozzo, R. V.; Morrión, A. Progranulin/EphA2 Axis: A Novel Oncogenic Mechanism in Bladder Cancer. *Matrix Biol.* 2020, 93, 10–24, doi:10.1016/j.matbio.2020.03.009.
 66. Larsen, A.B.; Pedersen, M.W.; Stockhausen, M.-T.; Grandal, M.V.; van Deurs,

- B.; Poulsen, H.S. Activation of the EGFR Gene Target EphA2 Inhibits Epidermal Growth Factor-Induced Cancer Cell Motility. *Mol. Cancer Res.* 2007, 5, 283–293, doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0321.
67. Brantley-Sieders, D.M.; Zhuang, G.; Hicks, D.; Fang, W. Bin; Hwang, Y.; Cates, J.M.M.; Coffman, K.; Jackson, D.; Bruckheimer, E.; Muraoka-Cook, R.S.; et al. The Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Promotes Mammary Adenocarcinoma Tumorigenesis and Metastatic Progression in Mice by Amplifying ErbB2 Signaling. *J. Clin. Invest.* 2008, 118, 64–78, doi:10.1172/JCI33154.
 68. Kim, J.; Chang, I.-Y.; You, H.J. Interactions between EGFR and EphA2 Promote Tumorigenesis through the Action of Ephexin1. *Cell Death Dis.* 2022, 13, 528, doi:10.1038/s41419-022-04984-6.
 69. Feng, J.; Lu, S.-S.; Xiao, T.; Huang, W.; Yi, H.; Zhu, W.; Fan, S.; Feng, X.-P.; Li, J.-Y.; Yu, Z.-Z.; et al. ANXA1 Binds and Stabilizes EphA2 to Promote Nasopharyngeal Carcinoma Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 2020, 80, 4386–4398, doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-0560.
 70. Lu, M.; Miller, K.D.; Gokmen-Polar, Y.; Jeng, M.H.; Kinch, M.S. EphA2 Overexpression Decreases Estrogen Dependence and Tamoxifen Sensitivity. *Cancer Res.* 2003, 63, 3425–3429.
 71. Amato, K.R.; Wang, S.; Tan, L.; Hastings, A.K.; Song, W.; Lovly, C.M.; Meador, C.B.; Ye, F.; Lu, P.; Balko, J.M.; et al. EPHA2 Blockade Overcomes Acquired Resistance to EGFR Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Res.* 2016, 76, 305–318, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0717.
 72. Yao, F.; Huang, X.; Xie, Z.; Chen, J.; Zhang, L.; Wang, Q.; Long, H.; Jiang, J.; Wu, Q. LINC02418 Upregulates EPHA2 by Competitively Sponging MiR-372-3p to Promote 5-Fu/DDP Chemoresistance in Colorectal Cancer. *Carcinogenesis* 2022, doi:10.1093/carcin/bgac065.
 73. Cuyàs, E.; Queralt, B.; Martin-Castillo, B.; Bosch-Barrera, J.; Menendez, J.A. EphA2 Receptor Activation with Ephrin-A1 Ligand Restores Cetuximab Efficacy in NRAS-Mutant Colorectal Cancer Cells. *Oncol. Rep.* 2017, 38, 263–270, doi:10.3892/or.2017.5682.
 74. De Robertis, M.; Loiacono, L.; Fusilli, C.; Poeta, M.L.; Mazza, T.; Sanchez, M.; Marchionni, L.; Signori, E.; Lamorte, G.; Vescovi, A.L.; et al. Dysregulation of

- EGFR Pathway in EphA2 Cell Subpopulation Significantly Associates with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2017, 23, 159–170, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0709.
75. Martini, G.; Cardone, C.; Vitiello, P.P.; Belli, V.; Napolitano, S.; Troiani, T.; Ciardiello, D.; Della Corte, C.M.; Morgillo, F.; Matrone, N.; et al. EPHA2 Is a Predictive Biomarker of Resistance and a Potential Therapeutic Target for Improving Antiepidermal Growth Factor Receptor Therapy in Colorectal Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2019, 18, 845–855, doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-0539.
 76. Chen, C.-T.; Liao, L.-Z.; Lu, C.-H.; Huang, Y.-H.; Lin, Y.-K.; Lin, J.-H.; Chow, L.-P. Quantitative Phosphoproteomic Analysis Identifies the Potential Therapeutic Target EphA2 for Overcoming Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Exp. Mol. Med.* 2020, 52, 497–513, doi:10.1038/s12276-020-0404-2.
 77. Huang, C.; Yuan, W.; Lai, C.; Zhong, S.; Yang, C.; Wang, R.; Mao, L.; Chen, Z.; Chen, Z. EphA2-to-YAP Pathway Drives Gastric Cancer Growth and Therapy Resistance. *Int. J. Cancer* 2020, 146, 1937–1949, doi:10.1002/ijc.32609.
 78. Chen, Z.; Liu, Z.; Zhang, M.; Huang, W.; Li, Z.; Wang, S.; Zhang, C.; Dong, B.; Gao, J.; Shen, L. EPHA2 Blockade Reverses Acquired Resistance to Afatinib Induced by EPHA2-Mediated MAPK Pathway Activation in Gastric Cancer Cells and Avatar Mice. *Int. J. Cancer* 2019, 145, 2440–2449, doi:10.1002/ijc.32313.
 79. Gökmen-Polar, Y.; Toroni, R.A.; Hocevar, B.A.; Badve, S.; Zhao, Q.; Shen, C.; Bruckheimer, E.; Kinch, M.S.; Miller, K.D. Dual Targeting of EphA2 and ER Restores Tamoxifen Sensitivity in ER/EphA2-Positive Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011, 127, 375–384, doi:10.1007/s10549-010-1004-y.
 80. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2021, 71, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
 81. Camidge, D.R.; Pao, W.; Sequist, L. V Acquired Resistance to TKIs in Solid Tumours: Learning from Lung Cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2014, 11, 473–481, doi:10.1038/nrclinonc.2014.104.

82. Koch, H.; Busto, M.E.D.C.; Kramer, K.; Médard, G.; Kuster, B. Chemical Proteomics Uncovers EPHA2 as a Mechanism of Acquired Resistance to Small Molecule EGFR Kinase Inhibition. *J. Proteome Res.* 2015, 14, 2617–2625, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00161.
83. Gong, S.; Li, Y.; Lv, L.; Men, W. Restored MicroRNA-519a Enhances the Radiosensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer via Suppressing EphA2. *Gene Ther.* 2021, doi:10.1038/s41434-020-00213-x.
84. Kaminsky, V.O.; Hååg, P.; Novak, M.; Végvári, Á.; Arapi, V.; Lewensohn, R.; Viktorsson, K. EPHA2 Interacts with DNA-PK(Cs) in Cell Nucleus and Controls Ionizing Radiation Responses in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2021, 13, doi:10.3390/cancers13051010.
85. Fu, J.; Wang, H. Precision Diagnosis and Treatment of Liver Cancer in China. *Cancer Lett.* 2018, 412, 283–288, doi:10.1016/j.canlet.2017.10.008.
86. Jin, Q.; Li, X.J.; Cao, P.G. MicroRNA-26b Enhances the Radiosensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting EphA2. *Tohoku J. Exp. Med.* 2016, 238, 143–151, doi:10.1620/tjem.238.143.
87. Saung, M.T.; Pelosof, L.; Casak, S.; Donoghue, M.; Lemery, S.; Yuan, M.; Rodriguez, L.; Schotland, P.; Chuk, M.; Davis, G.; et al. FDA Approval Summary: Nivolumab Plus Ipilimumab for the Treatment of Patients with Hepatocellular Carcinoma Previously Treated with Sorafenib. *Oncologist* 2021, 26, 797–806, doi:10.1002/onco.13819.
88. Yang, P.; Yuan, W.; He, J.; Wang, J.; Yu, L.; Jin, X.; Hu, Y.; Liao, M.; Chen, Z.; Zhang, Y. Overexpression of EphA2, MMP-9, and MVD-CD34 in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Tumor Progression and Prognosis. *Hepatol. Res.* 2009, 39, 1169–1177, doi:10.1111/j.1872-034X.2009.00563.x.
89. Arienti, C.; Pignatta, S.; Tesei, A. Epidermal Growth Factor Receptor Family and Its Role in Gastric Cancer. *Front. Oncol.* 2019, 9, 1308, doi:10.3389/fonc.2019.01308.
90. Zelinski, D.P.; Zantek, N.D.; Stewart, J.C.; Irizarry, A.R.; Kinch, M.S. EphA2 Overexpression Causes Tumorigenesis of Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 2301–2306.
91. Du, J.; He, Y.; Wu, W.; Li, P.; Chen, Y.; Hu, Z.; Han, Y. Targeting EphA2 with

- MiR-124 Mediates Erlotinib Resistance in K-RAS Mutated Pancreatic Cancer. *J. Pharm. Pharmacol.* 2019, 71, 196–205, doi:10.1111/jphp.12941.
92. Ruan, H.; Li, S.; Bao, L.; Zhang, X. Enhanced YB1/EphA2 Axis Signaling Promotes Acquired Resistance to Sunitinib and Metastatic Potential in Renal Cell Carcinoma. *Oncogene* 2020, 39, 6113–6128, doi:10.1038/s41388-020-01409-6.
 93. Paraiso, K.H.T.; Das Thakur, M.; Fang, B.; Koomen, J.M.; Fedorenko, I. V.; John, J.K.; Tsao, H.; Flaherty, K.T.; Sondak, V.K.; Messina, J.L.; et al. Ligand-Independent EPHA2 Signaling Drives the Adoption of a Targeted Therapy-Mediated Metastatic Melanoma Phenotype. *Cancer Discov.* 2015, 5, 264–273, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0293.
 94. Miao, B.; Ji, Z.; Tan, L.; Taylor, M.; Zhang, J.; Choi, H.G.; Frederick, D.T.; Kumar, R.; Wargo, J.A.; Flaherty, K.T.; et al. EPHA2 Is a Mediator of Vemurafenib Resistance and a Novel Therapeutic Target in Melanoma. *Cancer Discov.* 2015, 5, 274–287, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0295.
 95. Azimi, A.; Tuominen, R.; Costa Svedman, F.; Caramuta, S.; Pernemalm, M.; Frostvik Stolt, M.; Kanter, L.; Kharaziha, P.; Lehtiö, J.; Hertzman Johansson, C.; et al. Silencing FLI or Targeting CD13/ANPEP Lead to Dephosphorylation of EPHA2, a Mediator of BRAF Inhibitor Resistance, and Induce Growth Arrest or Apoptosis in Melanoma Cells. *Cell Death Dis.* 2017, 8, e3029, doi:10.1038/cddis.2017.406.
 96. Zhang, C.; Smalley, I.; Emmons, M.F.; Sharma, R.; Izumi, V.; Messina, J.; Koomen, J.M.; Pasquale, E.B.; Forsyth, P.A.; Smalley, K.S.M. Noncanonical EphA2 Signaling Is a Driver of Tumor-Endothelial Cell Interactions and Metastatic Dissemination in BRAF Inhibitor-Resistant Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2021, 141, 840–851.e4, doi:10.1016/j.jid.2020.08.012.
 97. Fan, J.; Wei, Q.; Koay, E.J.; Liu, Y.; Ning, B.; Bernard, P.W.; Zhang, N.; Han, H.; Katz, M.H.; Zhao, Z.; et al. Chemoresistance Transmission via Exosome-Mediated EphA2 Transfer in Pancreatic Cancer. *Theranostics* 2018, 8, 5986–5994, doi:10.7150/thno.26650.
 98. Wang, Y.; Liu, Y.; Li, G.; Su, Z.; Ren, S.; Tan, P.; Zhang, X.; Qiu, Y.; Tian, Y. Ephrin Type-A Receptor 2 Regulates Sensitivity to Paclitaxel in Nasopharyngeal

- Carcinoma via the Phosphoinositide 3-kinase/Akt Signalling Pathway. *Mol. Med. Rep.* 2015, 11, 924–930, doi:10.3892/mmr.2014.2799.
99. Gai, Q.-J.; Fu, Z.; He, J.; Mao, M.; Yao, X.-X.; Qin, Y.; Lan, X.; Zhang, L.; Miao, J.-Y.; Wang, Y.-X.; et al. EPHA2 Mediates PDGFA Activity and Functions Together with PDGFRA as Prognostic Marker and Therapeutic Target in Glioblastoma. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022, 7, 33, doi:10.1038/s41392-021-00855-2.
 100. Moyano-Galceran, L.; Pietilä, E.A.; Turunen, S.P.; Corvigno, S.; Hjerpe, E.; Bulanova, D.; Joneborg, U.; Alkasalias, T.; Miki, Y.; Yashiro, M.; et al. Adaptive RSK-EphA2-GPRC5A Signaling Switch Triggers Chemotherapy Resistance in Ovarian Cancer. *EMBO Mol. Med.* 2020, 12, e11177, doi:10.15252/emmm.201911177.
 101. Shen, H.; Rodriguez-Aguayo, C.; Xu, R.; Gonzalez-Villasana, V.; Mai, J.; Huang, Y.; Zhang, G.; Guo, X.; Bai, L.; Qin, G.; et al. Enhancing Chemotherapy Response with Sustained EphA2 Silencing Using Multistage Vector Delivery. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2013, 19, 1806–1815, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2764.
 102. Huang, C.; Chen, Z.; He, Y.; He, Z.; Ban, Z.; Zhu, Y.; Ding, L.; Yang, C.; Jeong, J.-H.; Yuan, W.; et al. EphA2 Promotes Tumorigenicity of Cervical Cancer by Up-Regulating CDK6. *J. Cell. Mol. Med.* 2021, 25, 2967–2975, doi:10.1111/jcmm.16337.
 103. Kuo, M.T.; Long, Y.; Tsai, W.-B.; Li, Y.-Y.; Chen, H.H.W.; Feun, L.G.; Savaraj, N. Collaboration Between RSK-EphA2 and Gas6-Axl RTK Signaling in Arginine Starvation Response That Confers Resistance to EGFR Inhibitors. *Transl. Oncol.* 2020, 13, 355–364, doi:10.1016/j.tranon.2019.12.003.
 104. Tumeh, P.C.; Harview, C.L.; Yearley, J.H.; Shintaku, I.P.; Taylor, E.J.M.; Robert, L.; Chmielowski, B.; Spasic, M.; Henry, G.; Ciobanu, V.; et al. PD-1 Blockade Induces Responses by Inhibiting Adaptive Immune Resistance. *Nature* 2014, 515, 568–571, doi:10.1038/nature13954.
 105. Jiang, H.; Hegde, S.; Knolhoff, B.L.; Zhu, Y.; Herndon, J.M.; Meyer, M.A.; Nywening, T.M.; Hawkins, W.G.; Shapiro, I.M.; Weaver, D.T.; et al. Targeting Focal Adhesion Kinase Renders Pancreatic Cancers Responsive to Checkpoint

- Immunotherapy. *Nat. Med.* 2016, 22, 851–860, doi:10.1038/nm.4123.
106. Markosyan, N.; Li, J.; Sun, Y.H.; Richman, L.P.; Lin, J.H.; Yan, F.; Quinones, L.; Sela, Y.; Yamazoe, T.; Gordon, N.; et al. Tumor Cell-Intrinsic EPHA2 Suppresses Anti-Tumor Immunity by Regulating PTGS2 (COX-2). *J. Clin. Invest.* 2019, 129, 3594–3609, doi:10.1172/JCI127755.
 107. Lee, H.-Y.; Mohammed, K.A.; Goldberg, E.P.; Kaye, F.; Najmunnisa, N. Silencing Receptor EphA2 Enhanced Sensitivity to LipoplatinTM in Lung Tumor and MPM Cells. *Cancer Invest.* 2016, 34, 293–304, doi:10.1080/07357907.2016.1201678.
 108. Zhang, T.; Li, J.; Ma, X.; Yang, Y.; Sun, W.; Jin, W.; Wang, L.; He, Y.; Yang, F.; Yi, Z.; et al. Inhibition of HDACs-EphA2 Signaling Axis with WW437 Demonstrates Promising Preclinical Antitumor Activity in Breast Cancer. *EBioMedicine* 2018, 31, 276–286, doi:10.1016/j.ebiom.2018.05.003.
 109. Salem, A.F.; Wang, S.; Billet, S.; Chen, J.F.; Udompholkul, P.; Gambini, L.; Baggio, C.; Tseng, H.R.; Posadas, E.M.; Bhowmick, N.A.; et al. Reduction of Circulating Cancer Cells and Metastases in Breast-Cancer Models by a Potent EphA2-Agonistic Peptide-Drug Conjugate. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 2052–2061, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01837.
 110. Landen, C.N.J.; Chavez-Reyes, A.; Bucana, C.; Schmandt, R.; Deavers, M.T.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A.K. Therapeutic EphA2 Gene Targeting in Vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer Res.* 2005, 65, 6910–6918, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0530.
 111. Wagner, M.J.; Mitra, R.; McArthur, M.J.; Baze, W.; Barnhart, K.; Wu, S.Y.; Rodriguez-Aguayo, C.; Zhang, X.; Coleman, R.L.; Lopez-Berestein, G.; et al. Preclinical Mammalian Safety Studies of EPHARNA (DOPC Nanoliposomal EphA2-Targeted siRNA). *Mol. Cancer Ther.* 2017, 16, 1114–1123, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0541.
 112. Baggio, C.; Udompholkul, P.; Gambini, L.; Pellicchia, M. Targefrin: A Potent Agent Targeting the Ligand Binding Domain of EphA2. *J. Med. Chem.* 2022, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01391.
 113. Jannu, A.K.; Puppala, E.R.; Gawali, B.; Syamprasad, N.P.; Alexander, A.; Marepally, S.; Chella, N.; Gangasani, J.K.; Naidu, V.G.M. Lithocholic Acid-

- Tryptophan Conjugate (UniPR126) Based Mixed Micelle as a Nano Carrier for Specific Delivery of Niclosamide to Prostate Cancer via EphA2 Receptor. *Int. J. Pharm.* 2021, 605, 120819, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120819.
114. Xiao, T.; Xiao, Y.; Wang, W.; Tang, Y.Y.; Xiao, Z.; Su, M. Targeting EphA2 in Cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2020, 13, 114, doi:10.1186/s13045-020-00944-9.
 115. Wilson, K.; Shiuan, E.; Brantley-Sieders, D.M. Oncogenic Functions and Therapeutic Targeting of EphA2 in Cancer. *Oncogene* 2021, 40, 2483–2495, doi:10.1038/s41388-021-01714-8.

6. CAPÍTULO II

O segundo capítulo é destinado aos resultados obtidos a partir dos ensaios envolvendo a edição de *EPHA2* em MCF7 e discussão. Esses resultados ainda não foram estruturados no formato de um artigo científico pois há a intenção de complementá-lo com mais dados antes da submissão.

6.1. RESULTADOS

6.1.1. Obtenção de clones potencialmente editados em *EPHA2*

Após a transfecção dos plasmídeos PX461 e PX461 modificado em células MCF7, era possível visualizar, em microscópio de fluorescência invertido, células com fluorescência verde, vermelha, ou de ambas as cores (Figura 14).

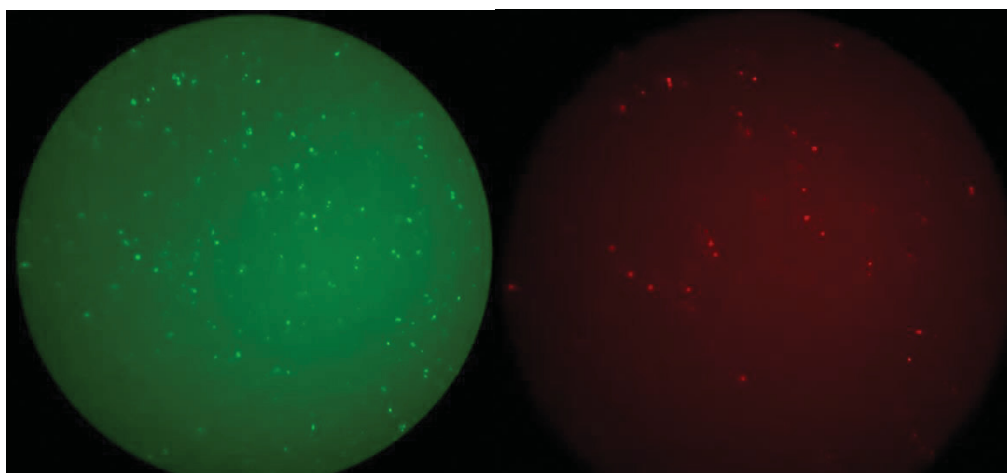


Figura 14: Imagem da microscopia de fluorescência de células da linhagem MCF7 transfectadas com os plasmídeos PX461 e PX461 modificado, carregando as sequências para os gRNAs cujo alvo é o gene *EPHA2*.

A metodologia de seleção clonal que foi utilizada neste trabalho, via FACS, teve como objetivo selecionar apenas as células que apresentassem ambas as fluorescências. Estas seriam cultivadas a partir de *single cell*, em placas de 96 poços (Figura 15).

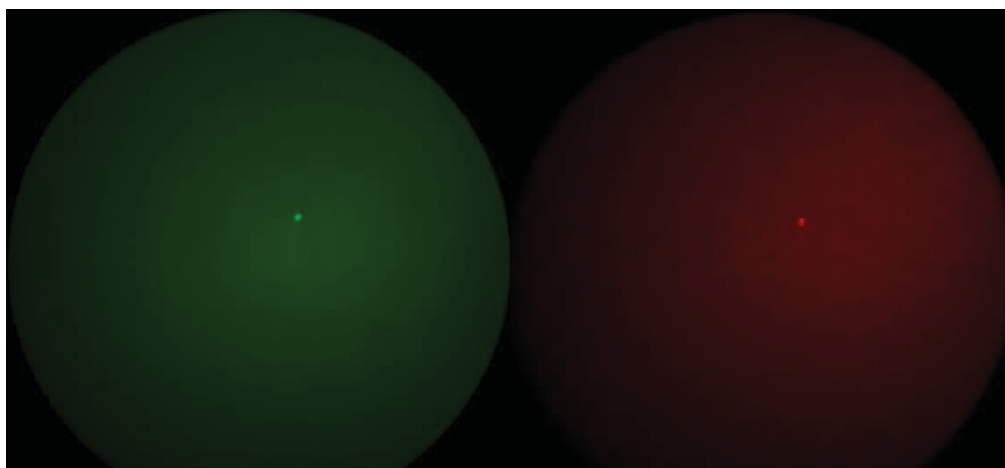


Figura 15: Imagem da microscopia de fluorescência, após seleção clonal, de uma célula da linhagem MCF7 transfectada com os plasmídeos PX461 e PX461 modificado, carregando as sequências para os gRNAs cujo alvo é o gene *EPHA2*.

A seleção clonal via FACS é uma metodologia agressiva para as células. Além disso, células humanas crescem melhor quando na presença de uma população de células, de modo a estimular a comunicação intercelular. Dessa forma, muitas das células selecionadas acabam morrendo logo após o processo de seleção ou durante as primeiras semanas de cultivo. Inicialmente, foram recuperados 16 clones com *EPHA2* potencialmente editado, nomeados como *EPHA2* #1 a *EPHA2* #16. Todavia, três desses morreram nas primeiras semanas (*EPHA2* #4, *EPHA2* #5 e *EPHA2* #8), restando 13 clones potencialmente editados.

6.1.2. Sequenciamento dos clones *EPHA2*

Como mencionado na Seção 4.4.1, uma estratégia de PCR (Figura 12) seguida de eletroforese em gel foi planejada e utilizada para fazer uma triagem inicial dos clones com maior potencial de edição. A Figura 16 traz, como exemplo, um desses géis. Nesse gel, foram testados apenas quatro clones: *EPHA2* #1, *EPHA2* #2, *EPHA2* #3 e *EPHA2* #6. Os clones #1, #2 e #3 apresentaram o padrão de bandas esperado para células não editadas e, por isso, os produtos de PCR de 505pb foram destinados às reações de purificação e sequenciamento sem serem previamente clonados no vetor plasmidial pTZ57R/T. O clone *EPHA2* #6, por outro lado, apresentou um padrão de

bandas esperado para a edição gênica (Figura 16). Nesse caso, a banda de 205pb não está presente, lembrando que o *primer forward* nessa reação é interno à região-alvo para edição, indicando a perda da especificidade do oligonucleotídeo iniciador. Além disso, para esse clone, a banda de 505pb aparece dividida em duas bandas, indicando mutações indel distintas para cada cromossomo nas células do clone EPHA2 #6. Géis como esse foram feitos para todos os clones obtidos, e as informações estão resumidas no Quadro 6.

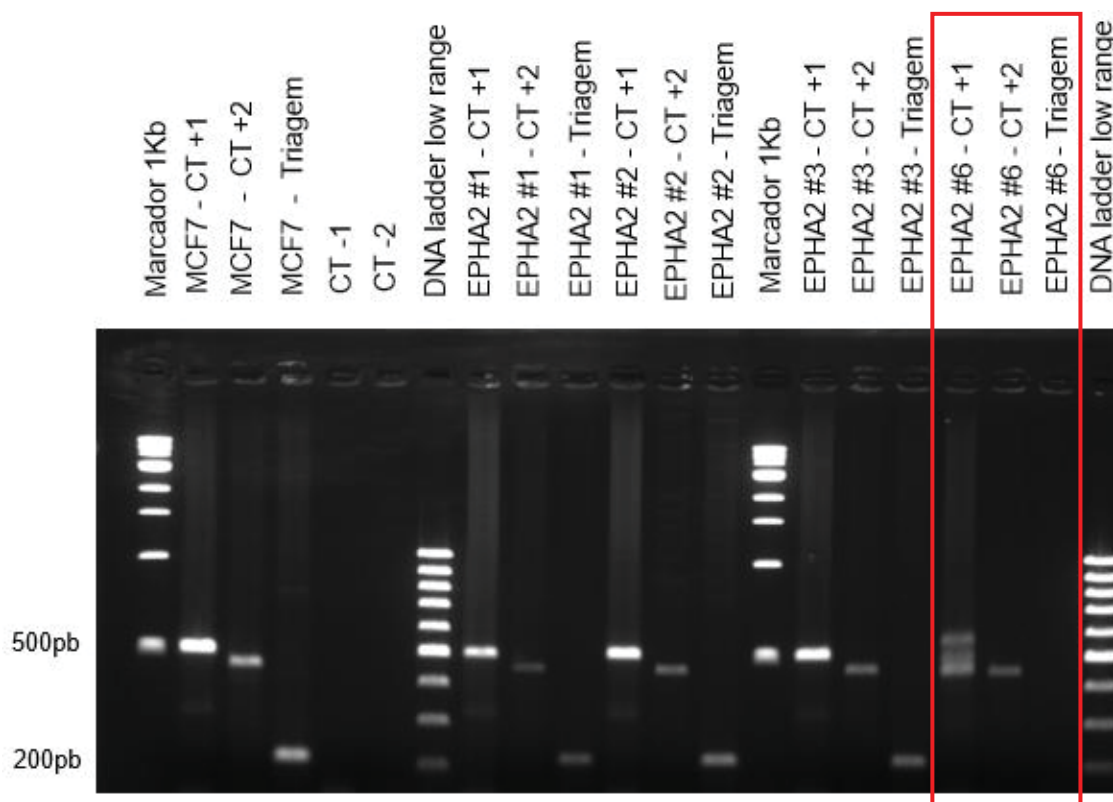


Figura 16: Exemplo de gel de eletroforese para triagem de clones potencialmente editados para o gene *EPHA2*. **MCF7**: o DNA utilizado era proveniente de células MCF7 selvagens. **EPHA2 #X**: o DNA utilizado era proveniente do clone #X, sendo $1 \leq X \leq 16$. **CT +1**: foram utilizados os *primers* para o fragmento maior de *EPHA2* (505pb). **CT +2**: foram utilizados os *primers* para o fragmento maior de *PBX1* (455pb), também utilizado como controle de reação. **Triagem**: foram utilizados os *primers* para o fragmento menor de *EPHA2* (205pb). **CT -1**: controle negativo utilizando os *primers* para o fragmento maior de *EPHA2*. **CT -2**: controle negativo utilizando os *primers* para o fragmento menor de *EPHA2*. O retângulo em vermelho delimita a região contendo os poços destinados às PCRs do clone EPHA2 #6.

Quadro 6: Resumo das informações obtidas a partir dos géis de eletroforese, e as estratégias escolhidas para o sequenciamento dos clones EPHA2 #1 a EPHA2 #16.

Clone	Potencial de edição	Clonagem em pTZ57R/T
EPHA2 #1	Baixo	Não
EPHA2 #2	Baixo	Não
EPHA2 #3	Baixo	Não
EPHA2 #6	Alto	Sim
EPHA2 #7	Baixo	Não
EPHA2 #9	Baixo	Não
EPHA2 #10	Baixo	Não
EPHA2 #11	Baixo	Não
EPHA2 #12	Baixo	Não
EPHA2 #13	Alto	Sim
EPHA2 #14	Baixo	Não
EPHA2 #15	Baixo	Não
EPHA2 #16	Alto	Sim

Os produtos de PCR de 505pb de todos os clones com baixo potencial de edição foram purificados, submetidos à reação de sequenciamento, precipitados e sequenciados. Todos, sem exceção, estavam com a sequência de DNA inalterada.

Para os clones EPHA2 #6, EPHA2 #13 e EPHA2 #16, os fragmentos maiores de PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T e o DNA plasmidial foi extraído e submetido à PCR previamente às etapas de purificação, reação de sequenciamento, precipitação e sequenciamento propriamente dito. O Quadro 7 resume os efeitos da edição nesses três clones. Como o clone EPHA2 #6 foi selecionado para os ensaios funcionais, as edições nas sequências dos cromossomos homólogos, bem com as alterações na sequência peptídica podem ser visualizadas com mais detalhes na Figura 17.

Quadro 7: Efeitos das edições nas sequências de DNA dos clones EPHA2 editados.

Clone	Cromossomo	Tipo de mutação	Região	Posição	Efeito
EPHA2 #6	Homólogo 1	Deleção - 49pb	Éxon 3	Chrom. 1: 16148938-16148986	<i>Frameshift</i> a partir da posição 72 da proteína, e <i>stop</i> codon prematuro na posição 145
	Homólogo 2	Deleção - 113pb	Intron 2 / Éxon3	Chrom. 1: 16148967-16149079	Possível deleção do éxon 3, gerando <i>frameshift</i> a partir da posição 52 da proteína, e <i>stop</i> codon prematuro na posição 169
EPHA2 #13	Homólogo 1	Deleção - 32pb	Éxon 3	Chrom. 1: 16148962-16148993	<i>Frameshift</i> a partir da posição 70 da proteína, e <i>stop</i> codon prematuro na posição 81 da proteína
	Homólogo 2	Adição - 115pb	Éxon 3	Entre Chrom. 1: 16148963 e 16148964	<i>Frameshift</i> a partir da posição 80 da proteína, e <i>stop</i> codon prematuro na posição 130
EPHA2 #16	Homólogo 1	Substituição - 2pb Deleção - 26pb	Éxon 3	Substituição Chrom. 1: 16149047 e 16148952 Deleção Chrom. 1: 16148955-16148980	Substituição de aminoácido na posição 52 da proteína, <i>frameshift</i> a partir da posição 74 e <i>stop</i> codon prematuro na posição 75
	Homólogo 2	Adição - 122pb	Éxon 3	Entre Chrom. 1: 16148971-16148972	<i>Frameshift</i> a partir da posição 77 da proteína, e <i>stop</i> codon prematuro na posição 113

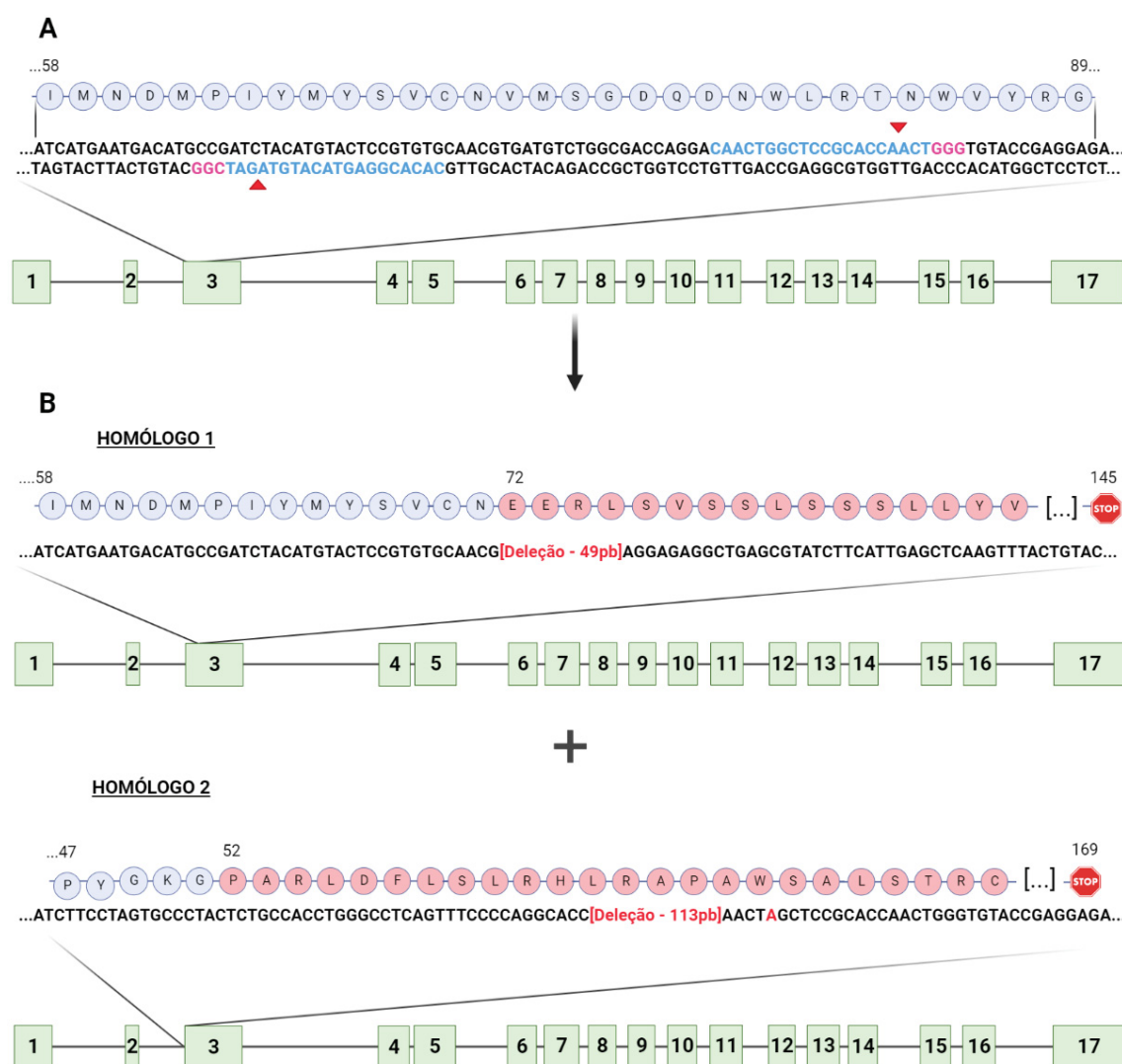


Figura 17: Edição gênica e alteração peptídica no clone EPHA2 #6. **A:** sequência gênica e peptídica da célula antes da edição. A edição foi realizada no éxon 3 do gene *EPHA2*. Ambas as sequências de DNA da fita codificante (em cima) e da fita complementar (embaixo) estão representadas. Em azul, está a sequência alvo do gRNA, e em rosa a sequência PAM. Os triângulos vermelhos indicam os sítios de corte unifilamentar da Cas9 *nickase*. Acima da sequência está a região correspondente da sequência peptídica após a tradução do mRNA, sendo que o EPHA2 possui, ao todo, 976 aminoácidos. **B:** edição alcançada nos dois cromossomos homólogos na célula MCF7. Nessas imagens, apenas a sequência da fita codificante foi apresentada. Todas as alterações nas sequências de DNA e peptídica estão sinalizadas em vermelho. No cromossomo homólogo 1, houve uma deleção de 49 pares de base, gerando um *frameshift* a partir da posição 72 na proteína e um stop códon prematuro na posição 145. No cromossomo homólogo 2, houve uma substituição e uma deleção de 113 pares de base, possivelmente deletando o éxon 3 no mRNA, gerando um *frameshift* a partir da posição 52 na proteína e um stop códon prematuro na posição 169.

6.1.3. EphA2 reduz a viabilidade celular de células MCF7

O EphA2 é um receptor tirosina-quinase que já foi relacionado a diversas funções oncogênicas. Quanto à viabilidade celular, esse receptor pode agir de modo bidirecional conforme o contexto em que está inserido. Em células de câncer cervical, EphA2 foi relacionado com o aumento da viabilidade celular (HUANG *et al.*, 2021). Por outro lado, a ativação de EphA2 com o domínio extracelular da efrina-A1 levou à redução da viabilidade de células de câncer de mama triplo negativas (NOBLITT *et al.*, 2008). Possivelmente, esse comportamento aparentemente controverso de EphA2 deve-se à forma como ele é ativado. A ativação canônica de EphA2, a partir da ligação com efrinas, leva à clusterização do receptor na superfície celular, seguido de sua internalização e degradação (MIAO *et al.*, 2001; WALKER-DANIELS *et al.*, 2002). Em contrapartida, quando EphA2 é ativado pela via não canônica, na qual ocorre a fosforilação da serina 897 em EphA2, ocorre a ativação da via Ras/ERK1/2/MAPK, a qual pode levar à fenótipos oncogênicos se desregulada (YEDDULA *et al.*, 2015; BURASCHI *et al.*, 2020).

Dessa forma, o papel de EphA2 na viabilidade celular foi avaliado em células de câncer de mama luminal A, especificamente em MCF7, ao comparar as células editadas EPHA2 #6 com a MCF7 selvagem (wt – do inglês, *wild type*). A viabilidade foi mensurada pelo método da resazurina após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de plaqueamento e são apresentadas como viabilidade celular relativa ao controle (MCF7 wt) no tempo de 24 horas (Figura 18). A viabilidade das células EPHA2 #6 foi aproximadamente 60% maior do que nas células MCF7 wt após 24 horas de cultivo celular ($p = 0,0164$), 48% maior após 48 horas ($p = 0,0077$) e 67% maior após 72 horas de cultivo ($p = 0,0226$). Nos tempos de 96 e 120 horas a diferença não foi significativa, possivelmente porque as células EPHA2 #6 atingiram um platô metabólico.

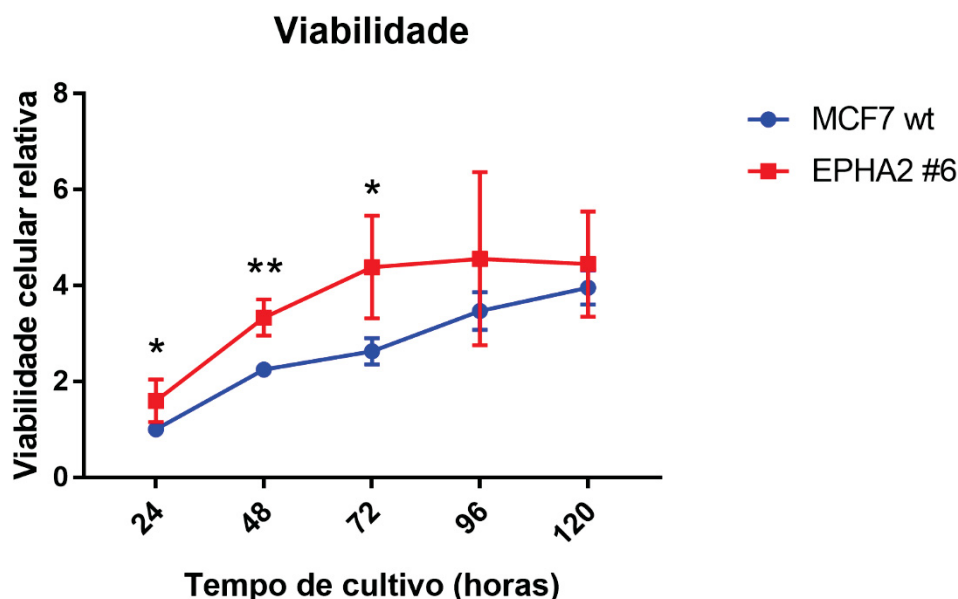


Figura 18: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene *EPHA2* e das células MCF7 em diferentes tempos de cultivo. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Os resultados desses ensaios mostraram que as células que expressam EphA2 funcional (MCF7 wt) apresentam viabilidade celular reduzida quando comparadas com as células que expressam a proteína EphA2 truncada (EPHA2 #6), sugerindo que o EphA2 pode reduzir a viabilidade das células.

6.1.4. EphA2 reduz a proliferação celular em células MCF7

Assim como para a viabilidade, o EphA2 pode ter um comportamento bidirecional no que diz respeito à indução de proliferação celular, de acordo com a via de ativação. Enquanto a via canônica inibe efeitos proliferativos, a via não-canônica ativa a via Ras/ERK1/1/MAPK, promovendo a proliferação. Dessa forma, investigamos como o EphA2 atua nas células de câncer de mama luminal A MCF7. Após as primeiras 24 horas de cultivo, o número de células EPHA2 #6 era aproximadamente 53% maior do que o de células MCF7 wt ($p = 0,0022$). Já após 48 e 72 horas, o número de células editadas correspondia a mais do que o dobro de células selvagens, com valores de $p = 0,0077$ e $p = 0,0303$, respectivamente (Figura 19).

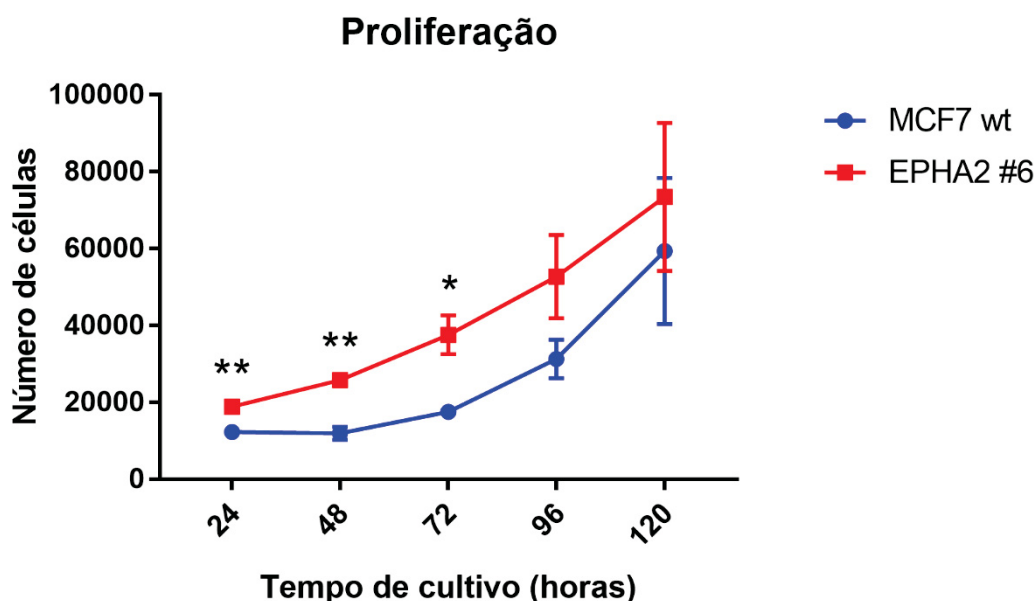


Figura 19: Proliferação celular mensurada a partir do método colorimétrico com cristal violeta, comparando o número de células EPHA2 #6 e de células MCF7 wt em diferentes tempos de cultivo. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Apesar de ainda manter uma diferença importante após 96 e 120 horas de incubação, os desvios padrões elevados indicaram que não havia significância nesses tempos. É possível que isso tenha ocorrido devido ao espaço limitado para divisão celular nos poços da placa de 96 poços. Como a curva padrão foi construída com uma concentração máxima de 64 mil células por poço, não é possível garantir que a equação da reta represente bem quantidades de células maiores de que esse valor, como é o caso do número de células após 120 horas. Além disso, mesmo para quantidades de células menores do que 64 mil, como no caso da quantidade de células após 96 horas de cultivo, pode ter ocorrido alguma variação na taxa proliferativa devido as células no interior das colônias formadas ao longo dos primeiros dias não conseguirem se multiplicar com a mesma eficiência das células nas bordas das colônias.

Os resultados indicam que as células que expressam EphA2 funcional (MCF7 wt) apresentam proliferação celular reduzida quando comparadas com as células que expressam a proteína EphA2 truncada (EPHA2 #6), sugerindo que o EphA2 está agindo por meio da via canônica em células MCF7.

6.1.5. EphA2 aumenta a capacidade clonogênica de células MCF7

Um grande desafio para células malignas em um tumor primário é, além de adquirir a capacidade de invadir vasos sanguíneos e linfáticos, conseguir sobreviver e formar novas colônias em um tecido secundário, diferente do original, iniciando o processo de metástase. O receptor EphA2 já foi associado com metástase em alguns tipos de câncer, incluindo nasofaríngeo (LI *et al.*, 2019), colorretal (SAITO *et al.*, 2004) e gástrico (YUAN *et al.*, 2009). O ensaio de capacidade clonogênica traz importantes informações sobre o potencial metastático de células tumorais. Dessa forma, esse ensaio foi utilizado para avaliar a capacidade das células EPHA2 #6 formarem colônias, em comparação com as células selvagens.

Quando o gene *EPHA2* foi editado, levando à posterior tradução de uma proteína truncada, foram obtidas $134,3 \pm 4,6$ (média \pm erro padrão) colônias, enquanto as células MCF7 não-editadas formaram $175,1 \pm 12,5$ colônias. Logo, as células alteradas apresentaram uma capacidade de formação de colônia 23,3% menor do que as células selvagens ($p = 0,0181$), corroborando com os dados encontrados na literatura (Figura 20).

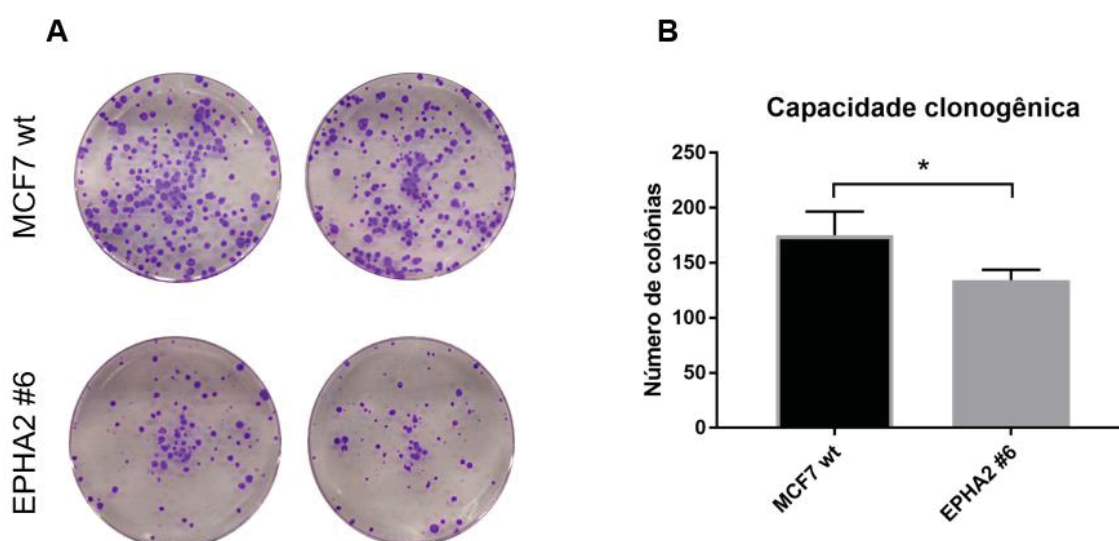


Figura 20: Comparação da capacidade clonogênica das células EPHA2 #6 e das células não-editadas. **A:** Fotografias de alguns poços dos ensaios de capacidade de formação de colônias. Na região superior da figura, poços contendo células de MCF7 wt coradas após 15 dias de cultivo do ensaio. Na região inferior, poços com as células editadas e coradas após os 15 dias de cultivo. **B:** Número de colônias formadas após 15 dias de cultivo de células EPHA2 #6 e de células MCF7 wt. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foi adotado o valor de significância: * $p \leq 0,05$.

Esses resultados sugerem que o EphA2 pode estar associado a um aumento do risco de metástase em câncer de mama luminal A.

6.1.6. EphA2 aumenta a resistência ao tamoxifeno de modo dose-dependente e tempo-dependente

Tendo em vista o forte papel desempenhado pelo EphA2 na resistência a diferentes agentes terapêuticos contra o câncer, investigamos seu papel na resistência ao tamoxifeno em MCF7. Apesar de EphA2 já ter sido previamente reportado como modulador da resistência ao tamoxifeno em células de câncer de mama luminal A por Lu *et al.* (2003) e Gökmen-Polar *et al.* (2011), ambos os estudos eram do mesmo grupo e utilizaram uma metodologia onde a expressão de EphA2 era aumentada na célula através da transfecção de vetores carregando o gene *EPHA2*. Além disso, não foi encontrado nenhum novo estudo desde 2011. Dessa forma, torna-se necessário novos ensaios que validem ou refutem os resultados encontrados por Lu *et al.* (2003) e Gökmen-Polar *et al.* (2011), de modo a incentivar novas pesquisas que aprofundem o

entendimento da modulação da sensibilidade ao tamoxifeno por EphA2 em cânceres de mama ER+.

Sendo assim, a viabilidade das células EPHA2 #6 e MCF7 wt foi mensurada pelo método da resazurina após 72 e 96 horas de tratamento com a aplicação de diferentes concentrações do tamoxifeno (Figura 21). Após 72 horas de tratamento, as células EPHA2 #6 apresentaram viabilidade reduzida em 11,6% ($p = 0,00005$), 15,7% ($p = 0,00016$) e 12,4% ($p = 0,00008$) em relação às células selvagens nas concentrações de 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente. As concentrações de 20 μ M e 40 μ M foram elevadas o suficiente para reduzir a viabilidade de ambas as células sem diferença significativa. Para um tratamento um pouco mais prolongado, de 96 horas, a diferença na viabilidade celular se manteve significativa apenas para a concentração de 10 μ M ($p = 0,02108$).

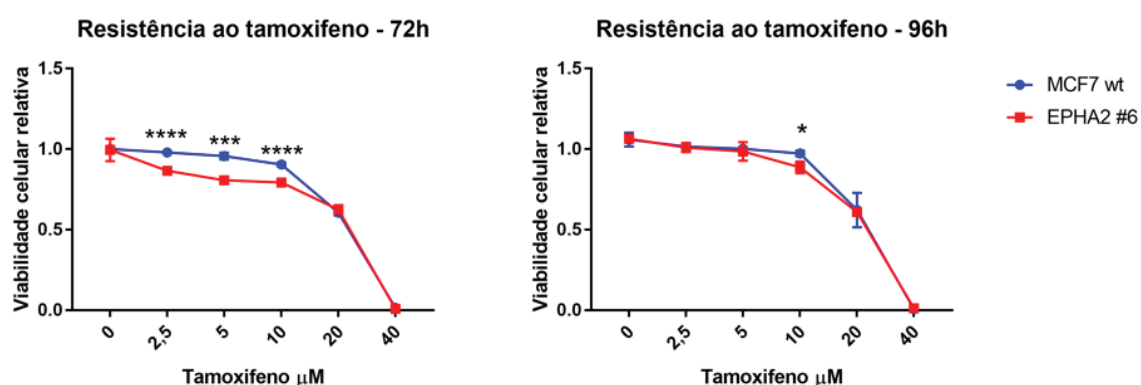


Figura 21: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene *EPHA2* e das células MCF7 wt em 72 e 96 horas de tratamento com diferentes concentrações de tamoxifeno. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Esses resultados sugerem que o EphA2 aumenta a resistência ao tamoxifeno de células MCF7 de maneira dose-dependente e tempo-dependente.

6.2. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente no mundo, e o quinto que mais leva a óbito, considerando ambos os gêneros (SUNG *et al.*, 2021). A classificação imunoistoquímica permite a avaliação de prognóstico e funciona como um guia para o planejamento das estratégias terapêuticas a serem tomadas, de modo a aumentar a eficiência do tratamento. Dentre os subtipos imunoistoquímicos, o luminal A é o mais comum, correspondendo a mais de 70% dos casos (ACS, 2019). Esse subtipo caracteriza-se, principalmente, pela expressão do receptor de estrogênio, ausência de super expressão ou amplificação de HER2 e baixa expressão de Ki67 (ACS, 2019). Essas características tornam o subtipo luminal A o de melhor prognóstico por ser, geralmente, menos agressivo em comparação com os demais, além de se beneficiar com o tratamento específico com hormonioterapia (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; ACS, 2019). Dentre os medicamentos utilizados na terapia-alvo, o tamoxifeno é uma das principais escolhas (revisado em BARAZETTI *et al.*, 2021). Entretanto, com o tratamento contínuo e prolongado com tamoxifeno, é comum o surgimento de células tumorais resistentes a essa medicação (WARDELL *et al.*, 2015; JORDAN, 2018).

EphA2 é um importante receptor tirosina quinase que vem sendo frequentemente associado com resistência a quimioterápicos e a diversas terapias-alvo. No entanto, apenas dois trabalhos, ambos do mesmo grupo, sugerem que esse receptor está envolvido com a resistência ao tamoxifeno em câncer de mama (LU *et al.*, 2003; GÖKMEN-POLAR *et al.*, 2011). Dessa forma, o papel de EphA2 na modulação da resposta ao tamoxifeno foi investigado em células MCF7 no presente trabalho. Além disso, foram conduzidos ensaios funcionais de viabilidade celular, proliferação e capacidade clonogênica, a fim de proporcionar um entendimento mais amplo e integral de como o EphA2 atua em células de câncer de mama luminal A.

Os resultados obtidos sugerem que o EphA2 reduz a viabilidade celular de MCF7. Esses dados corroboram com os encontrados por Dohn *et al.* (2001), no qual a indução de EphA2 reduziu a viabilidade de células MCF7 por meio do

aumento na taxa de apoptose celular. Dohn *et al.* (2001) também conseguiram demonstrar que a expressão de efrina A1 é positivamente regulada por p53 e p73, em resposta a danos celulares. Dessa forma, os autores sugerem que a ligação efrina A1-EphA2 seria responsável por sensibilizar a célula a sinais pró-apoptóticos em caso de dano ao DNA (DOHN *et al.* 2001). A interação entre efrina A1 e EphA2 também reduziu a viabilidade de células de gliomas e de carcinoma de cabeça e pescoço por meio da inibição da fosforilação de ERK (LARSEN *et al.*, 2010).

Por outro lado, o EphA2 já foi positivamente associado com o aumento da viabilidade celular em diversos tipos de câncer, tais como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (LIU *et al.*, 2012), câncer de mama triplo negativo (SONG *et al.*, 2017), carcinoma nasofaríngeo (TAN *et al.*, 2012) e câncer de pulmão (ISHIGAKI *et al.*, 2019).

Estudos que investigaram mais profundamente o mecanismo de atuação de EphA2 indicam que a sua ativação a partir da ligação à efrina A1 leva à internalização do receptor, impedindo a ativação da via EphA2/MAPK (MACRAE *et al.*, 2005), enquanto a ativação não canônica de EphA2 leva à ativação da via Ras/MAPK (LARSEN *et al.*, 2007; BRANTLEY-SIEDERS *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2015). Uma vez que essa via pode levar à proliferação e à sobrevivência celular, as quais impactam nos índices de viabilidade mensurados por métodos como o da resazurina, os diferentes modos de ativação de EphA2 podem resultar em fenótipos contrastantes em relação à viabilidade. Dessa forma, o papel de EphA2 na viabilidade celular está intrinsicamente relacionado com a forma na qual o receptor está sendo ativado em um determinado contexto. Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que EphA2 é ativado pela via canônica em MCF7, causando diminuição da viabilidade celular.

O método da resazurina, utilizado para mensurar a viabilidade celular, é uma metodologia colorimétrica que se baseia em reações redox em resposta às atividades metabólicas das células. Sendo assim, apenas com esse ensaio não é possível dizer se a maior viabilidade das células editadas se deve a uma

alteração no metabolismo energético ou a uma diferença na quantidade de células, seja por maiores taxas proliferativas ou menores índices de morte celular. Para aprofundar um pouco mais a investigação, a proliferação celular foi medida por meio do método colorimétrico com cristal violeta. Trabalhos de outros grupos apontam uma atuação tanto pró-proliferativa quanto antiproliferativa de EphA2. Song *et al.* (2017) sugerem que EphA2 aumenta a proliferação de células de câncer de mama do subtipo triplo-negativo. Esse comportamento também foi verificado em câncer de pulmão (AMATO *et al.*, 2016). Por outro lado, a ativação de EphA2 pela ligação com a efrina A1 foi responsável por reduzir a proliferação de células de mesotelioma (NASREEN *et al.*, 2007). Neste trabalho, os resultados dos ensaios de proliferação celular indicaram que EphA2 atua de modo a reduzir a proliferação celular de células MCF7, o que seria esperado no caso da ativação de EphA2 pela via canônica. Em conjunto, os resultados indicam que a redução da viabilidade celular por EphA2 deve-se, pelo menos em parte, aos efeitos antiproliferativos desse receptor, possivelmente ativado pela via canônica.

Curiosamente, os resultados também indicaram que o EphA2 aumenta a capacidade das células MCF7 de formar colônias, em comparação com as células EPHA2 #6, nas quais o gene *EPHA2* codifica uma proteína truncada. Esse comportamento oncogênico parece contraditório em relação à atuação supressora de tumor de EphA2 na viabilidade e proliferação celular. No entanto, a efrina A1 está majoritariamente ancorada à membrana citoplasmática, e não solúvel no meio de cultivo. Sendo assim, no ensaio de capacidade clonogênica, onde a densidade celular é baixa, as células ficam inicialmente isoladas, distantes umas das outras. Sem a interação ligante-receptor, EphA2 seria ativado pela via não canônica e perderia seu efeito supressor. Quando Miao *et al.* (2001) avaliaram a estimulação de células de câncer de próstata com efrina A1-Fc ou apenas Fc, eles demonstraram que a falta de suplementação da efrina A1 aumenta a capacidade das células formarem colônias, o que corroboraria com a hipótese de que as células MCF7 wt formam mais colônias do que as células editadas em *EPHA2* devido à ativação não canônica do receptor.

Ainda, EphA2 aumenta a resistência de células MCF7 ao tamoxifeno, o que está de acordo com os resultados de (LU *et al.*, 2003; GÖKMEN-POLAR *et al.*, 2011). Em relação a outras terapias-alvo, EphA2 já foi associado com a resistência a cetuximab, sorafenib e afatinib em câncer colorretal, hepático e gástrico, respectivamente (CUI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020). Além disso, EphA2 diminui a sensibilidade de células tumorais a quimioterápicos (YAO *et al.*, 2022) e à radioterapia (GONG *et al.*, 2021).

Em resumo, os resultados desse trabalho demonstraram que EphA2 pode atuar como um supressor de tumor nos estágios iniciais de câncer de mama positivos para o receptor de estrogênio. No entanto, a progressão tumoral pode levar o EphA2 a exercer papéis oncogênicos fundamentais no processo metastático e no desenvolvimento de resistência ao tamoxifeno. É possível que essa alteração no comportamento de EphA2 seja consequência da via pela qual ele é ativado. Contudo, esta hipótese não foi testada neste trabalho.

Conforme o demonstrado no Capítulo I, muitos estudos indicam que EphA2 é um bom alvo em potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos de combate ao câncer. Todavia, os resultados apresentados no Capítulo II mostram que é necessário cautela ao utilizar inibidores de EphA2 em cânceres de mama luminais. Uma abordagem terapêutica promissora seria o desenvolvimento de medicamentos que mimetizem a ligação entre efrina A1 e EphA2, ou que previna a fosforilação da serina na posição 897 de EphA2.

6.3. CONCLUSÕES

O câncer de mama é responsável pela maior mortalidade por câncer em mulheres (SUNG *et al.*, 2021). Apesar de ter um melhor prognóstico, o subtipo luminal A é o mais frequente, correspondendo a mais de 70% dos casos (ACS, 2019). Além dos tratamentos mais tradicionais, que incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, as pacientes diagnosticadas com esse subtipo tumoral se beneficiam com a hormonioterapia, sendo o tamoxifeno um dos principais medicamentos prescritos. Todavia, uma parcela expressiva dos

tumores eventualmente desenvolve resistência a essa medicação, o que permite a recidiva. Sendo assim, a busca de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novas terapias-alvo é essencial para a manutenção de um tratamento eficiente.

O receptor tirosina quinase EphA2 vem sendo bastante investigado como um potencial alvo terapêutico em diversos tipos de câncer – incluindo o de mama – tanto para o tratamento de tumores em estágios mais iniciais quanto para aqueles refratários à terapia convencional. Entretanto, este trabalho demonstrou que, apesar de EphA2 possivelmente aumentar o risco de metástase e diminuir a sensibilidade das células cancerosas ao tamoxifeno, esse receptor também pode exercer um papel protetivo em relação à progressão de carcinomas mamários positivos para o receptor de estrogênio, principalmente em estágios mais iniciais da doença. Dessa forma, é preciso aprofundar a investigação dos mecanismos pelos quais EphA2 atua como supressor de tumor ou como oncoproteína em câncer de mama luminal A. Caso a hipótese de alteração da via de ativação do receptor seja comprovada, essa informação deve ser considerada na busca de moléculas que neutralizem a ação oncogênica de EphA2.

6.4. PERSPECTIVAS

Este estudo demonstrou que EphA2 é um alvo em potencial para o tratamento do câncer de mama luminal A. Porém, talvez o mais importante seja modular a forma pela qual EphA2 é ativado, de modo a prevenir a ativação da via não canônica, tida como oncogênica. Para isso, primeiramente o *western blotting* deve ser concluído para comprovar que a proteína do EphA2 está, de fato, ausente. Essa etapa já foi iniciada. Entretanto, deve ser incluída a utilização de anticorpos primários cujos alvos sejam o EphA2 fosforilado na tirosina 588, e fosforilado na serina 897 – que caracteriza a ativação da via canônica e não canônica, respectivamente.

Seria interessante realizar ensaios funcionais de morte celular e ciclo celular, para aprofundar o nível de entendimento de como o EphA2 age nas

células MCF7. Além disso, a investigação de uma possível alteração de expressão de genes envolvidos no metabolismo energético celular também seria válida para concluir como a viabilidade celular é impactada por EphA2. Para isso, amostras de RNA total foram extraídas dos clones EPHA2 #6 e de MCF7 wt, em triplicatas independentes, e enviadas para o estudo de RNAseq.

7. CAPÍTULO III

O Capítulo III apresenta o artigo científico, intitulado ***PBX1: a key character of the hallmarks of cancer***. Trata-se de uma revisão bibliográfica cujo objetivo é entender como o PBX1 atua na carcinogênese, organizando suas funções dentro dos *hallmarks* do câncer (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; HANAHAHAN & WEINBERG, 2011). De acordo com esse artigo, sugere-se que o PBX1 está envolvido com, pelo menos, cinco dos dez *hallmarks* do câncer: sinalização proliferativa sustentada, invasão e metástase, indução de angiogênese, resistência à morte celular e desregulação do metabolismo energético. A atuação de PBX1 nos outros *hallmarks* não pode ser descartada, uma vez que não há estudos o suficiente que suportem ou descartem um papel de PBX1 nesses *hallmarks*. Todavia, a relação de alguns alvos transcripcionais de PBX1 com processos inflamatórios promotores de tumor e com o escape do sistema imune podem indicar a atuação de PBX1 nessas vias. Esse artigo foi publicado na revista *Journal of Molecular Medicine* (FI 5.606) em setembro de 2021 e está formatado conforme as normas da revista.



PBX1: a key character of the hallmarks of cancer

Rafaela Nasser Veiga¹ · Jaqueline Carvalho de Oliveira¹ · Daniela Fiori Gradia¹

Received: 14 June 2021 / Revised: 17 August 2021 / Accepted: 8 September 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1 (PBX1) was first identified as part of a fusion protein resulting from the chromosomal translocation t(1;19) in pre-B cell acute lymphoblastic leukemias. Since then, PBX1 has been associated with important developmental programs, and its expression dysregulation has been related to multifactorial disorders, including cancer. As PBX1 overexpression in many cancers is correlated to poor prognosis, we sought to understand how this transcription factor contributes to carcinogenesis, and to organize PBX1's roles in the hallmarks of cancer. There is enough evidence to associate PBX1 with at least five hallmarks: sustaining proliferative signaling, activating invasion and metastasis, inducing angiogenesis, resisting cell death, and deregulating cellular energetics. The lack of studies investigating a possible role for PBX1 on the remaining hallmarks made it impossible to defend or refute its contribution on them. However, the functions of some of the PBX1's transcription targets indicate a potential engagement of PBX1 in the avoidance of immune destruction and in the tumor-promoting inflammation hallmarks. Interestingly, PBX1 might be a player in tumor suppression by activating the transcription of some DNA damage response genes. This is the first review organizing PBX1 roles into the hallmarks of cancer. Thus, we encourage future studies to uncover the PBX1's underlying mechanisms to promote carcinogenesis, for it is a promising diagnostic and prognostic biomarker, as well as a potential target in cancer treatment.

Keywords PBX1 · Cancer hallmarks · Pioneer factor · Biomarker

Introduction

PBX1 encodes the pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1, which belongs to the PBX1-4 family and is an important transcription factor that regulates multiple developmental programs. Since altered expression or mutations in *loci* that encode proteins involved in regulatory networks are frequently linked to cancer development and progression, as soon as *PBX1* was identified in 1990 [1, 2], it started to be associated with cancer [3–5].

PBX1 historical features

PBX1 was first named as *Prl* (pre-B cell leukemia) when its homeobox domain was identified as part of the chromosomal

translocation t(1;19) in pre-B cell acute lymphoblastic leukemias by two independent groups [1, 2]. It was redesigned as PBX1 to prevent people from confusing it with the prolactin gene, also called *PRL* [6].

The products of the fusion between *E2A* and *PBX1* genes have been associated with malignant cell transformation [6–8], cell development [7, 8], cell differentiation [9], proliferation [7, 8], apoptosis [7, 10, 11], and cell immortalization [8] — all of them in the context of carcinogenesis. The oncogenic effects observed in the fusion protein E2a-PBX1 might arise from the combination of the homeodomain present in the PBX1 portion of the new protein and the transcription factor activity of E2a, thus disrupting the regulation of genes controlled by PBX1 or its related family members PBX1-4 [12, 13].

PBX1 functions

The *PBX1* gene has over 340 kb and is located at chromosome 1q23.3. It encodes for PBX1 protein, a family of highly conserved homeodomain proteins (PBX1-4) [14, 15]. The homeodomain commonly presents three α helices folded into

✉ Daniela Fiori Gradia
danielagradia@ufpr.br

¹ Laboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Department of Genetics, Postgraduate Program in Genetics, Universidade Federal Do Paraná, Rua Coronel Francisco Heráclito Dos Santos, 100, Jardim das Américas Curitiba, CEP 81531-980, Brazil

a globular structure and forms a helix-turn-helix motif with typically 60 amino acids responsible for the DNA binding activity [16–18]. Once homeodomains are highly conserved, responsible for specific DNA-binding and well known for functioning as important regulators in developmental programs (reviewed in [19]), it did not take too long for the newly discovered *PBX1* gene to become a subject of interest itself.

Regarding its regulatory activities, PBX1 was extensively studied as a cofactor that forms heterodimers with several Hox homeodomain proteins to bind DNA with high specificity and to promote gene transcription [20–24]. Other heterodimers involving PBX1 were investigated and PREP1 and MEIS1 were established as important PBX1 partners in regulatory networks [25–28].

However, in the past 20 years, PBX1 has been indicated as a pioneer factor. Pioneer factors are special transcription factors that can recognize and bind to their specific target sites in highly condensed chromatin, remodeling it [29, 30]. When pioneer factors bind on DNA, they can open the chromatin, facilitating additional transcription factors binding and activating transcription effectively (Fig. 1) [29, 30]. They are commonly involved in developmental programs and cell fate changes [30]. One of the first indications that PBX1 could act as a pioneer factor was brought by Berkes et al. [31]. While investigating skeletal muscle differentiation and taking myogenin *locus* as a model, they suggested

that Pbx1 would be bound to the myogenin promoter in a constitutive manner, and this association would be necessary for MyoD transcription factor to recognize its binding site in the myogenin promoter and to initiate chromatin remodeling [31]. Possibly, Pbx1 recruitment depends on the presence of the histone variant macroH2A1.2 [32]. These findings were further supported by Maves et al. [33], who showed that other members of the Pbx family — Pbx2 and Pbx4 — were required to induce fast-muscle development in zebrafish. In estrogen receptor-positive breast cancer cells, after identifying specific epigenetic markers, PBX1 binds on DNA and remodels chromatin, making it more accessible and substantially promoting estrogen receptor α transcriptional activity [34, 35].

PBX1 plays critical roles during embryogenesis, organogenesis, development, and differentiation. Loss-of-function studies in mice showed that *Pbx1* is essential since knockout embryos were incompatible with life, reaching embryonic lethality at around 15th or 16th gestational day [36, 37]. The absence of Pbx1 in mice's embryos impaired kidney development due to mesenchymal dysfunction, indicating that Pbx1 may act as a key regulator of renal morphogenesis [37]. The lack of Pbx1 also led to pancreatic hypoplasia and defects in endocrine and exocrine cell differentiation. At the same time, heterozygous adult mice showed abnormalities in pancreatic islet morphology, reduced levels of circulating insulin, and impaired glucose tolerance [36]. In another

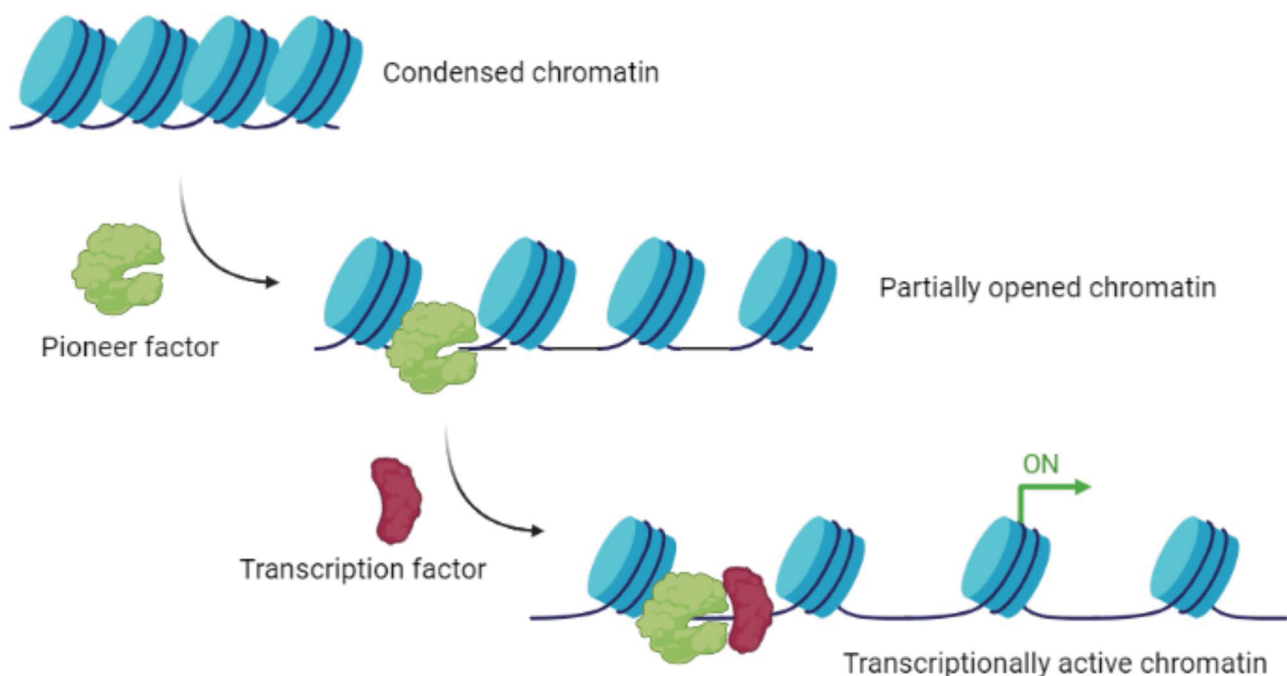


Fig. 1 Pioneer factor activity. Pioneer factors can recognize and bind on specific DNA target sites in highly condensed chromatin, remodeling it and making it more accessible for additional transcription fac-

tors to activate gene transcription. This is a schematic diagram and does not correspond to the actual scale

loss-of-function study, the findings indicate that *Pbx1* is important for urogenital differentiation and adrenal glands organogenesis in a pathway involving the expression of steroidogenic factor-1 [38]. Null mice for *Pbx1* also presented abnormalities in pharyngeal development with phenotypic similarities caused by other mutations in *Hox* genes, suggesting a possible shared pathway [39].

In humans, a considerable number of clinical cases where patients carried potentially pathogenic mutations at *PBX1* locus were reported, indicating crucial roles for PBX1, as exemplified by its involvement in human primary testis-determination [40, 41]. In silico analysis of the variant p.Arg235Gln predicts that this PBX1 missense mutation in the homeodomain might alter the secondary structure of PBX1 [40]. Meanwhile, in vitro cell localization assay revealed that this mutation favors PBX1 location in the cytoplasm, while its wild-type counterpart generally locates in the nucleus [40]. The authors also suggest that this mutation could even impair protein–protein interactions between PBX1 and some of its partners [40], leading to gonadal dysgenesis in 46,XY individuals carrying this mutation. Other pathogenic mutations in *PBX1* locus were also associated with congenital abnormalities of the kidney and urinary tract [41–43], asplenia [41], microsplenia [41], bilateral diaphragmatic eventration [41], pulmonary hypoplasia [41, 44], congenital heart disease or heart malformation [41, 42, 44], dysmorphic features [41–44], cryptorchidism [42, 43], bone malformation [43, 44], sex reversal (another case of 46,XY female) [41], neurological malformation [42], growth retardation [43, 44], global developmental delay [43], and intellectual disability [43, 44]. These finds support a critical and essential role of PBX1 in major developmental programs.

PBX1 and cancer

Upregulation of PBX1 is related to tumorigenesis [45], poor prognosis [35], poor response to induction therapy [46], and resistance to therapy [47]. PBX1 is associated with hematopoietic cancers [48] and solid tumors, such as esophageal [49], renal [50], gastric cancers [51], and neuroblastoma [46].

Cancer is a group of multifactorial diseases. It involves germinative and, mostly, somatic mutations that lead to the activation of oncogenes and the inactivation or downregulation of tumor suppressor genes. The nature of these mutations varies from point to chromosomal changes that might affect both coding and non-coding regions.

Hanahan and Weinberg, with extensive scientific reviews, observed some characteristics shared by almost, if not every type of cancer [52, 53]. They called these characteristics the hallmarks of cancer. The ten hallmarks of cancer are sustaining proliferative signaling, resisting cell death, activating invasion and metastasis, inducing angiogenesis, deregulating

cellular energetics, evading growth suppressors, avoiding immune destruction, tumor-promoting inflammation, genome instability and mutation, and enabling replicative immortality [52, 53]. A particular oncogene or tumor suppressor may be involved in one or more hallmarks. Identifying genes involved in cancer's hallmarks and understanding their roles in tumor development and progression may lead to advances in cancer diagnosis, prognosis, and treatment.

Although several studies associate *PBX1* with specific roles in carcinogenesis, to our knowledge, there are no reviews that organize the effects of *PBX1* as an oncogene into the hallmarks of cancer. This review will help to organize the big picture concerning PBX1 in cancer and encourage future studies linking PBX1 and cancer diagnosis, prognosis, and treatment.

PBX1 and the hallmarks of cancer

Sustaining proliferative signaling

It is not a simple task for a normal cell to enter an active proliferative state. Normal cells need to receive growth-promoting signs that are recognized by cell receptors and processed through plenty of complex signaling pathways that culminate with the regulation of genetic programs responsible for promoting proliferation. From the production of growth signs by the cell itself, by the surroundings, or by an endocrine command, to the final genomic expression inside the nucleus, there are highly controlled biochemical processes to ensure that the cell will only proliferate to maintain homeostasis. On the other hand, successfully transformed cells acquire the ability to sustain proliferation by generating their own growth signals, stimulating normal cells within the stroma to produce and release growth factors, hyperexpressing surface receptors, and proliferating independently of external mitogenic stimuli [53].

From extensive previous studies, we already know that PBX1 acts in proliferation in stem cells and during organogenesis [54–57]. This is a good starting point to make us question whether PBX1 is involved in cancer cell proliferation as well.

PBX1 is upregulated in tumors of patients with high-grade clear cell renal carcinoma (ccRCC) as well as ccRCC cell lines [50]. Further investigation showed that PBX1 is positively related to cell viability, proliferation, and cell cycle progression in ccRCC through JAK2/STAT3 pathway [50]. Through BrdU labeling, Park et al. revealed an association between PBX1 and proliferation in ovarian and breast cancer cells in a Notch3-dependent manner [45]. While studying endocrine therapy (ET) resistance in breast cancer, Magnani et al. confirmed a role for Notch3-PBX1 pathway in the proliferation

of ET-responsive and ET-resistant estrogen receptor-positive breast cancer cells [58]. Prostate cancer cells might increase proliferation rates through the achievement of androgen-independent growth through PBX1-HoxC8 heterocomplex formation [3]. Gastric carcinoma cell lines also presented a significant enhancement in proliferation rates after PBX1 overexpression, as measured by EdU labeling [59].

In gastric cancer cell lines, He et al. showed that PBX1 expression enhanced cell proliferation rates and led to a higher number of colonies [51]. In esophageal squamous cancer cell lines, PBX1 increased cell viability while *PBX1* knockdown decreased cells' ability to form colonies [60]. Furthermore, when injected in nude mice's armpit, cells with *PBX1* silencing generated smaller tumors than non-treated cells [60]. The authors' suggestion that PBX1 acts on proliferation rates might have arisen because it was noticed that PBX1 silencing decreased STAT3 and p-STAT3 levels [60]. However, one must remember that the STAT3 pathway is involved in proliferation and cell survival [61–64]. In addition, PBX1 leads to cell proliferation in leukemia by forming heterodimers with PREP1 and regulating RNF6 [65]. The authors of this study also suggest that some anti-leukemia agents might act suppressing PBX1 expression or disrupting the association between PBX1 and PREP1, thus interfering in RNF6 levels [65].

PBX1 was already associated with estrogen-positive breast cancer cell proliferation [34, 58]. Moreover, expression profiles showed that over 70% of estrogen-induced target genes are PBX1-dependent in MCF7 breast cancer cells [34]. On the other hand, Wang et al. did not observe cell proliferation changes after overexpressing PBX1 in MCF10A mammary cells and MDA-MB-231 breast cancer cells, suggesting that PBX1 alone would not be able to promote tumorigenesis [66]. Nevertheless, MCF10A is a mammary fibrocystic cell line, and MDA-MB-231 is an estrogen-negative breast cancer cell line. Therefore, in mammary tissues, PBX1 might induce proliferation in estrogen receptor-positive breast cancer cells specifically. Through in silico analysis, Ao et al. strengthened this hypothesis, demonstrating that *PBX1* overexpression was associated with estrogen receptor-positive breast cancer and was an indicative of poor prognosis in these patients [67].

We were also interested in the PBX1's targets roles in cancer, since it could lead to an indirect participation of PBX1 in tumor development and progression. Thiaville et al. performed an integrated analysis overlapping PBX1 ChIP-chip target *loci* and PBX1 transcriptome in OVCAR3 ovarian cancer cell line [68]. Thus, the authors were able to identify through in silico analysis the genes in which PBX1 could bind to their promoters and regulate their expression in a carcinogenic phenotype. However, the interactions between PBX1 and the potential gene targets were not experimentally validated yet. Some of these targets, such as

BOLA2 [69], FZD2 [70], and LYPLA1 [71], are associated with cancer cell proliferation, corroborating with a possible role of PBX1 in tumor cell proliferation.

Based on this amount of information, we believe that PBX1 is associated with the sustained proliferative signaling hallmark of cancer. Among the cited articles, many studies were successful in demonstrating that PBX1 is positively associated with cell proliferation in different types of cancer and might act as an oncogene. Yet, we noticed that in some cases, PBX1 could not increase cell proliferation rates by itself, requiring one or more partners. To our knowledge, there was only one study which found that PBX1 might present an inhibitory role in cell proliferation and consequently act as a tumor suppressor. It was found in lung cancer cell lines [72].

Resisting cell death

Tumor growth is not only driven by sustained proliferation. To efficiently expand, cancer cells often acquire the ability to evade cell death. Programmed cell death is a natural barrier against cancer and it is frequently triggered by stress conditions such as hypoxia, irreparable DNA damage, and overexpression of oncogenes, often experienced by tumors [53]. It is common for high-grade and therapy-resistant tumors to present lower apoptotic rates during cancer progression [53].

PBX1 was already associated with cell survival and cell death in non-tumoral circumstances. In hair follicle mesenchymal stem cells, PBX1 expression reduces mitochondrial-mediated apoptosis through AKT/GSK3 β pathway activation [55]. However, *Pbx1* seems to mediate apoptosis in mice's midface morphogenesis [73].

In carcinogenesis, PBX1 behavior regarding apoptosis is also bidirectional. *PBX1* is one of the most overexpressed *loci* in *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinoma, and overexpression of PBX1 in gastric cancer cell lines significantly reduced the apoptosis rate [59]. During the investigation of the role of PBX1 in prostate cancer cell lines, Liu et al. demonstrated that overexpression of PBX1 made the cells more resistant to apoptosis, while PBX1 silencing increased cell death [74]. PBX1 also seems to promote cell death resistance in breast cancer [75]. Zhang et al. used estrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines to understand the role of PBX1 in breast tumor cell apoptosis [75]. After *PBX1* silencing, there was an increase in cell apoptosis, as measured by flow cytometry and supported by the higher levels of Bax and by the decrease in the anti-apoptotic Bcl-2 levels [75]. Yet PBX1 overexpression enhanced apoptosis in acute lymphocytic and promyelocytic leukemia cell lines [76].

Although there are not numerous studies regarding PBX1-mediated cell death or survival, the literature review suggests that PBX1 might have an important oncogenic role

in enhancing solid tumor cell survival. In contrast, in non-solid cancers, PBX1 seems to suppress cancer progression by promoting apoptosis. In addition, several of the PBX1's transcriptional targets identified by Thiaville et al. [68], such as JSD1 [77], SERP1 [78], and TNFRSF19 [79], enhance cell survival in solid cancer.

Activating invasion and metastasis

In most types of cancer, along with tumor progression, some cancer cells that acquired alterations that allow them to move out the primary tumor site eventually arise. Next, they travel through blood or lymphatic vessels to distant tissues to form new colonies. In epithelial cancers, this metastatic process relies on alterations that change the neoplastic cell morphology from an epithelial phenotype to an accumulation of mesenchymal characteristics [53].

One of the hallmarks with more evidence of PBX1 interference is the activating invasion and metastasis capabilities. In gastric carcinoma tissues, PBX1 increased expression was correlated with metastasis [51]. This relation was further confirmed with invasion and migration in vitro and in vivo experiments [51, 59]. Also, PBX1 overexpression was correlated with decreased E-cadherin and increased N-cadherin, vimentin, and Snail levels [51]. Morphologically, gastric cancer cells acquired mesenchymal characteristics with PBX1 overexpression, while cells silenced for *PBX1* presented an epithelial phenotype [51]. Brought together, the results obtained by He et al. strongly suggest that PBX1 takes part in gastric carcinogenesis through the activation of invasion and metastasis via epithelial-mesenchymal transition (EMT) process [51].

In non-small cell lung adenocarcinoma (NSCLC), PBX1 interacts with PREP1, leading to EMT induction [80]. After *PBX1* knockdown in A549 cells, an increased E-cadherin and a decreased vimentin at mRNA and protein levels were observed [80]. PBX1 also exerts a significant role in EMT in esophageal cancer cells through the interaction with FoxC1 in order to activate *ZEB2* expression [49] and consequently repress E-cadherin epithelial marker [81, 82]. However, contrary to the mechanism found by Zhu et al. in esophageal cancer [49], Risolino et al. demonstrated that PREP1-PBX1-mediated EMT does not require transcription activation of any E-cadherin suppressors in lung carcinoma [80]. In NSCLC, PREP1 and PBX1 can induce EMT by enhancing the nuclear accumulation of SMAD3 after TGF- β treatment [80]. In a non-tumorous context, PBX1 controls another SMAD family member, the SMAD4 [83]. Losa et al. studying cleft lip with or without cleft palate, used mice with cephalic epithelium-specific *Pbx* loss to understand the morphogenesis and fusion of murine upper lip and primary palate [83]. The findings suggest that *Pbx1* was associated with higher levels of nuclear Smad4 and Snail1 transcription

to drive the EMT during the midface morphogenesis in mice [83]. On the other hand, in liver carcinoma cells, the MEIS2-PBX1 complex activates the transcription of the E-cadherin locus [84], which could act in an opposite way to contribute to mesenchymal-epithelial transition.

Data from a meta-analysis on breast cancer expression studies was sufficient to make Magnani et al. defend PBX1 expression as a biomarker for metastasis risk in estrogen receptor-positive breast cancers [34]. The same group confirmed this result using a public microarray dataset [58]. In addition, the metastatic effect seems to arise from the NOTCH-PBX1 pathway [58]. Equally important, the amplification of the *PBX1* locus is partly responsible for its overexpression in breast cancer; thus, *PBX1* copy number variation (CNV) was associated with metastatic progression and might become a prognostic biomarker [35]. On the other hand, Wang et al. found no changes in MCF10A and MDA-MB-231 cell lines invasiveness when PBX1 was overexpressed [66]. However, the mammary MCF10A cell is not a cancer cell line, and MDA-MD-231 is an estrogen receptor-negative breast cancer cell. Consequently, the effect of PBX1 in breast cancer invasiveness and metastasis might be dependent on the estrogen receptor status.

Moreover, many PBX1's transcription targets, such as S100A10, RGC32, and ARPC2 [68], are associated with invasiveness, migration, EMT, and metastasis. S100A10 promotes invasion and enhances breast cancer metastasis ability in vivo [85]. In lung cancer, overexpression of RGC32 enhances cell invasion and induces EMT [86]. Treatment of eight different human and mouse cancer cell lines with an ARPC2 inhibitor by Yoon et al. demonstrated that ARPC2 is associated with cell migration and metastasis [87].

Regarding the role of PBX1 in invasion and metastasis, there is enough evidence to strongly suggest that PBX1 contributes to this hallmark of cancer, but in a cancer type-specific manner. Even for the same tissue, the presence or absence of specific biomarkers might affect how PBX1 will act in metastasis, as it was observed for estrogen receptor-positive or -negative breast cancers.

Inducing angiogenesis

During embryogenesis, well-tuned and coordinated processes regulate the growth and assembling of the vasculature. In adult tissues, angiogenesis will only occur transiently, and in a very regulated manner in events such as wound healing and the female reproductive cycle [53]. However, just like normal tissues, tumors also require oxygen and nutrients supply, and they also evacuate carbon dioxide and metabolic wastes. Thus, sooner or later, incipient neoplasias need to develop the ability to promote angiogenesis for the tumor to grow [52].

PBX1 was already implicated in the angiogenic process in a non-tumor context by interacting with Hox factors [22], but few studies looked at tumor cells. In A375 and 397 human melanoma cells, PBX1 interacts with HoxB7, and *PBX1* knockdown decreases pro-angiogenic factors angiopoietin-2 (Ang-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP9) at both mRNA and protein levels [5]. The *PBX1* silencing reduces basic fibroblast growth factor locus (*bFGF*) transcription, although bFGF protein levels remain unchanged [5].

Moreover, several of the PBX1's transcriptional targets suggested by Thiaville et al. [68] are associated with angiogenesis. TM4SF1 has a role in tumor angiogenesis by inducing vascular maturation [88]. S100A10 promotes angiogenesis through the GAS6/AXL pathway in a SRC-dependent manner in ccRCC [89]. However, TSC1 acts preventing angiogenesis, since its suppression by IKK β hyperactivates mTOR and induces angiogenesis [90].

In Shiraishi's et al. findings, PBX1 seems like a promising regulator of angiogenesis during cancer progression [5]. Some of the PBX1's targets engagement in angiogenic process support a possible role for PBX1 itself in this hallmark. However, more studies are needed to corroborate or refute the results obtained by Shiraishi et al. and to understand PBX1's real involvement in tumoral angiogenic signaling pathways [5].

Deregulating cellular energetics

During cancer progression, tumor cells must adapt their energy metabolism to maintain their cell proliferation rates. The most notable change in tumor energetics is the Warburg effect, in which cancer cells often exchange oxidative phosphorylation for aerobic glycolysis, even when there is available oxygen in the microenvironment [53, 91].

There is some evidence indicating that PBX1 is involved with energetic metabolism in both tumorous and non-tumorous situations. As neoplastic cells often mimic stem cell metabolism, it seems reasonable to investigate whether PBX1 regulates energetic metabolism in stem cells, as well as in cancer. While studying human hematopoietic stem cells (HPSC), Kocabas et al. confirmed that HPSCs present higher glycolysis rates than mobilized mononuclear peripheral blood (MPB) cells [92]. Lower levels of oxygen consumption and a higher level of lactate production by HPSC when compared to MPB cells corroborate that HPSCs rely on glycolytic pathways instead of oxidative phosphorylation [92]. Further analysis revealed that this glycolytic metabolism might be due to the upregulation of Hif-1 α by the cooperative interaction between MEIS1, PBX1, and HoxA9 [92].

Wang et al. studied the expression of a set of lipid metabolism (LiMe) genes in breast cancer and the contralateral unaffected breast (CUB) tissues [66]. The research included

the investigation of PBX1's role in lipid metabolism of estrogen receptor-negative breast cancer. Thereby, PBX1 was overexpressed in MDA-MB-231, and it was silenced in MDA-MB-453 estrogen receptor-negative breast cancer cell lines [66]. The overexpression of PBX1's increased the expression of some LiMe genes, while *PBX1* knockdown downregulated some LiMe genes of the set [66].

Some of the PBX1's transcriptional targets indicated by Thiaville et al. [68] are implicated in cellular energetics by promoting aerobic glycolysis, glutamine metabolism, or by altering lipid metabolism. In colorectal cancer, at least two of the PBX1's targets are associated with cellular energetic changes: copines-1 (CPNE1) is upregulated and increases glycolysis through AKT-GLUT1/HK2 pathway [93], and glutamine metabolism is reprogramed by overexpression of the glutamate pyruvate transaminase 2 (GPT2) [94]. In cervical cancer, fatty acid-binding protein 5 (FABP5) upregulation increases intracellular fatty acid levels and activates NF- κ B pathway, leading to lymph node metastasis [95].

PBX1 participation in lipid metabolism changes in breast cancer indicates its involvement in the deregulation of cellular energetics hallmark of cancer. PBX1's targets engagement in cellular metabolism changes support a potential role for PBX1 in this hallmark. However, more evidence linking PBX1 and cancer energetic metabolism would strengthen this proposition.

Evading growth suppressors

To add another layer of complexity in cell growth control, not only proliferative stimuli must be present for a cell to enter an active cell cycle state. Cells must overcome the antiproliferative signal effects that work to promote cellular quiescence and homeostasis [52]. Therefore, the disruption of anti-growth pathways contributes to the evasion of growth suppression.

In lung cancer cells, PBX1 may disrupt cell growth since *PBX1* silencing increased cell proliferation and colony formation [72]. Gene and protein expression measurements suggest that PBX1 might positively regulate p21 and p27 CDK inhibitors [72]. In this scenario, PBX1 acts as a tumor suppressor, thus its loss or downregulation would have a role in cancer progression. PBX1 seems to engage in a trimeric complex with MEIS1 and HOXA10 to activate *p21* transcription and therefore disrupt the myelomonocytic cell cycle [96]. However, PBX1 alone is not sufficient to induce *p21* expression since HOXA1 was the only participant in the trimeric complex that could bind directly to the *p21* promoter and could induce *p21* expression by itself [96]. Moreover, PBX1 expression decreased p21 protein levels in hair follicle mesenchymal stem cells [55], supporting its role as a regulator of *p21* that might act both activating or repressing its expression. Regarding the interaction between

PBX1 and *p27*, to date, no other study that would be able to corroborate or contradict the results found by Li et al. could be found [72].

Although there is some evidence suggesting that PBX1 could have a role in disrupting anti-growth signals, there are not sufficient studies to make us confident to endorse PBX1 as a bona fide participant in this hallmark of cancer.

Avoiding immune destruction

Immune surveillance is responsible for recognizing and eliminating stressed and transformed cells, therefore helping to wipe out nascent tumors and control tumor growth. Thus, tumor progression frequently evolves to evade the immune response [53]. There are many acquired capabilities for an incipient cancer cell to avoid immune destruction. Tumor cell-mediated production of chemokines capable of recruiting regulatory T cells (Tregs) or conversing CD4⁺ T cells into Tregs, production of suppressors cytokines by tumor cells or by the stroma, and impaired antigen presentation are just some examples [97, 98].

PBX1 was not found associated with immune response in a carcinogenic context. Despite that, some studies investigated the participation of PBX1 in the regulation of immune components in different situations. While studying embryonic liver-derived macrophages from *Pbx1*^{-/-} and wild-type mice stimulated with apoptotic cells, Chung et al. discovered that macrophages from *Pbx1* null mice secreted significantly less interleukin 10 (IL-10) than wild-type macrophages [99]. However, when stimulated with lipopolysaccharides (LPS), there were no relevant differences between the two groups, indicating that *Pbx1* might regulate IL-10 production specifically when induced by apoptotic cells [99]. Importantly, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine known to induce immune tolerance through several mechanisms, including by inhibiting and/or controlling other cytokines synthesis, inhibiting the full development of immature dendritic cells, reducing the levels of some CD4⁺ T helper cells and increasing the levels of Tregs [100–102]. In this context, PBX1 may contribute to immune system evasion.

On the other hand, PBX1 was also associated with natural killer (NK) cell development through the regulation of *Nfil3* [103]. NK cells are lymphocytes of the innate immune system and are considered important players in immune surveillance against transformed cells [104, 105]. Apart from being able to kill multiple adjacent cancer cells promptly, NK cells can also enhance adaptative immune response, therefore being essential for controlling tumor progression [104, 105]. The involvement on NK cell development could make PBX1 an important ally in the fight against cancer. In addition to NK cells, PBX1 seems to be important for B and T lineages lymphopoiesis. Still, there is no evidence whether increased levels of PBX1 would somehow alter

the development of lymphoid progenitors [106]. Finally, the PBX1-d, a particular isoform of PBX1, regulates *CD44* expression directly, besides being associated with lupus susceptibility, being involved with the production of autoreactive CD4⁺ T cells and with a reduction of the regulatory T cells pool [107, 108].

Although PBX1 controls *IL10* transcription in specific conditions, it is also responsible for lymphoid lineages development and is related to inflammatory conditions. Since PBX1 was not directly correlated with immune response pathways in cancer yet, we felt encouraged to look at PBX1's targets that are related to immune response during carcinogenesis. One of the PBX1's targets is the *CD46* [68], which codifies a complement system component that negatively regulates innate response and whose overexpression is associated with many types of cancer such as prostate, bladder, and ovarian cancers [109–111].

The absence of information regarding PBX1's relation with immune response specifically during tumorigenesis shows that there are not enough elements to associate PBX1 with escaping the immune destruction hallmark of cancer. In spite of that, PBX1 has transcriptional targets related to immune system, and these axes deserve to be further investigated in cancer studies.

Tumor-promoting inflammation

Tumor microenvironment is often infiltrated with the immune system's diverse components, thereby generating inflammatory conditions. Immune response is an important antitumor mechanism, even though inflammatory processes have a paradoxical effect and contribute to tumor progression in many ways. Inflammation can supply growth and survival factors to the tumor, in addition to pro-angiogenic factors to the microenvironment and signals that induce the activation of epithelial-mesenchymal transition pathways, facilitating metastasis [53].

PBX1 is associated with lupus, a complex autoimmune disease that presents immune activation, autoantibodies, and inflammation processes in multiple tissues [107, 112, 113]. Lu et al. demonstrated through gene expression profiles that a higher expression of *Pbx1*-d, a PBX1 isoform, enhanced not only the innate immune response, but also the inflammatory response [112]. Transgenic expression of *Pbx1*-d in mice increased CD4⁺ T cell's inflammatory functions, besides impairing Foxp3⁺ Tregs homeostasis [113]. *CD44*, a molecule with bidirectional functions in inflammation, is directly regulated by PBX1-d [108]. Although *CD44* is a known marker of inflammation in different contexts [108, 114, 115], it is also associated with inflammation response suppression [116, 117]. Another way for PBX1 to suppress inflammatory responses is through the production of IL-10 by macrophages stimulated by apoptotic cells [99].

No studies specifically investigating PBX1-mediated inflammatory responses in cancer were found. However, we looked at some of the PBX1's targets participation in cancer through the regulation of an inflammatory environment. Among the PBX1's targets found by Thiaville et al. [68], there is the tuberous sclerosis complex 1 (*TSC1*) and the G-protein-coupled receptor 37 (*GPR37*), both related to inflammatory processes.

TSC1 is a tumor suppressor that acts repressing the mTOR pathway and that limits inflammation response. *TSC1* ablation may lead to inflammatory bowel disease and colon cancer [118]. *GPR37* is related with several cancers such as myeloma [119], gastric [120], and lung cancers [121] — although it has controversial roles in cancer progression. In lung adenocarcinoma, upregulation of *GPR37* is associated with increased proliferation rates and improved migration and invasion abilities through the TGF- β /Smad pathway [121]. Although inflammation biomarkers were not evaluated, it is possible that the observed effects of proliferation, invasion, and migration are consequences of inflammation processes, since the TGF- β /Smad pathway enhances inflammatory response [122–124]. However, *GPR37* seems to act as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma (HCC), since low levels of *GPR37* are associated with proliferation, cell survival, and poor prognosis in HCC patients [125]. As *GPR37* might also be critical to the resolution of inflammation [126, 127] and to promote macroautophagy [128], it could have a bidirectional role in cancer.

In summary, there are only a few researches on the PBX1's role in inflammation and no studies regarding PBX1-mediated cancer progression through inflammatory pathways. With the association of PBX1 and inflammatory response in other scenarios, it would be interesting to investigate this transcription factor's role on inflammation in the tumor microenvironment.

Genome instability and mutation

Normal cells have a remarkable set of players that detect DNA damage and repair it, ensuring a low DNA mutation level. However, it is common for tumor cells to have increased mutation rates for several reasons, such as the expression of defective caretakers, the loss of these components, a higher sensibility to mutagens, and a breakdown in the genomic maintenance machinery [53].

PBX1 could engage in this hallmark of cancer by dysregulating essential caretakers' transcription, for example. Some of the PBX1's transcriptional targets found by Thiaville et al. [68] are important players in DNA-repair mechanisms. FOXO3a induces ATM-mediated DNA damage response in breast and prostate carcinoma cells [129]. In an osteosarcoma cell line, hnRNPUL1 associates with NBS1 and is recruited to DNA damage sites with transcription

inhibitors [130]. In consequence, PBX1 deregulation could improve mutation rates.

Possibly, PBX1 could act in a tumor-suppressive manner by improving genome stability through PREP1. PREP1 is a tumor suppressor known as a cofactor that heterodimerizes with PBX1 to regulate gene transcription [27]. Non-tumorous mice cells carrying a hypomorphic mutation on *Prep1* exhibited increased rates of DNA and chromosomal damage, including alterations in DNA methylation [131]. These results were further supported by Palmigiano et al. who demonstrated that HeLa human cancer cells accumulated DNA damage after downregulation of *PREP1* [132]. Since PREP1 often require the complex formation with PBX1, the loss of PBX1 might affect PREP1 activity. However, PBX1's engagement in the maintenance of genomic stability and prevention of DNA damage was not investigated in neither researches.

Although there is evidence suggesting a possible role for PBX1 as a tumor suppressor by promoting genomic stability and preventing mutation, for now, this is only a hypothesis. Therefore, a possible and more direct PBX1's participation in this hallmark should be investigated.

Enabling replicative immortality

Normal cells have a limited number of replications. Once a cell reaches this limit, it enters in a senescence state [52]. To grow a tumor, cancer cells must keep dividing for many generations after this limit point. Due to the higher proliferation rates plus possible mutations in tumor suppressors and/or in genes important for the cell cycle's control, instead of entering in senescence, cancer cells continue to divide for additional generations until they enter in crisis. During crisis, most of the transformed cell population dies, and the genome instability rises until one of the incipient cancer cells acquires the capability to multiply limitlessly [52, 133].

After an extensive search, we could not find any study investigating the role of PBX1 in cancer cells' limitless replicative potential.

Final considerations

Transcription factors that regulate key developmental programs in early embryogenesis are often associated with pathological phenotypes when mutated or dysregulated. PBX1 functions include sex determination [40], morphogenesis [83], and organogenesis [44]. PBX1 is more strongly expressed during fetal development, and mutations or dysregulation has severe and pleiotropic outcomes [42, 44]. Besides congenital disorders, PBX1 is also associated with multifactorial diseases such as Parkinson's disease [134], lupus [107], and many types of cancer [3, 45, 49].

Through this review, we understood that PBX1 contributes to at least five of the ten hallmarks of cancer proposed by Hanahan and Weinberg [53], supporting PBX1's role as a key player in cancer development and progression by acting mostly as an oncogene, but sometimes as a tumor suppressor (Fig. 2). In cancer, PBX1 acts promoting proliferation and cell survival, participates in tumor cell invasiveness and metastasis, induces angiogenesis, and dysregulates cellular energetic metabolism. PBX1's engagement in cancer development and progression may be even greater, since there are not enough studies regarding its involvement in the other hallmarks. Avoiding immune destruction and tumor-promoting inflammation are potential hallmarks in which PBX1 might act, once some of its transcription targets found by Thiaville et al. [68] in ovarian cancer cells were associated with them (Fig. 2) [110, 121].

Interestingly, we found some evidence suggesting a possible role of PBX1 in a tumor-suppressor manner. Although it might seem controversial, once most of the evidence points to an oncogenic role, as a developmental programs' regulator PBX1 regulates numerous *loci* simultaneously. In addition, PBX1 can heterodimerize and engage in regulatory programs with PREP1, a transcription factor which acts mostly as a tumor suppressor [27, 132]. Accordingly, further researches should help us understand the PBX1's participation in each type or subtype of cancer specifically, and to consider the global phenotypic changes caused by an altered *PBX1* expression or pathogenic mutations. Moreover, PBX1 engagement in cancer progression should be investigated not only when *PBX1* is carrying pathogenic mutations or is dysregulated, but also when its heterodimerization with partners such as PREP1 and MEIS1 is compromised.

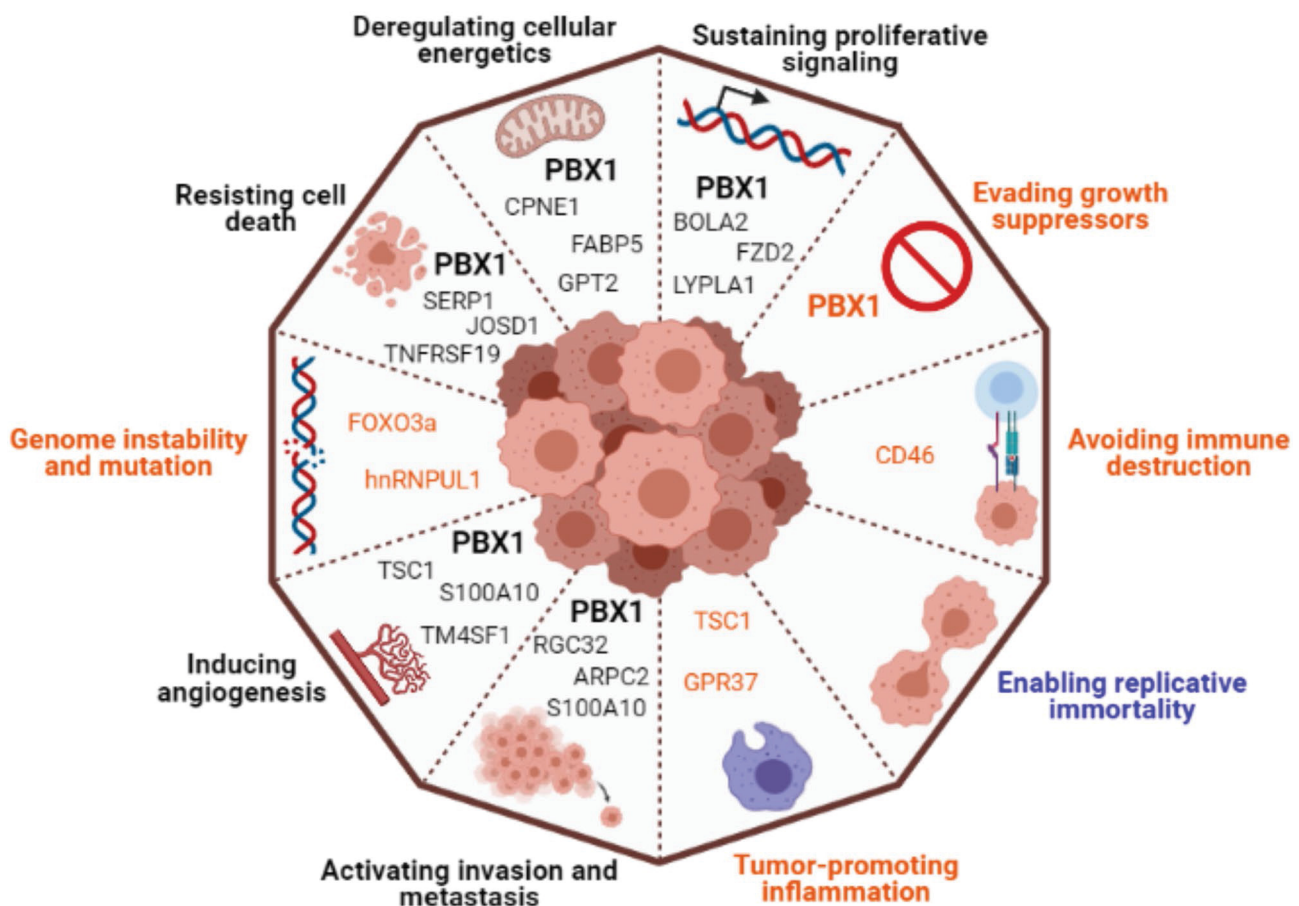


Fig. 2 PBX1 and the hallmarks of cancer. PBX1 and some of its transcriptional targets contribute to cancer development and progression by interfering in at least five of the ten hallmarks of cancer. Outside the decagon, in black, the five hallmarks of cancer affected by PBX1: sustaining proliferative signaling, resisting cell death, inducing angiogenesis, activating invasion and metastasis, and deregulating cellular energetics. In orange, the hallmarks that are potentially affected by PBX1, but which lack sufficient evidence to sustain this hypothesis. In blue, the hallmark with no studies involving PBX1. Inside the

decagon, PBX1 is highlighted in bold when there are studies investigating and supporting its role in that specific hallmark of cancer. The other proteins inside the decagon are codified by the potential targets of PBX1, which are associated with the specific hallmark. These potential targets were found by Thiaville et al. after in silico analysis that overlapped PBX1 ChIP-chip target *loci* and PBX1 transcriptome in an ovarian cancer cell line that overexpresses PBX1 [68]. Please note that these data were not experimentally validated

It is not surprising that PBX1 acts pleiotropically on carcinogenesis. Just like other transcription factors, PBX1 is involved in several cellular signaling pathways. FOXA1, for example, was already associated with tumor cell proliferation [135, 136], cell survival [136], angiogenesis [137, 138], and tumor-promoting inflammation [138]. However, FOXA1 may act in a protective manner by preventing tumor cell invasion and migration and by suppressing metastasis [139–141].

In summary, PBX1 is an active player in many types of cancers, mostly in an oncogenic manner. Although there is enough evidence linking this transcription factor with several of the hallmarks of cancer, PBX1 potentially affects other acquired capabilities that lead to cancer development and progression. We encourage other researchers to raise questions around PBX1's roles and mechanisms that promote tumorigenesis, as it could be a potential target in cancer treatment.

Acknowledgements The authors would like to thank Caetano Krasuski Negrão for the English revision of this work.

Author contribution RNV wrote the article. DFG designed this review. DFG and JCO critically revised the manuscript. RNV, DFG, and JCO reviewed and edited the manuscript.

Funding This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declarations

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D (1990) A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B all. *Cell* 60:547–555. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90658-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90658-2)
- Nourse J, Mellentin JD, Galili N et al (1990) Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 60:535–545. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90657-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90657-Z)
- Kikugawa T, Kinugasa Y, Shiraishi K et al (2006) PLZF Regulates Pbx1 transcription and Pbx1-HoxC8 complex leads to androgen-independent prostate cancer proliferation. *Prostate* 66:1092–1099. <https://doi.org/10.1002/pros.20443>
- Qiu Y, Tomita Y, Zhang B et al (2007) Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 regulates expression of Valosin-containing protein, a gene involved in cancer growth. *Am J Pathol* 170:152–159. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060722>
- Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D et al (2007) Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene* 26:339–348. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209800>
- Kamps MP, Look AT, Baltimore D (1991) The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. *Genes Dev* 5:358–368. <https://doi.org/10.1101/gad.5.3.358>
- Dedera DA, Waller EK, LeBrun DP et al (1993) Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. *Cell* 74:833–843. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90463-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90463-Z)
- Sykes DB, Kamps MP (2004) E2a/Pbx1 induces the rapid proliferation of stem cell factor-dependent murine pro-T cells that cause acute T-lymphoid or myeloid leukemias in mice. *Mol Cell Biol* 24:1256–1269. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.3.1256-1269.2004>
- Bourette RP, Grasset MF, Mouchiroud G (2007) E2a/Pbx1 oncogene inhibits terminal differentiation but not myeloid potential of pro-T cells. *Oncogene* 26:234–247. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209777>
- Smith KS, Jacobs Y, Chang CP, Cleary ML (1997) Chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 induces apoptosis of hematopoietic cells by a p53-independent mechanism that is suppressed by Bcl-2. *Oncogene* 14:2917–2926. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201249>
- Rutherford MN, Bayly GRL, Matthews BP et al (2001) The leukemogenic transcription factor E2a-Pbx1 induces expression of the putative N-myc and p53 target gene NDRG1 in Ba/F3 cells. *Leukemia* 15:362–370. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402059>
- LeBrun DP, Cleary ML (1994) Fusion with E2A alters the transcriptional properties of the homeodomain protein PBX1 in t(1;19) leukemias. *Oncogene* 9:1641–1647
- Lu Q, Wright DD, Kamps MP (1994) Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the t(1;19) translocation. *Mol Cell Biol* 14:3938–3948. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3938>
- Monica K, Galili N, Nourse J et al (1991) PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol Cell Biol* 11:6149–6157. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.12.6149>
- Wagner K, Mincheva A, Korn B et al (2001) Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. *Mech Dev* 103:127–131. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00349-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00349-5)
- Qian YQ, Billeter M, Otting G et al (1989) The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59:573–580. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90040-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90040-8)
- Kissinger CR, Liu B, Martin-Blanco E et al (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63:579–590. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90453-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90453-L)
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M et al (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78:211–223. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90292-5)
- Wright CVE, Cho KWY, Oliver G, De Robertis EM (1989) Vertebrate homeodomain proteins: families of region-specific transcription factors. *Trends Biochem Sci* 14:52–56. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90043-1)
- Piper DE, Batchelor AH, Chang CP et al (1999) Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation.

- Cell 96:587–597. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80662-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80662-5)
21. LaRonde-LeBlanc NA, Wolberger C (2003) Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* 17:2060–2072. <https://doi.org/10.1101/gad.1103303>
 22. Charboneau A, East L, Mulholland N et al (2005) Pbx1 is required for Hox D3-mediated angiogenesis. *Angiogenesis* 8:289–296. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-9016-7>
 23. Moens CB, Selleri L (2006) Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* 291:193–206. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.032>
 24. Morgan R, El-Tanani M, Hunter KD et al (2017) Targeting HOX/PBX dimers in cancer. *Oncotarget* 8:32322–32331. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15971>
 25. Knoepfler PS, Calvo KR, Chen H et al (1997) Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14553–14558. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14553>
 26. Dardaei L, Longobardi E, Blasi F (2014) Prep1 and Meis1 competition for Pbx1 binding regulates protein stability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E896–E905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321200111>
 27. Blasi F, Bruckmann C, Penkov D, Dardaei L (2017) A tale of TALE, PREP1, PBX1, and MEIS1: interconnections and competition in cancer. *BioEssays* 39:1600245. <https://doi.org/10.1002/bies.201600245>
 28. Bruckmann C, Tamburri S, De Lorenzi V et al (2020) Mapping the native interaction surfaces of PREP1 with PBX1 by cross-linking mass-spectrometry and mutagenesis. *Sci Rep* 10:16809. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74032-w>
 29. Jozwik KM, Carroll JS (2012) Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nat Rev Cancer* 12:381–385. <https://doi.org/10.1038/nrc3263>
 30. Grebbin BM, Schulte D (2017) PBX1 as pioneer factor: a case still open. *Front Cell Dev Biol* 5:9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00009>
 31. Berkes CA, Bergstrom DA, Penn BH et al (2004) Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol Cell* 14:465–477. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00260-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00260-6)
 32. Dell’Orso S, Wang AH, Shih HY et al (2016) The histone variant macroH2A1.2 is necessary for the activation of muscle enhancers and recruitment of the transcription factor Pbx1. *Cell Rep* 14:1156–1168. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.103>
 33. Maves L, Waskiewicz AJ, Paul B et al (2007) Pbx homeodomain proteins direct MyoD activity to promote fast-muscle differentiation. *Development* 134:3371–3382. <https://doi.org/10.1242/dev.003905>
 34. Magnani L, Ballantyne EB, Zhang X, Lupien M (2011) PBX1 genomic pioneer function drives ER α signaling underlying progression in breast cancer. *PLoS Genet* 7:e1002368. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002368>
 35. Magnani L, Patten DK, Nguyen VTM et al (2015) The pioneer factor PBX1 is a novel driver of metastatic progression in ER $^{+}$ -positive breast cancer. *Oncotarget* 6:21878–21891. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4243>
 36. Kim SK, Selleri L, Lee JS et al (2002) Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *Ipfl*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet* 30:430–435. <https://doi.org/10.1038/ng860>
 37. Schnabel CA, Godin RE, Cleary ML (2003) Pbx1 regulates nephrogenesis and ureteric branching in the developing kidney. *Dev Biol* 254:262–276. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00038-6)
 38. Schnabel CA, Selleri L, Cleary ML (2003) Pbx1 is essential for adrenal development and urogenital differentiation. *Genesis* 37:123–130. <https://doi.org/10.1002/gene.10235>
 39. Manley NR, Selleri L, Brendolan A et al (2004) Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in Pbx1 knockout mice mimic loss of Hox3 paralogs. *Dev Biol* 276:301–312. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.030>
 40. Eozenou C, Bashamboo A, Bignon-Topalovic J et al (2019) The TALE homeodomain of PBX1 is involved in human primary testis-determination. *Hum Mutat* 40:1071–1076. <https://doi.org/10.1002/humu.23780>
 41. Arts P, Garland J, Byrne AB et al (2020) Paternal mosaicism for a novel PBX1 mutation associated with recurrent perinatal death: phenotypic expansion of the PBX1-related syndrome. *Am J Med Genet Part A* 182:1273–1277. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61541>
 42. Le TP, Breton J, Bidart M et al (2017) PBX1 haploinsufficiency leads to syndromic congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. *J Med Genet* 54:502–510. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104435>
 43. Riedhammer KM, Siegel C, Alhaddad B et al (2017) Identification of a novel heterozygous de novo 7-bp frameshift deletion in PBX1 by whole-exome sequencing causing a multi-organ syndrome including bilateral dysplastic kidneys and hypoplastic clavicles. *Front Pediatr* 5:251. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00251>
 44. Alankarage D, Szot JO, Pachter N et al (2020) Functional characterization of a novel PBX1 de novo missense variant identified in a patient with syndromic congenital heart disease. *Hum Mol Genet* 29:1068–1082. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDZ231>
 45. Park JT, Shih IM, Wang TL (2008) Identification of Pbx1, a potential oncogene, as a Notch3 target gene in ovarian cancer. *Cancer Res* 68:8852–8860. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0517>
 46. Veselska R, Jezova M, Kyr M et al (2019) Comparative analysis of putative prognostic and predictive markers in neuroblastomas: high expression of PBX1 is associated with a poor response to induction therapy. *Front Oncol* 9:1221. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01221>
 47. Jung JG, Shih IM, Park JT et al (2016) Ovarian cancer chemoresistance relies on the stem cell reprogramming factor PBX1. *Cancer Res* 76:6351–6361. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0980>
 48. Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N et al (2009) Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene* 28:4364–4374. <https://doi.org/10.1038/nc.2009.288>
 49. Zhu X, Wei L, Bai Y et al (2017) FoxC1 promotes epithelial-mesenchymal transition through PBX1 dependent transactivation of ZEB2 in esophageal cancer. *Am J Cancer Res* 7:1642–1653
 50. Wei X, Yu L, Li Y (2018) PBX1 promotes the cell proliferation via JAK2/STAT3 signaling in clear cell renal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 500:650–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.127>
 51. He C, Wang Z, Zhang L et al (2017) A hydrophobic residue in the TALE homeodomain of PBX1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of gastric carcinoma. *Oncotarget* 8:46818–46833. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17473>
 52. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
 53. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 54. Lichtenauer UD, Duchniewicz M, Kolanczyk M et al (2007) Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology* 148:693–704. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0681>
 55. Jiang Y, Liu F, Zou F et al (2019) PBX homeobox 1 enhances hair follicle mesenchymal stem cell proliferation and reprogramming through activation of the AKT/glycogen synthase kinase

- signaling pathway and suppression of apoptosis. *Stem Cell Res Ther* 10:268. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1382-y>
56. Liu F, Shi J, Zhang Y et al (2019) NANOG attenuates hair follicle-derived mesenchymal stem cell senescence by upregulating PBX1 and activating AKT signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2019:4286213. <https://doi.org/10.1155/2019/4286213>
 57. Zhou Y, Fu B, Xu X et al (2020) PBX1 expression in uterine natural killer cells drives fetal growth. *Sci Transl Med* 12:eaax1798. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax1798>
 58. Magnani L, Stoeck A, Zhang X et al (2013) Genome-wide reprogramming of the chromatin landscape underlies endocrine therapy resistance in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E1490–E1499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219992110>
 59. Liu J, Wang L, Li J, Xu Y (2021) Upregulation of microRNA-650 by PBX1 is correlated with the development of Helicobacter pylori-associated gastric carcinoma. *Neoplasma* 68:262–272. https://doi.org/10.4149/neo_2020_200806N823
 60. Yu D, Ma Y, Feng C et al (2020) PBX1 increases the radiosensitivity of oesophageal squamous cancer by targeting of STAT3. *Pathol Oncol Res* 26:2161–2168. <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00803-5>
 61. Shibata R, Kai H, Seki Y et al (2003) Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Hum Gene Ther* 14:601–610. <https://doi.org/10.1089/104303403321618128>
 62. Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH (2009) STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells* 27:2383–2392. <https://doi.org/10.1002/stem.185>
 63. Tu B, Du L, Fan QM et al (2012) STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. *Cancer Lett* 325:80–88. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.006>
 64. Guha P, Gardell J, Darpolor J et al (2019) STAT3 inhibition induces Bax-dependent apoptosis in liver tumor myeloid-derived suppressor cells. *Oncogene* 38:533–548. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0449-z>
 65. Xu X, Han K, Tang X et al (2016) The ring finger protein RNF6 induces leukemia cell proliferation as a direct target of pre-B-cell leukemia homeobox 1. *J Biol Chem* 291:9617–9628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701979>
 66. Wang J, Shidfar A, Ivancic D et al (2017) Overexpression of lipid metabolism genes and PBX1 in the contralateral breasts of women with estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* 140:2484–2497. <https://doi.org/10.1002/ijc.30680>
 67. Ao X, Ding W, Ge H et al (2020) PBX1 is a valuable prognostic biomarker for patients with breast cancer. *Exp Ther Med* 20:385–394. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8705>
 68. Thiaville MM, Stoeck A, Chen L et al (2012) Identification of PBX1 target genes in cancer cells by global mapping of PBX1 binding sites. *PLoS One* 7:e36054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036054>
 69. Luo J, Wang D, Zhang S et al (2019) BoLA family member 2 enhances cell proliferation and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma with tumor hemorrhage. *J Cancer* 10:4293–4304. <https://doi.org/10.7150/jca.31829>
 70. Huang L, Luo EL, Xie J et al (2019) Fzd2 regulates cell proliferation and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Biol Sci* 15:2330–2339. <https://doi.org/10.7150/ijbs.33881>
 71. Mohammed A, Zhang C, Zhang S et al (2019) Inhibition of cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer cells through the suppression of LYPLA1. *Oncol Rep* 41:973–980. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6857>
 72. Li W, Huang K, Guo H et al (2014) Inhibition of non-small-cell lung cancer cell proliferation by Pbx1. *Chinese J Cancer Res* 26:573–578. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.08.21>
 73. Ferretti E, Li B, Zewdu R et al (2011) A conserved Pbx-Wnt-p63-Irf6 regulatory module controls face morphogenesis by promoting epithelial apoptosis. *Dev Cell* 21:627–641. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.005>
 74. Liu Y, Xu X, Lin P et al (2019) Inhibition of the deubiquitinase USP9x induces pre-B cell homeobox 1 (PBX1) degradation and thereby stimulates prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem* 294:4572–4582. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006057>
 75. Zhang L, Xu L, Zhang C et al (2017) uc.38 induces breast cancer cell apoptosis via PBX1. *Am J Cancer Res* 7:2438–2451
 76. Wermuth PJ, Buchberg AM (2005) Meis1-mediated apoptosis is caspase dependent and can be suppressed by coexpression of HoxA9 in murine and human cell lines. *Blood* 105:1222–1230. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0802>
 77. Wu X, Luo Q, Zhao P et al (2020) JQD1 inhibits mitochondrial apoptotic signalling to drive acquired chemoresistance in gynaecological cancer by stabilizing MCL1. *Cell Death Differ* 27:55–70. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0339-0>
 78. Ma Q, Wu X, Wu J et al (2017) SERP1 is a novel marker of poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients via anti-apoptosis and regulating SRPB/NF- κ B axis. *Int J Oncol* 51:1104–1114. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4111>
 79. Loftus JC, Dhruv H, Tuncali S et al (2013) TROY (TNFRSF19) promotes glioblastoma survival signaling and therapeutic resistance. *Mol Cancer Res* 11:865–874. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0008>
 80. Risolino M, Mandia N, Iavarone F et al (2014) Transcription factor PREP1 induces EMT and metastasis by controlling the TGF- β -SMAD3 pathway in non-small cell lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3775–E3784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407074111>
 81. Qi S, Song Y, Peng Y et al (2012) ZEB2 mediates multiple pathways regulating cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis in glioma. *PLoS One* 7:e38842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038842>
 82. Wu DM, Zhang T, Liu YB et al (2019) The PAX6-ZEB2 axis promotes metastasis and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis* 10:349. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1591-4>
 83. Losa M, Risolino M, Li B et al (2018) Face morphogenesis is promoted by Pbx-dependent EMT via regulation of snail1 during frontonasal prominence fusion. *Dev* 145:dev157628. <https://doi.org/10.1242/dev.157628>
 84. Bjerke GA, Hyman-Walsh C, Wotton D (2011) Cooperative transcriptional activation by Klf4, Meis2, and Pbx1. *Mol Cell Biol* 31:3723–3733. <https://doi.org/10.1128/mcb.01456-10>
 85. Yanagi H, Watanabe T, Nishimura T et al (2020) Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells. *Cancer Sci* 111:4359–4370. <https://doi.org/10.1111/cas.14659>
 86. Sun Q, Yao X, Ning Y et al (2013) Overexpression of response gene to complement 32 (RGC32) promotes cell invasion and induces epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via the NF- κ B signaling pathway. *Tumor Biol* 34:2995–3002. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0864-2>
 87. Yoon YJ, Han YM, Choi J et al (2019) Benproperine, an ARPC2 inhibitor, suppresses cancer cell migration and tumor metastasis. *Biochem Pharmacol* 163:46–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.017>
 88. Shih SC, Zukauskas A, Li D et al (2009) The L6 protein TM4SF1 is critical for endothelial cell function and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 69:3272–3277. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4886>
 89. Xiao Y, Zhao H, Tian L et al (2019) S100A10 is a critical mediator of GAS6/AXL-induced angiogenesis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 79:5758–5768. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1366>

90. Lee DF, Kuo HP, Te CC et al (2007) IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130:440–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.058>
91. Liberti MV, Locasale JW (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends Biochem Sci* 41:211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
92. Kocabas F, Xie L, Xie J et al (2015) Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. *Cell Biosci* 5:39. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0020-3>
93. Wang Y, Pan S, He X et al (2021) CPNE1 enhances colorectal cancer cell growth, glycolysis, and drug resistance through regulating the AKT-GLUT1/HK2 pathway. *Onco Targets Ther* 14:699–710. <https://doi.org/10.2147/OTT.S284211>
94. Hao Y, Samuels Y, Li Q et al (2016) Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. *Nat Commun* 7:11971. <https://doi.org/10.1038/ncomms11971>
95. Zhang C, Liao Y, Liu P et al (2020) FABP5 promotes lymph node metastasis in cervical cancer by reprogramming fatty acid metabolism. *Theranostics* 10:6561–6580. <https://doi.org/10.7150/thno.44868>
96. Bromleigh VC, Freedman LP (2000) p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev* 14:2581–2586. <https://doi.org/10.1101/gad.817100>
97. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G et al (2015) Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 35:S185–S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
98. Wang M, Zhang C, Song Y et al (2017) Mechanism of immune evasion in breast cancer. *Onco Targets Ther* 10:1561–1573. <https://doi.org/10.2147/OTT.S126424>
99. Chung EY, Liu J, Homma Y et al (2007) Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27:952–964. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.014>
100. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B et al (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209–1220. <https://doi.org/10.1084/jem.174.5.1209>
101. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H et al (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772–4780
102. Heo YJ, Bin JY, Oh HJ et al (2010) IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett* 127:150–156. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.10.006>
103. Xu X, Zhou Y, Fu B et al (2020) PBX1 promotes development of natural killer cells by binding directly to the Nfil3 promoter. *FASEB J* 34:6479–6492. <https://doi.org/10.1096/fj.202000121R>
104. Morvan MG, Lanier LL (2016) NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16:7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
105. Shimasaki N, Jain A, Campana D (2020) NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 19:200–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>
106. Sanyal M, Tung JW, Karsunky H et al (2007) B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene. *Blood* 109:4191–4199. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054213>
107. Cuda CM, Li S, Liang S et al (2012) Pre-B cell leukemia homeobox 1 is associated with lupus susceptibility in mice and humans. *J Immunol* 188:604–614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002362>
108. Niu Y, Sengupta M, Titov AA et al (2017) The PBX1 lupus susceptibility gene regulates CD44 expression. *Mol Immunol* 85:148–154. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.016>
109. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A et al (2006) CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 26:4943–4948
110. Do MH, To PK, Cho YS et al (2018) Targeting CD46 enhances anti-tumoral activity of adenovirus type 5 for bladder cancer. *Int J Mol Sci* 19:2694. <https://doi.org/10.3390/ijms19092694>
111. Su Y, Liu Y, Behrens CR et al (2018) Targeting CD46 for both adenocarcinoma and neuroendocrine prostate cancer. *JCI insight* 3:e121497. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121497>
112. Lu S, Zeumer L, Sorensen H et al (2015) The murine Pbx1-d lupus susceptibility allele accelerates mesenchymal stem cell differentiation and impairs their immunosuppressive function. *J Immunol* 194:43–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401851>
113. Choi S-C, Hutchinson TE, Titov AA et al (2016) The lupus susceptibility gene Pbx1 regulates the balance between follicular helper T cell and regulatory T cell differentiation. *J Immunol* 197:458–469. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502283>
114. Kuwahara G, Hashimoto T, Tsuneki M et al (2017) CD44 promotes inflammation and extracellular matrix production during arteriovenous fistula maturation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37:1147–1156. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309385>
115. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S et al (2017) CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 67:328–338. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.003>
116. Govindaraju P, Todd L, Shetye S et al (2019) CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. *Matrix Biol* 75–76:314–330. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.06.004>
117. Wu PT, Su WR, Li CL et al (2019) Inhibition of cd44 induces apoptosis, inflammation, and matrix metalloproteinase expression in tendinopathy. *J Biol Chem* 294:20177–20184. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009675>
118. Xie Y, Zhao Y, Shi L et al (2020) Gut epithelial TSC1/mTOR controls RIPK3-dependent necroptosis in intestinal inflammation and cancer. *J Clin Invest* 130:2111–2128. <https://doi.org/10.1172/JCI133264>
119. Huang X, Wang Y, Nan X et al (2014) The role of the orphan G protein-coupled receptor 37 (GPR37) in multiple myeloma cells. *Leuk Res* 38:225–235. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.11.007>
120. Wang H, Hu L, Zang M et al (2016) REG4 promotes peritoneal metastasis of gastric cancer through GPR37. *Oncotarget* 7:27874–27888. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8442>
121. Wang J, Xu M, Li DD et al (2021) GPR37 promotes the malignancy of lung adenocarcinoma via TGF- β /Smad pathway. *Open Med* 16:024–032. <https://doi.org/10.1515/med-2021-0011>
122. Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY (2015) TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol* 6:1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00082>
123. Qiu Y, Pan X, Hu Y (2019) Polydatin ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing inflammation and the epithelial mesenchymal transition via inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway. *RSC Adv* 9:8104–8112. <https://doi.org/10.1039/c8ra08659a>
124. Yang Q, Ren GL, Wei B et al (2019) Conditional knockout of TGF- β RII/Smad2 signals protects against acute renal injury by alleviating cell necroptosis, apoptosis and inflammation. *Theranostics* 9:8277–8293. <https://doi.org/10.7150/thno.35686>
125. Liu F, Zhu C, Huang X et al (2014) A low level of GPR37 is associated with human hepatocellular carcinoma progression and poor patient survival. *Pathol Res Pract* 210:885–892. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.07.011>
126. Bang S, Xie YK, Zhang ZJ et al (2018) GPR37 regulates macrophage phagocytosis and resolution of inflammatory pain. *J Clin Invest* 128:3568–3582. <https://doi.org/10.1172/JCI99888>

127. Qu L, Caterina MJ (2018) Accelerating the reversal of inflammatory pain with NPD1 and its receptor GPR37. *J Clin Invest* 128:3246–3249. <https://doi.org/10.1172/JCI122203>
128. Marazziti D, Di Pietro C, Golini E et al (2009) Induction of macroautophagy by overexpression of the Parkinson's disease-associated GPR37 receptor. *FASEB J* 23:1978–1987. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121210>
129. Bin TW, Chung YM, Takahashi Y et al (2008) Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. *Nat Cell Biol* 10:460–467. <https://doi.org/10.1038/ncb1709>
130. Gurunathan G, Yu Z, Coulombe Y et al (2015) Arginine methylation of hnRNPUL1 regulates interaction with NBS1 and recruitment to sites of DNA damage. *Sci Rep* 5:10475. <https://doi.org/10.1038/srep10475>
131. Iotti G, Longobardi E, Masella S et al (2011) Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E314–E322. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105216108>
132. Palmigiano A, Santaniello F, Cerutti A et al (2018) PREP1 tumor suppressor protects the late-replicating DNA by controlling its replication timing and symmetry. *Sci Rep* 8:3198. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21363-4>
133. Hayashi MT, Cesare AJ, Rivera T, Karlseder J (2015) Cell death during crisis is mediated by mitotic telomere deprotection. *Nature* 522:492–496. <https://doi.org/10.1038/nature14513>
134. Villaescusa JC, Li B, Toledo EM et al (2016) A PBX1 transcriptional network controls dopaminergic neuron development and is impaired in Parkinson's disease. *EMBO J* 35:1963–1978. <https://doi.org/10.15252/embj.201593725>
135. Qiu M, Bao W, Wang J et al (2014) FOXA1 promotes tumor cell proliferation through AR involving the notch pathway in endometrial cancer. *BMC Cancer* 14:78. <https://doi.org/10.1201/b17138>
136. Yuan Z, Ye M, Qie J, Ye T (2020) Foxa1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in HCC by directly regulating miR-212-3p/FOXA1/AGR2 signaling pathway. *Onco Targets Ther* 13:5231–5240. <https://doi.org/10.2147/OTT.S252890>
137. Zhang P, Ha M, Li L et al (2020) MicroRNA-3064-5p sponged by MALAT1 suppresses angiogenesis in human hepatocellular carcinoma by targeting the FOXA1/CD24/Src pathway. *FASEB J* 34:66–81. <https://doi.org/10.1096/fj.201901834R>
138. Wang Y, Zhang L, Wei N et al (2021) Silencing LINC00482 inhibits tumor-associated inflammation and angiogenesis through down-regulation of MMP-15 via FOXA1 in bladder cancer. *Aging (Albany NY)* 13:2264–2278. <https://doi.org/10.18632/aging.202247>
139. Song Y, Washington MK, Crawford HC (2010) Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70:2115–2125. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2979>
140. Jin HJ, Zhao JC, Ogden I et al (2013) Androgen receptor-independent function of FoxA1 in prostate cancer metastasis. *Cancer Res* 73:3725–3736. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3468>
141. Liu Y, Huang H, Cao Y et al (2017) Suppression of OGT by microRNA24 reduces FOXA1 stability and prevents breast cancer cells invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 487:755–762. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.135>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

8. CAPÍTULO IV

O último capítulo desta tese destina-se aos resultados obtidos a partir dos ensaios envolvendo o silenciamento e a edição de *PBX1*. Antes da submissão de um artigo científico abordando esses resultados, outros ensaios serão realizados a fim de enriquecer a investigação.

8.1. RESULTADOS

8.1.1. O *PBX1* é eficientemente silenciado a nível de mRNA com siRNA

Após 48 horas das transfecções do siPBX1 nas células de câncer de mama ER+ MCF7 e ZR-75-1, os níveis de mRNA de *PBX1* foram mensurados por RT-qPCR e comparados com as células controles, as quais foram transfectadas com o siRNA NC.

A expressão de *PBX1* foi reduzida em 82,82% ($p < 0,0001$) em MCF7 (Figura 22A), enquanto a redução em ZR-75-1 foi de 77,13% ($p < 0,0001$) (Figura 22B). Esses resultados comprovam a eficiência do siPBX1 e do protocolo de silenciamento utilizado nesse estudo.

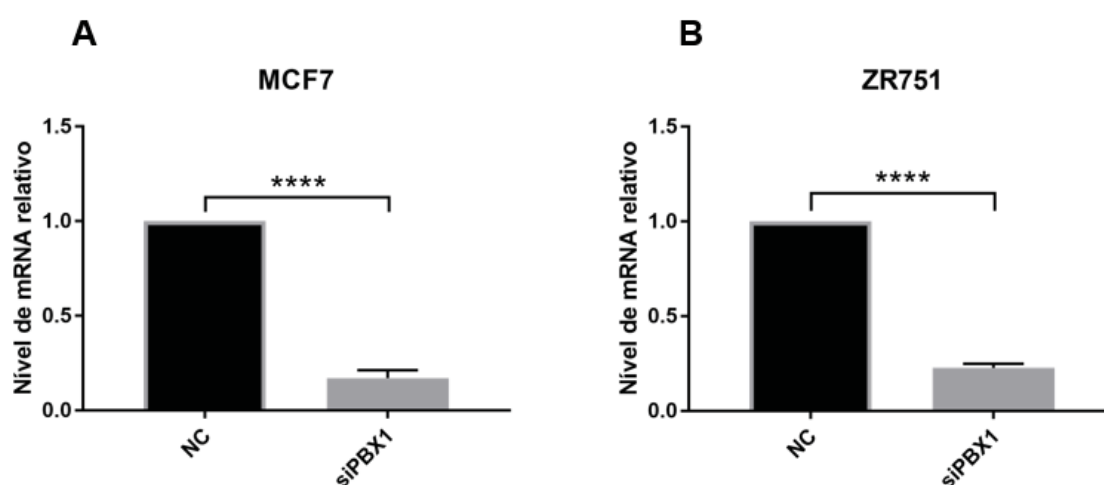


Figura 22: Níveis de expressão relativos de mRNA de *PBX1* após 48h decorrentes da transfecção de siPBX1 e NC. **A:** Dados de expressão referentes às transfecções em MCF7. **B:** Dados de expressão referentes às transfecções em ZR-75-1. Para esse ensaio, foi aplicado o

teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

8.1.2. O *PBX1* é eficientemente silenciado a nível proteico após tratamento com siRNA

Para confirmar que o *PBX1* foi silenciado também em níveis proteicos, foi realizado o *western blotting* (WB) com as proteínas totais extraídas das células ZR-75-1 após 24, 48 e 72 horas de transfecção com NC ou siPBX1. A expressão desse fator de transcrição pioneiro foi reduzida em 54,9% ($p = 0,00473$), 58,22% ($p = 0,00373$) e 58,42% ($p = 0,00748$) após 24, 48 e 72 horas da transfecção, respectivamente (Figuras 23A e 23B). Infelizmente, não foi possível concluir o WB para a linhagem MCF7. Esses resultados mostram que o silenciamento de *PBX1* por meio de transfecção com siRNA reduz a expressão desse gene em níveis proteicos.

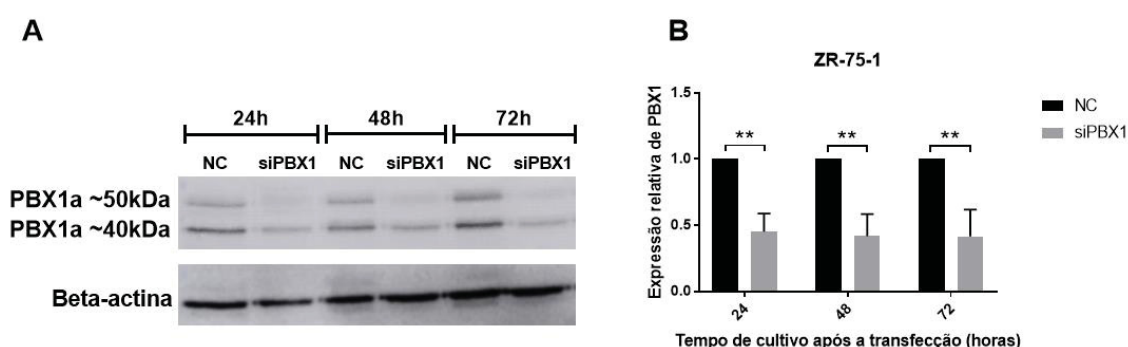


Figura 23: Níveis de expressão relativa de *PBX1* após 24, 48 e 72 horas após a transfecção de siPBX1 e NC. **A:** Exemplo de foto da membrana de WB após revelação. **B:** Dados de expressão referentes às transfecções em ZR-75-1. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

8.1.3. Obtenção de clones potencialmente editados em *PBX1*

No dia seguinte às transfecções dos plasmídeos carregando as sequências dos gRNAs cujo alvo era o gene *PBX1*, era possível visualizar, em microscópio de fluorescência invertido, células MCF7 com fluorescência verde, vermelha, ou de ambas as cores, de modo análogo às transfecções para edição de *EPHA2* (Figura 14). Após a seleção clonal por meio de FACS, eram

obtidos poços em placas de 96 poços com apenas uma célula, a qual apresentava ambas as fluorescências, de modo similar ao obtido para a seleção dos clones potencialmente editados em *EPHA2* (Figura 15). Inicialmente, foram recuperados 15 clones com *PBX1* potencialmente editado, nomeados como PBX1 #1 a PBX1 #15. Todavia, três desses morreram nas primeiras semanas (PBX1 #2, PBX1 #9 e PBX1 #15), restando 12 clones potencialmente editados.

8.1.4. Sequenciamento dos clones PBX1

A estratégia de PCR seguida de eletroforese em gel de agarose (Seção 4.4.1) foi utilizada para a triagem dos clones PBX1 #1 a PBX1 #14 com maior potencial de edição.

Um desses géis, feito para a triagem dos clones PBX1 #1, PBX1 #6 e PBX1 #8 foi revelado em fotodocumentador, e é apresentado na Figura 24. O clone #8 apresentou o padrão de bandas esperado para células não editadas. Sendo assim, foi realizada a purificação e sequenciamento do produto de PCR de 455pb. Por sua vez, os clones PBX1 #1 e PBX1 #6 apresentaram um padrão de bandas condizente com um maior potencial de edição. Apesar de terem aparecido bandas da reação cujo *primer forward* é interno à região-alvo para edição, o tamanho dessas bandas é diferente do esperado para a linhagem não editada (205pb). Além disso, para esses clones, a banda de 455pb aparece dividida em duas bandas, indicando mutações indel distintas para cada cromossomo nas células dos clones PBX1 #1 e PBX1 #6.

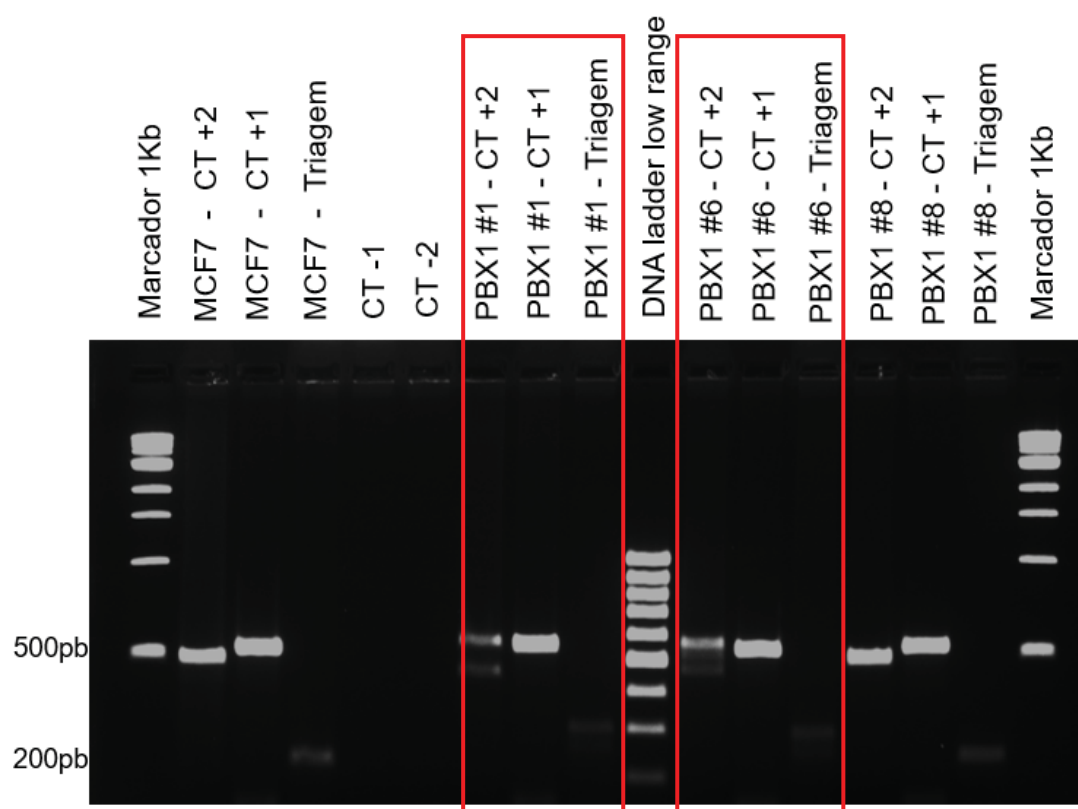


Figura 24: Exemplo de gel de eletroforese para triagem de clones potencialmente editados para o gene *PBX1*. **MCF7**: o DNA utilizado era proveniente de células MCF7 selvagens. **PBX1 #X**: o DNA utilizado era proveniente do clone #X, sendo $1 \leq X \leq 14$. **CT +1**: foram utilizados os *primers* para o fragmento maior de *EPHA2* (505pb), como um controle adicional de reação. **CT +2**: foram utilizados os *primers* para o fragmento maior de *PBX1* (455pb). **Triagem**: foram utilizados os *primers* para o fragmento menor de *PBX1* (205pb). **CT -1**: controle negativo utilizando os *primers* para o fragmento maior de *PBX1*. **CT -2**: controle negativo utilizando os *primers* para o fragmento menor de *PBX1*. Os retângulos em vermelho delimitam as regiões contendo os poços destinados às PCRs dos clones PBX1 #1 e PBX1 #6.

Foram feitos géis como esse para todos os clones obtidos, e as informações estão resumidas no Quadro 8. Os produtos de PCR de 455pb de todos os clones com baixo potencial de edição foram purificados, submetidos à reação de sequenciamento, precipitados e sequenciados. Quase todos estavam com a sequência inalterada. Para os clones PBX1 #1 e PBX1 #6, os fragmentos maiores de PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T e o DNA plasmidial foi extraído e submetido à PCR, purificação, reação de sequenciamento, precipitação e sequenciamento propriamente dito. Apesar de ter apresentado potencial de edição baixo, os resultados de sequenciamento mostravam que o clone PBX1 #4 havia sido editado. Dessa forma, o produto de

PCR de aproximadamente 455pb também foi posteriormente clonado no vetor pTZ57R/T antes de prosseguir com as demais etapas para o sequenciamento.

Quadro 8: Resumo das informações obtidas a partir dos géis de eletroforese, e as estratégias escolhidas para o sequenciamento dos clones PBX1 #1 a PBX1 #14.

Clone	Potencial de edição	Clonagem em pTZ57R/T
PBX1 #1	Alto	Sim
PBX1 #3	Baixo	Não
PBX1 #4	Baixo	Não
PBX1 #5	Baixo	Não
PBX1 #6	Alto	Sim
PBX1 #7	Baixo	Não
PBX1 #8	Baixo	Não
PBX1 #10	Baixo	Não
PBX1 #11	Baixo	Não
PBX1 #12	Baixo	Não
PBX1 #13	Baixo	Não
PBX1 #14	Baixo	Não

O Quadro 9 resume os efeitos da edição nos três clones cujas sequências de DNA foram alteradas. Como o clone PBX1 #1 foi selecionado para os ensaios funcionais, as edições nas sequências dos cromossomos homólogos, bem com as alterações na sequência peptídica podem ser visualizadas com mais detalhes na Figura 25.

Quadro 9: Efeitos das edições nas sequências de DNA dos clones EPHA2 editados.

Clone	Cromossomo	Tipo de mutação	Região	Posição	Efeito
PBX1 #1	Homólogo 1	Adição - 63pb	Éxon 3	Entre Chrom. 1: 164792572 e 164792573	Frameshift a partir da posição 115 da proteína, e stop codon prematuro na posição 127
	Homólogo 2	Substituição - 4pb Deleção - 35pb	Éxon3	Substituições Chrom. 1: 164792554, 164792556, 164792592 e 164792596 Deleção Chrom. 1: 164792557-164792591	Frameshift a partir da posição 109 da proteína, e stop códon prematuro na posição 186
	Homólogo 1	Substituição - 2pb Deleção - 19pb	Éxon 3	Substituição Chrom. 1: 164792529 e 164792532 Deleção Chrom. 1: 164792555-164792573	Substituição de 2 aminoácidos nas posições 101 e 102, frameshift a partir da posição 109 da proteína, e stop códon prematuro na posição 173
	Homólogo 2	Substituição - 3pb Deleção - 12pb	Éxon 3	Substituição Chrom. 1: 164792560, 164792605 e 164792612 Deleção Chrom. 1: 164792541 e 164792573	Deleção de 4 aminoácidos nas posições 105 a 108, substituição de 1 aminoácido na posição 111 da proteína, e stop codon prematuro na posição 126
PBX1 #6	Homólogo 3	Deleção - 12pb	Éxon 3	Chrom. 1: 164792541 e 164792552	Deleção de 4 aminoácidos nas posições 105 a 108 da proteína
	Homólogo 1	Adição - 4pb	Éxon 3	Entre Chrom. 1: 164792570-164792571	Frameshift a partir da posição 115 e stop codon prematuro na posição 122
	Homólogo 2	Adição - 52pb	Éxon 3	Entre Chrom. 1: 164792581-164792582	Frameshift a partir da posição 119 e stop codon prematuro na posição 132
	Homólogo 3	Deleção - 33pb	Éxon 3	Chrom. 1: 164792533-164792565	Deleção de 11 aminoácidos nas posições 102 a 112 da proteína

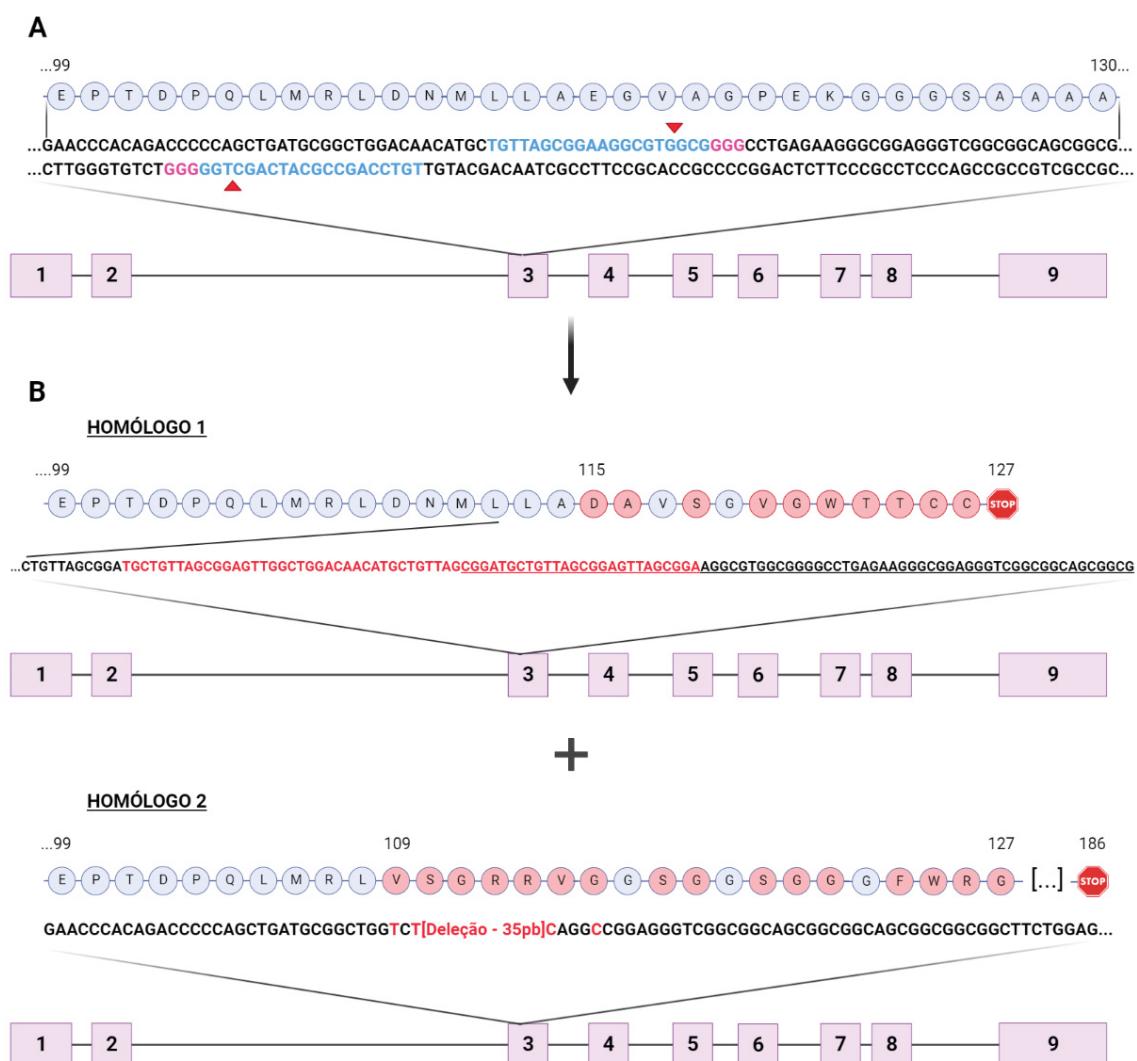


Figura 25: Edição gênica e alteração peptídica no clone PBX1 #1. **A:** sequência gênica e peptídica da célula antes da edição. A edição foi realizada no éxon 3 do gene *PBX1*. Ambas as sequências de DNA da fita codificante (em cima) e da fita complementar (embaixo) estão representadas. Em azul, está a sequência alvo do gRNA, e em rosa a sequência PAM. Os triângulos vermelhos indicam os sítios de corte unifilamentar da Cas9 *nickase*. Acima da sequência está a região correspondente da sequência peptídica após a tradução do mRNA, sendo que o PBX1 possui, ao todo, 430 aminoácidos. **B:** edição alcançada nos dois cromossomos homólogos na célula MCF7. Nessas imagens, apenas a sequência da fita codificante foi apresentada. Todas as alterações nas sequências de DNA e peptídica estão sinalizadas em vermelho. No cromossomo homólogo 1, houve uma inserção de 63 nucleotídeos, gerando um *frameshift* a partir da posição 115 na proteína e um stop códon prematuro na posição 127. A região da sequência que está sublinhada não é traduzida. No cromossomo homólogo 2, houve quatro substituições e uma deleção de 35 nucleotídeos, gerando um *frameshift* a partir da posição 109 na proteína e um stop códon prematuro na posição 186.

8.1.5. PBX1 aumenta a viabilidade de células MCF7, mas não de ZR-75-1

O PBX1 já foi associado com um aumento da viabilidade celular em câncer renal (WEI *et al.*, 2018) e de esôfago (YU *et al.*, 2020). Apesar de Magnani *et al.* (2011) e Magnani *et al.* (2015) terem sugerido que o PBX1 está positivamente associado com a proliferação em células de carcinoma mamário, o ensaio utilizado nesses estudos foi o WST-1; logo, seria mais correto inferir que o PBX1 está associado com a viabilidade celular. Todavia, nesses estudos as células foram cultivadas sob suplementação com estrogênio (MAGNANI *et al.*, 2011) ou fator de crescimento epidermal (MAGNANI *et al.*, 2015). Ainda, em nenhum desses trabalhos a viabilidade foi verificada em células ZR-75-1. Desse modo, primeiramente a viabilidade foi avaliada pelo método da resazurina após 24, 48, 72, 96 e 120 horas decorridas da transfecção do siPBX1 e do NC em MCF7 e ZR-75-1, sem nenhuma suplementação além do FBS (Figura 26). Em MCF7, o silenciamento de *PBX1* causou uma redução na viabilidade celular em 11,27% ($p = 0,01735$), 11,57% ($p = 0,0419$), 16,15% ($p = 0,04291$) e 8,31% ($p = 0,04723$) após 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo celular. Por sua vez, não houve diferença significativa na viabilidade celular de ZR-75-1 em nenhum dos pontos avaliados. Esses resultados sugerem que o PBX1 aumenta a viabilidade de células de câncer de mama MCF7, mas não de ZR-75-1.

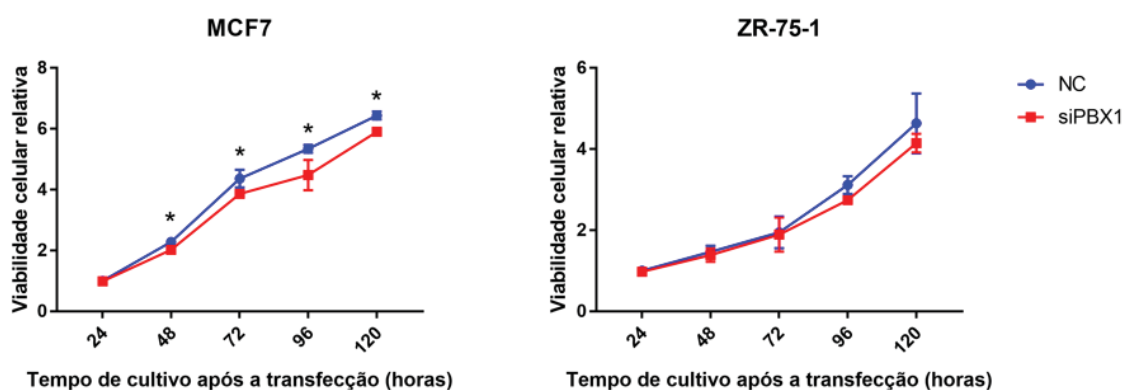


Figura 26: Viabilidade celular relativa após silenciamento do gene *PBX1* nas células MCF7 e ZR-75-1 em diferentes tempos de cultivo. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foi adotado o valor de significância: * $p \leq 0,05$.

A viabilidade celular também foi avaliada nas células PBX1 #1 após 24, 48, 72, 96 e 120 horas decorridas do plaqueamento e são apresentadas como viabilidade celular relativa ao controle (MCF7 wt) no tempo de 24 horas (Figura 27). Não foi encontrada diferença significativa entre as viabilidades celulares das células editadas e não-editadas. Contudo, é possível notar grandes desvios na maioria dos pontos.

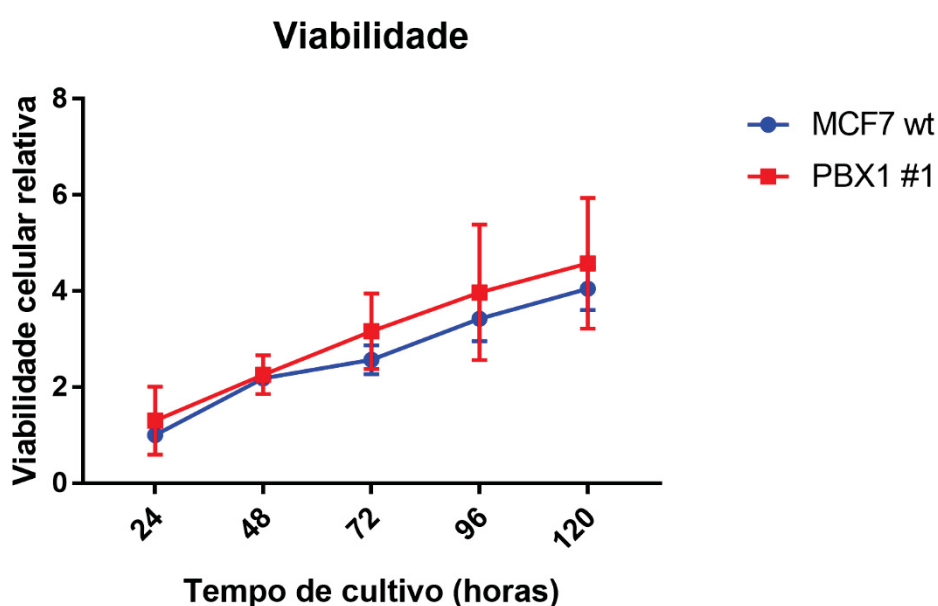


Figura 27: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene *PBX1* e das células MCF7 selvagens em diferentes tempos de cultivo. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foi adotado o valor de significância: * $p \leq 0,05$.

Era esperado que o resultado do ensaio de viabilidade com as células PBX1 #1 validassem os resultados encontrados para o silenciamento de *PBX1* em MCF7, uma vez que ambas as células editadas e silenciadas são provenientes da mesma linhagem celular. Entretanto, observa-se uma alta variabilidade entre as replicatas independentes nos experimentos com as células editadas, sendo interessante aumentar o número de replicatas biológicas para reduzir possíveis interferentes.

8.1.6. PBX1 não altera a proliferação em câncer de mama subtipo luminal A

O PBX1 já foi associado com o aumento da proliferação em diversos cânceres, como câncer renal (WEI *et al.*, 2018), de ovário (PARK *et al.*, 2008) e de mama (PARK *et al.*, 2008). Todavia, o efeito proliferativo de PBX1 não foi avaliado em ZR-75-1. Assim, a proliferação celular foi avaliada após o silenciamento de *PBX1* em células MCF7 e ZR-75-1, bem como após a edição do gene *PBX1* em MCF7.

Em relação ao silenciamento de *PBX1*, não foi observada alteração na proliferação de ambas as linhagens MCF7 e ZR-75-1 (Figura 28).

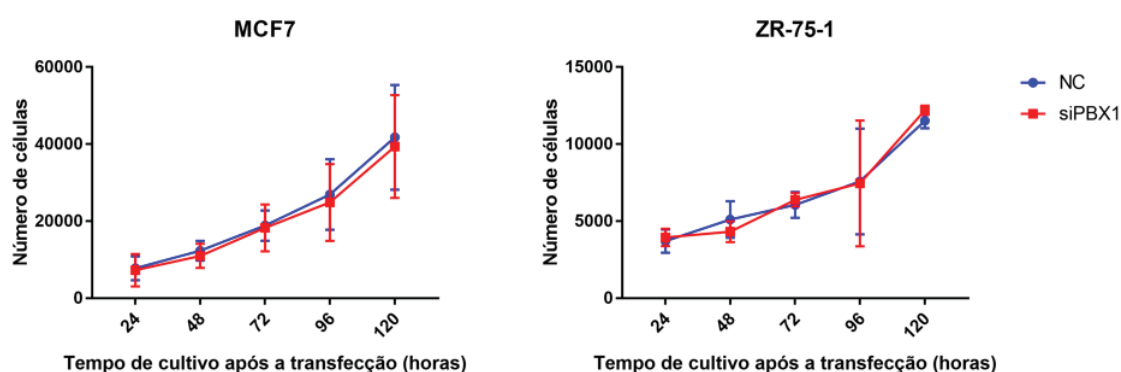


Figura 28: Proliferação celular mensurada a partir do método colorimétrico com cristal violeta, comparando o número de células MCF7 (à esquerda) e ZR-75-1 (à direita) tratadas com siPBX1 ou NC em diferentes tempos de cultivo. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de Student não pareado. Foi adotado o valor de significância: * $p \leq 0,05$.

Quanto à edição de *PBX1*, também não foi observado diferença significativa na proliferação das células PBX1 #1 e das células selvagens (Figura 29). Em conjunto, esses dados sugerem que o PBX1 não altera a proliferação celular em células de câncer de mama ER+.

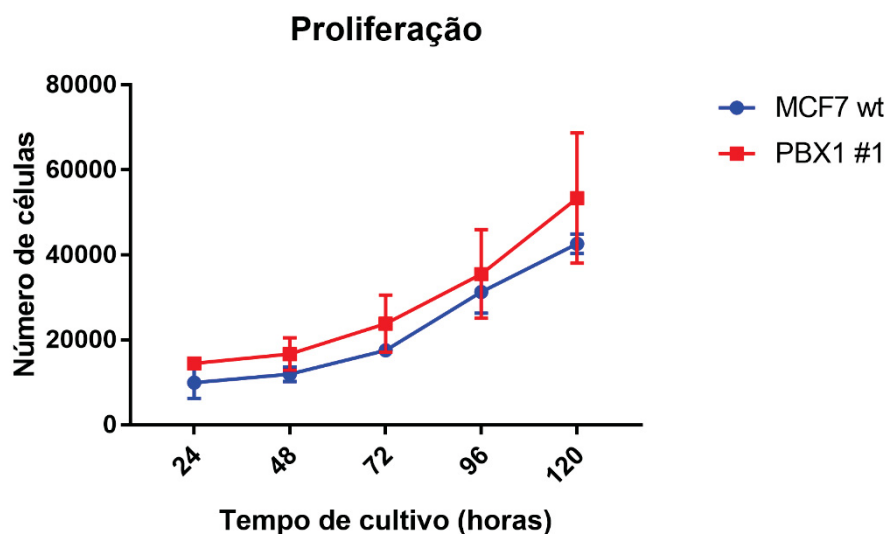


Figura 29: Proliferação celular comparando o número de células PBX1 #1 e de células MCF7 wt em diferentes tempos de cultivo. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$.

8.1.7. PBX1 aumenta a capacidade clonogênica em células MCF7

O PBX1 promove processos de transição epitélio-mesenquimal e metástase em câncer gástrico, de esôfago e de pulmão (revisado por VEIGA *et al.*, 2021). Todavia, em câncer hepático, PBX1 parece promover a transição mesenquimal-epitelial (BJERKE *et al.*, 2011), a qual também é uma etapa importante para que as células tumorais consigam colonizar tecidos secundários durante o evento metastático. A partir de análises *in silico* e de expressão em pacientes com câncer de mama ER+, Magnani *et al.* (2011) e Magnani *et al.* (2015) sugerem que o PBX1 é um biomarcador para o risco de metástase. Todavia, não há estudos que validem esses resultados por meio de ensaios funcionais.

Uma vez que o ensaio de capacidade clonogênica mede o potencial das células conseguirem crescer e formar colônias sem uma eficiente comunicação intercelular, ele também pode sugerir um potencial metastático. Dessa forma, esse ensaio foi utilizado para avaliar a capacidade das células silenciadas para *PBX1* formarem colônias, em comparação com o controle. Ainda, as células PBX1 #1 também tiveram sua clonogenicidade avaliada, em comparação com as células selvagens.

O silenciamento de *PBX1* levou a uma redução significativa de 12,84% ($p = 0,0124$) na capacidade clonogênica de MCF7 (Figura 30A e 30B), mas não teve impacto em ZR-75-1 (Figura 30C).

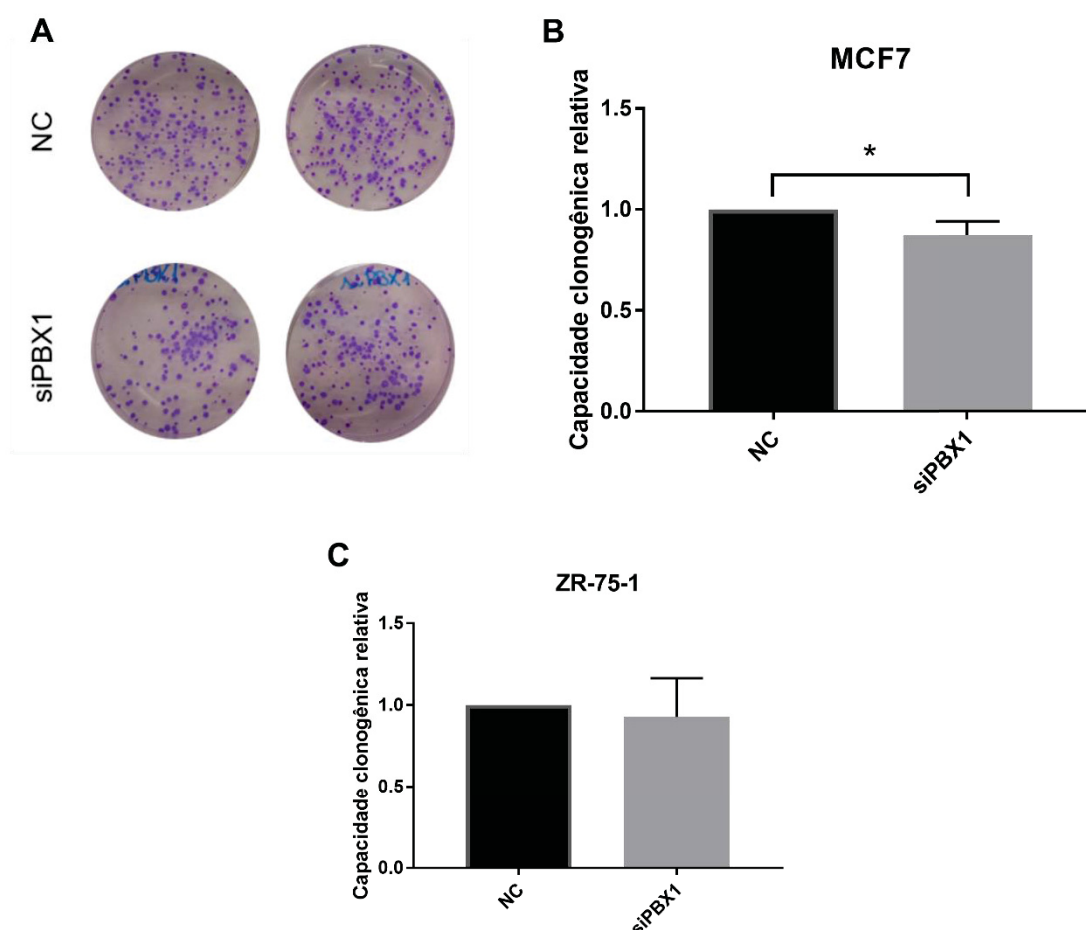


Figura 30: Capacidade clonogênica após o silenciamento de *PBX1*. **A**: Fotografias de alguns poços dos ensaios de capacidade clonogênica em MCF7. Na região superior da figura, poços contendo células de MCF7 transfectadas com o NC. Na região inferior, poços com as células transfectadas com siPBX1. Ambas as células foram coradas após 15 dias de cultivo. **B**: Capacidade clonogênica relativa após 15 dias de cultivo de células MCF7 tratadas com NC ou siPBX1. **C**: Capacidade clonogênica relativa após 15 dias de cultivo de células ZR-75-1 tratadas com NC ou siPBX1. Para esses ensaios, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado e foi adotado o valor de significância * $p \leq 0,05$.

Para validar os dados obtidos em células MCF7, a capacidade de formação de colônias foi avaliada nas células editadas PBX1 #1, as quais

apresentaram uma capacidade 20,90% menor ($p = 0,0008$) do que as células selvagens (Figura 31).

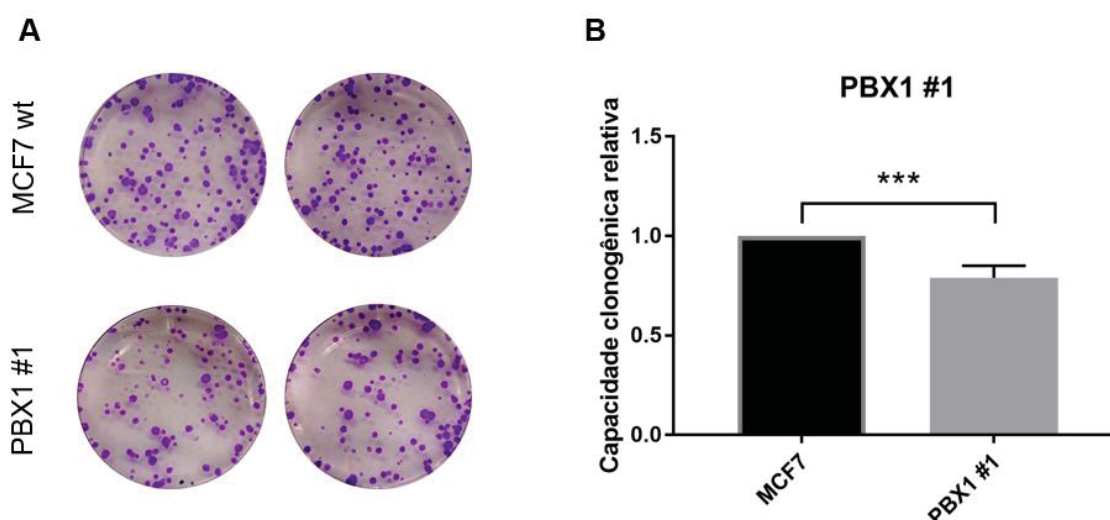


Figura 31: Comparação da capacidade clonogênica das células PBX1 #1 e das células não-editadas. **A:** Fotografias de alguns poços dos ensaios de capacidade de formação de colônias. Na região superior da figura, poços contendo células de MCF7 wt. Na região inferior, poços com as células editadas. Ambas foram coradas após os 15 dias de cultivo. **B:** capacidade clonogênica relativa após 15 dias de cultivo de células PBX1 #1 e de células MCF7 wt. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

Esses resultados sugerem que o PBX1 aumenta a capacidade clonogênica em células de carcinoma mamário MCF7, mas não em ZR-75-1.

8.1.8. PBX1 aumenta a resistência ao tamoxifeno

O estudo de Oliveira (2008) indica que o PBX1 pode ser um bom candidato a modulador da resposta à terapia com tamoxifeno em câncer de mama luminal. Entretanto, não há evidências na literatura que suportem esses resultados obtidos por Oliveira (2008). Dessa forma, a sensibilidade ao tamoxifeno das células ZR-75-1 foi avaliada após o silenciamento de *PBX1*, ao passo que essa sensibilidade também foi investigada em MCF7 após o silenciamento e após a edição de *PBX1*.

Em MCF7, o silenciamento de *PBX1* não alterou significativamente a sensibilidade das células ao tamoxifeno (Figuras 32A e 32B). Por sua vez, em ZR-75-1, após 72 horas de tratamento, as células silenciadas apresentaram viabilidade reduzida em 9,93% ($p = 0,00236$) em relação às células transfectadas com NC na concentração de $2,5\mu\text{M}$ (Figura 32C). Nas demais concentrações não houve diferença significativa. Entretanto, como as células também apresentaram viabilidade reduzida (em 11,65%, $p = 0,00008$) para o controle negativo com DMSO, no qual há ausência de tamoxifeno, não é possível inferir que a diferença observada com a concentração de $2,5\mu\text{M}$ seja em decorrência à exposição do tamoxifeno. Para o tratamento de 96 horas, a diferença na viabilidade celular se manteve significativa apenas para a concentração de $2,5\mu\text{M}$ ($p = 0,01279$) (Figura 32D). Contudo, a falta de significância na concentração de $5\mu\text{M}$ – a qual não gerou uma queda importante na viabilidade celular –, somada aos resultados das replicatas biológicas dos tratamentos de 72 horas sugerem que o *PBX1* não está modulando a resposta ao tamoxifeno.

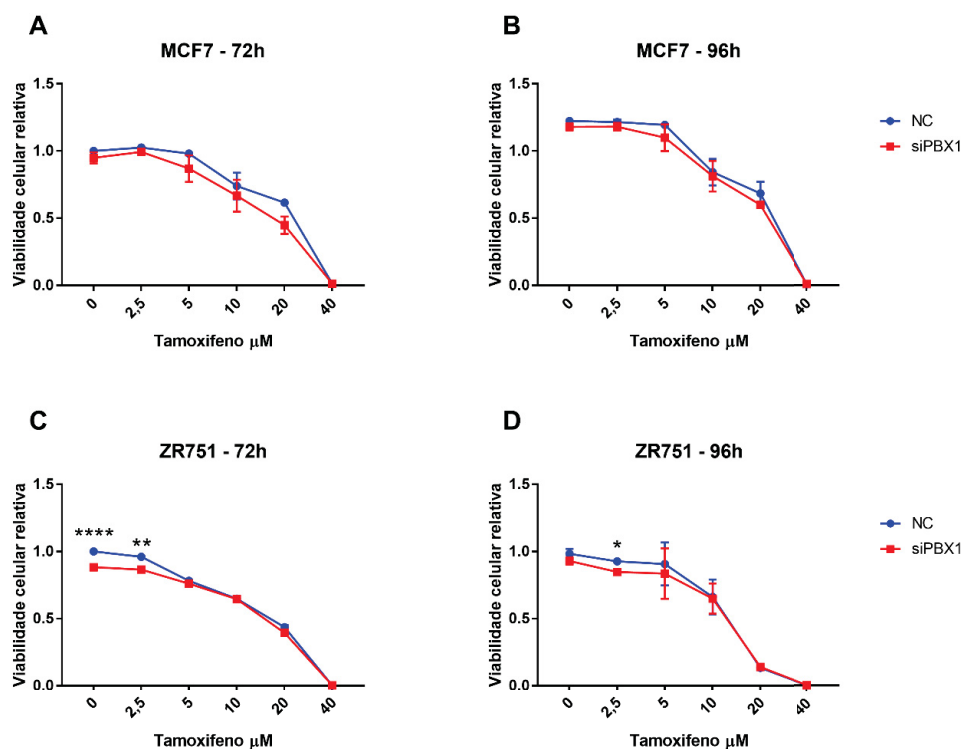


Figura 32: Viabilidade celular relativa das células transfectadas com NC ou siPBX1 e tratadas com diferentes concentrações de tamoxifeno. Viabilidade em MCF7 após 72 (A) e 96 horas (B)

de tratamento. Viabilidade em ZR-75-1 após 72 (C) e 96 horas (D) de tratamento. O tratamento foi aplicado 24 horas após a transfecção. Para esses ensaios, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Em relação às células editadas, houve uma redução de viabilidade das células PBX1 #1 em 16,17% ($p = 0,00002$), 20,11% ($p = 0,00016$) e 24,34% ($p = 0,00001$) em relação às células selvagens nas concentrações de 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente, após 72 horas de tratamento (Figura 33). Possivelmente, as concentrações de 20 μ M e 40 μ M são altas o suficiente para ultrapassar a resistência adquirida e reduzir a viabilidade de ambas as células sem diferença significativa (Figura 33). Entretanto, as células editadas também apresentaram uma queda na viabilidade em 10,29% ($p = 0,00142$) quando comparadas à MCF7 wt no controle negativo, onde apenas DMSO era adicionado como tratamento (Figura 33). Para um tratamento um pouco mais prolongado, de 96 horas, a diferença na viabilidade celular se manteve significativa nas concentrações de 5 μ M ($p = 0,02999$) e 10 μ M ($p = 0,00646$).

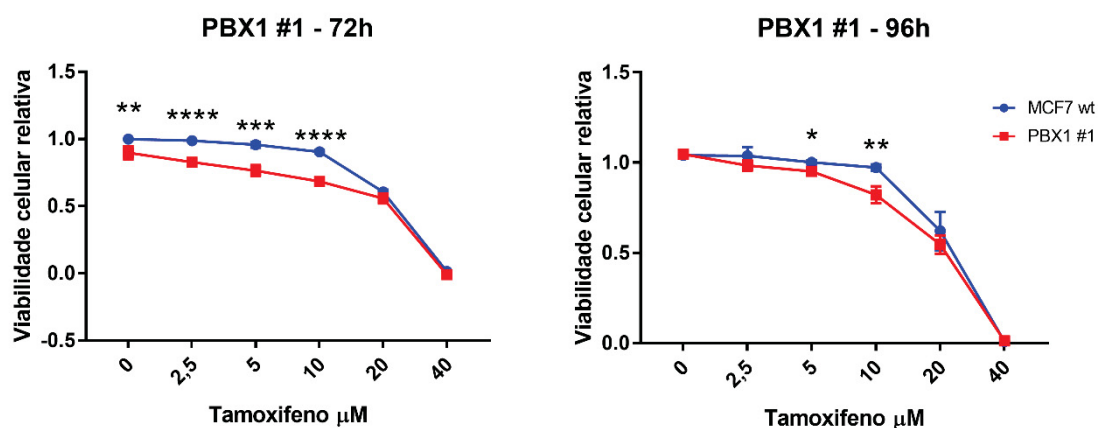


Figura 33: Viabilidade celular relativa das células editadas no gene *PBX1* e das células MCF7 wt em 72 e 96 horas de tratamento com diferentes concentrações de tamoxifeno. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Apesar dos resultados mostrarem diferença significativa na viabilidade relativa para o tratamento controle (DMSO) em 72 horas, o alto nível de significância observado nas concentrações de 2,5µM a 10µM, somados à constância da significância nas concentrações de 5µM e 10µM após 96 horas de tratamento sugerem que o PBX1 aumenta a resistência ao tamoxifeno em MCF7.

A aparente controvérsia entre os resultados observados nos experimentos de silenciamento e de edição de *PBX1* em MCF7 podem ser decorrentes da atuação do PBX1 residual em células MCF7 silenciadas, uma vez que as células silenciadas mantiveram aproximadamente 20% dos níveis de mRNA de *PBX1* (Figura 22A). Sendo assim, seria interessante aplicar a tecnologia CRISPR/Cas9 também em ZR-75-1.

Os resultados obtidos com o ensaio de viabilidade celular na presença de tamoxifeno sugerem que PBX1 pode ser um importante modulador da resposta à essa terapia-alvo, atuando de modo a aumentar a resistência de células tumorais à medicação.

8.1.9. Expressão de genes potencialmente regulados por PBX1

A expressão de alguns genes potencialmente regulados por PBX1, direta ou indiretamente, também foi investigada após 48 horas da transfecção, nos ensaios de silenciamento de *PBX1*, e em células com esse gene editado.

Na revisão de Veiga *et al.* (2021), foi levantada a hipótese de que PBX1 poderia estar atuando em células tumorais na evasão do sistema imune e na promoção de processos inflamatórios. Uma vez que já foi encontrada uma correlação positiva entre PBX1-d, uma isoforma de PBX1 associada ao lupus, e a expressão de CD44 em um contexto não carcinogênico (NIU *et al.*, 2017), verificou-se se uma relação similar se repetia em células tumorais mamárias.

Em células ZR-75-1, o silenciamento de *PBX1* levou a uma redução significativa de 24,59% ($p < 0,0001$) na expressão de *CD44*, corroborando com os dados encontrados por Niu *et al.* (2017) (Figura 34A). Em MCF7, apesar do

silenciamento não ter alterado a expressão de CD44 (Figura 34B), a edição de *PBX1* reduziu em 68,35% ($p = 0,0004$) (Figura 34C). É possível que, em MCF7, a proteína PBX1 seja mais estável do que em ZR-75-1. Desse modo, apesar do silenciamento reduzir significativamente a expressão do mRNA de *PBX1* (Figura 22A), a proteína ainda estaria suficientemente presente nas células silenciadas, o que explicaria os resultados contraditórios entre silenciamento e edição de *PBX1* em MCF7. Ainda, é possível notar que há uma grande variabilidade da expressão de *CD44* em MCF7 com *PBX1* silenciado, o que poderia indicar algum problema durante o ensaio.

Em conjunto, esses resultados sugerem que PBX1 participa positivamente da regulação de *CD44* em câncer de mama.

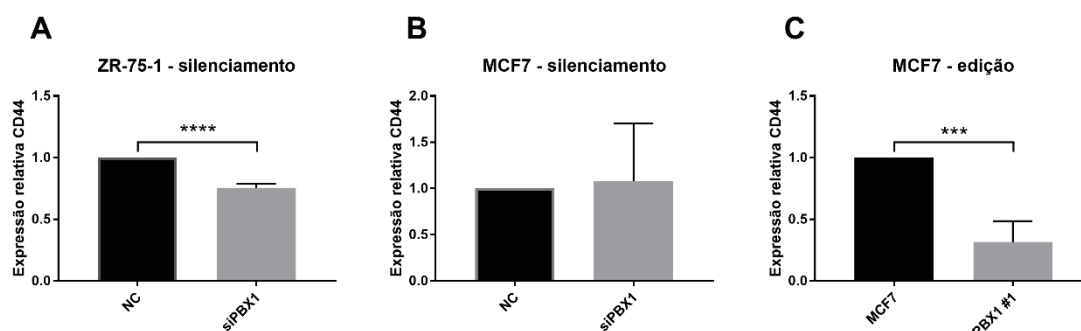


Figura 34: Expressão relativa de *CD44* em células com *PBX1* silenciado ou editado. **A:** silenciamento em ZR-75-1. **B:** silenciamento em MCF7. **C:** edição em MCF7. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Ainda seguindo a hipótese de que PBX1 influenciaria na evasão do sistema imune e na promoção de inflamação em um contexto carcinogênico, a expressão de *CD46* também foi avaliada. O CD46 é um componente do sistema complemento que regula negativamente a resposta imune inata, e sua super expressão já foi associada com alguns tipos de câncer (revisado por Veiga *et al.* 2021). Além disso, o gene *CD46* é um alvo transcricional predito de PBX1 (LACHMANN *et al.*, 2010; THIAVILLE *et al.*, 2012; ROUILLARD *et al.*, 2016). O silenciamento de *PBX1* em ZR-75-1 resultou em uma queda de

39,04% ($p < 0,0001$) na expressão de *CD46* (Figura 35A). No entanto, *PBX1* não causou alteração significativa em MCF7 (Figuras 35B e 35C).

Esses resultados sugerem que o silenciamento de *PBX1* está associado à redução da expressão de *CD46* em ZR-75-1, mas não em MCF7.

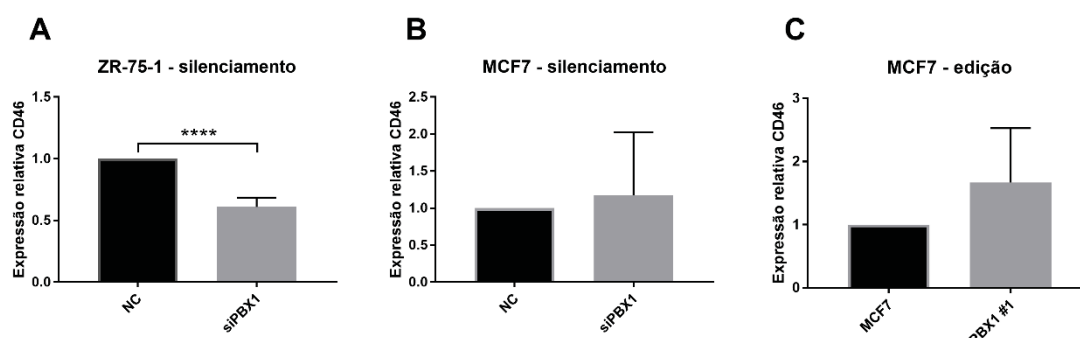


Figura 35: Expressão relativa de *CD46* em células com *PBX1* silenciado ou editado. **A:** silenciamento em ZR-75-1. **B:** silenciamento em MCF7. **C:** edição em MCF7. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

A expressão de *CDKN1A* também foi investigada. Esse gene codifica a proteína p21, que é um inibidor de ciclinas e exerce papel fundamental no controle do ciclo celular (WEINBERG, 2014). *CDKN1A* é um alvo transcricional de *PBX1* (LACHMANN *et al.*, 2010; ROUILLARD *et al.*, 2016), e essa possível interação já foi sugerida em linfoma (BROMLEIGH & FREEDMAN, 2000), câncer de ovário (THIAVILLE *et al.*, 2012) e de pulmão (LI *et al.*, 2014).

Na linhagem ZR-75-1, o silenciamento de *PBX1* reduziu a expressão de *CDKN1A* em 11,37% ($p = 0,0263$) (Figura 36A). Porém, não houve alteração na expressão de *CDKN1A* em MCF7 (Figuras 36B e 36C). Logo, os resultados indicam que o *PBX1* pode estar aumentando a expressão de *CDKN1A* em ZR-75-1, mas não em MCF7.

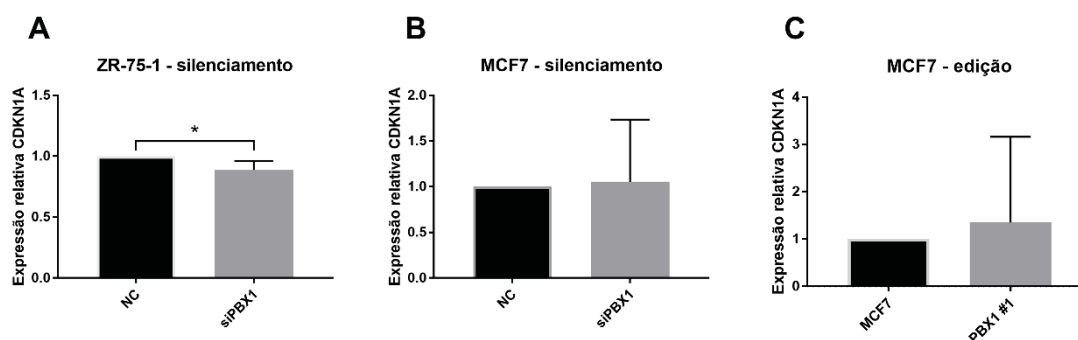


Figura 36: Expressão relativa de *CDKN1A* em células com *PBX1* silenciado ou editado. **A:** silenciamento em ZR-75-1. **B:** silenciamento em MCF7. **C:** edição em MCF7. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foram adotados os valores de significância: * $p \leq 0,05$.

Também foi avaliada a expressão de *SPINT2*, o qual já foi apontado como um alvo transcricional de *PBX1* (LACHMANN *et al.*, 2010; THIAVILLE *et al.*, 2012; ROUILLARD *et al.*, 2016). *SPINT2* exerce atividades supressoras de tumor em câncer gástrico (DONG *et al.*, 2010), de esôfago (YUE *et al.*, 2014), renal (MORRIS *et al.*, 2005) e de pulmão (MA *et al.*, 2019). Todavia, em câncer de mama, Wu *et al.* (2021) apontam que a expressão de *SPINT2* está aumentada e está associada a piores prognósticos. Ainda, Magnani *et al.* (2013) encontraram uma co-expressão entre *PBX1* e *SPINT2* em MCF7.

Quando a expressão de *SPINT2* foi investigada em ZR-75-1, houve redução de expressão significativa de 33,9% ($p = 0,0451$) a nível de mRNA após o silenciamento de *PBX1* (Figura 37A), em conformidade com os dados encontrados por Magnani *et al.* (2013). Por sua vez, o silenciamento de *PBX1* em MCF7 não alterou a expressão de *SPINT2* (Figuras 37B). Curiosamente, a edição do gene *PBX1* levou a um aumento de expressão de *SPINT2* ($p = 0,0451$) em 2,47 vezes (Figuras 37C), em oposição aos resultados previamente apresentados por Magnani *et al.* (2013). Esses resultados sugerem uma complexa regulação de *SPINT2* por *PBX1* em câncer de mama, que provavelmente envolve outros fatores e co-fatores.

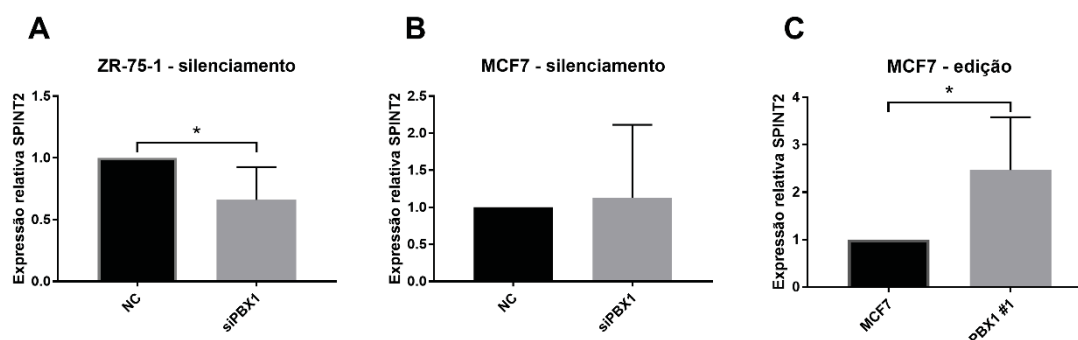


Figura 37: Expressão relativa de *SPINT2* em células com *PBX1* silenciado ou editado. **A:** silenciamento em ZR-75-1. **B:** silenciamento em MCF7. **C:** edição em MCF7. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foi adotado o valor de significância: * $p \leq 0,05$.

O último alvo investigado foi o gene *STK4*, o qual codifica para a proteína serina/treonina quinase 4 (*STK4*, também conhecida como *MST1*). Esse gene é considerado um alvo transcricional de *PBX1* (LACHMANN *et al.*, 2010; THIAVILLE *et al.*, 2012; ROUILLARD *et al.*, 2016), e sua expressão é positivamente correlacionada com a de *PBX1* em células de câncer de mama MCF7 (MAGNANI *et al.*, 2013). No contexto carcinogênico, a *STK4* age como supressora de tumor em diversos tipos de câncer, como de próstata (HSU *et al.*, 2014), cervical (MORGAN *et al.*, 2020) e de tireoide (PENG *et al.*, 2022) por meio da ativação da via Hippo.

Em ZR-75-1, o silenciamento de *PBX1* promoveu redução significativa de 34,33% ($p < 0,0001$) na expressão de *STK4* (Figura 38A), enquanto em MCF7 a expressão desse gene foi reduzida em 12,78% ($p = 0,0187$) (Figura 38B), corroborando com os resultados encontrados por Magnani *et al.* (2013). Entretanto, apesar da edição de *PBX1* ter reduzido em 34,46% a expressão de *STK4*, esses resultados não foram considerados significativos ($p = 0,0721$) devido ao alto desvio padrão (Figura 38C).

Em conjunto, esses resultados sugerem que *PBX1* participa positivamente da regulação de *STK4* em câncer de mama.

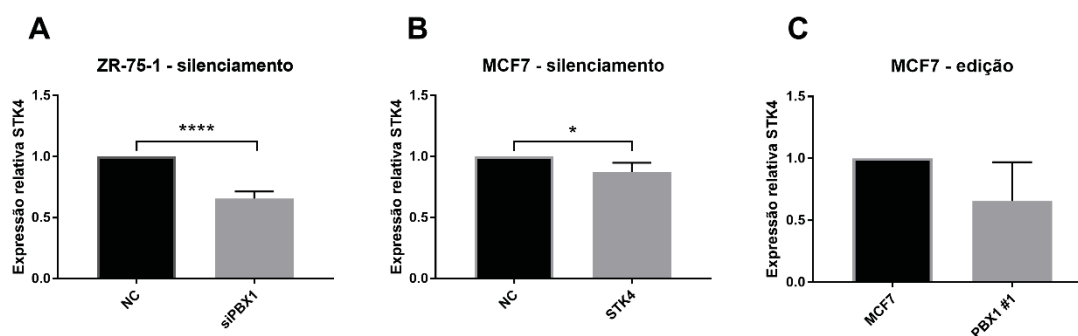


Figura 38: Expressão relativa de *STK4* em células com *PBX1* silenciado ou editado. **A:** silenciamento em ZR-75-1. **B:** silenciamento em MCF7. **C:** edição em MCF7. Para esse ensaio, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado. Foi adotado o valor de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

8.1. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente no mundo (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, são estimados mais de 66 mil novos casos dessa neoplasia em 2022 (MS/INCA, 2019). Dos subtipos imunoistoquímicos, o luminal A é o mais frequente, sendo responsável por quase 75% dos casos de câncer de mama (ACS, 2019). Apesar de ter um bom prognóstico e ter terapia-alvo para esse subtipo de carcinoma mamário, o seu tratamento enfrenta um importante obstáculo: o desenvolvimento de resistência, por uma parcela significativa dos tumores, às diferentes hormonioterapias, incluindo o tamoxifeno (revisado em BARAZETTI *et al.*, 2021). Logo, faz-se necessária a busca por novos alvos terapêuticos para tratar os tumores refratários.

O PBX1 é um fator de transcrição pioneiro que já foi associado com diversos *hallmarks* do câncer (revisado por VEIGA *et al.*, 2021) e, de acordo com Oliveira (2018), esse PF pode ser um modulador da resposta ao tamoxifeno no tratamento de carcinoma de mama luminal. Sendo assim, o presente trabalho se propôs a tentar validar, funcionalmente, os resultados *in silico* de Oliveira (2018). Ainda, ensaios adicionais de viabilidade, proliferação celular e capacidade clonogênica foram conduzidos para enriquecer a compreensão global de como o PBX1 atua em câncer de mama subtipo luminal A.

Em relação à viabilidade celular, ensaios de silenciamento indicaram que o PBX1 aumenta a viabilidade de MCF7, mas não de ZR-75-1. No entanto, em um estudo anterior, Zhang *et al.* (2017) demonstraram que PBX1 aumenta a viabilidade de células da linhagem ZR-75-1. O silenciamento de *PBX1* em células de câncer renal (WEI *et al.*, 2018) e de próstata (LIU *et al.*, 2019) também levaram a uma diminuição da viabilidade celular. Contudo, com base nos resultados do silenciamento de *PBX1* em MCF7, era esperado que as células selvagens fossem mais viáveis do que as células PBX1 #1, as quais foram editadas em *PBX1*. Todavia, foi verificada uma alta variabilidade entre as replicatas nos ensaios com as células editadas. Como os testes de viabilidade podem indicar tanto alteração nos processos metabólicos quanto nas taxas de morte celular ou proliferação, esta também foi investigada.

O PBX1 já foi positivamente associado com a proliferação celular em diversos tipos de câncer, tais como o renal (WEI *et al.*, 2018), de ovário e de mama (PARK *et al.*, 2008). Por outro lado, Li *et al.* (2014) demonstraram que o PBX1 inibe a proliferação de células de câncer de pulmão. Entretanto, no presente trabalho não foi detectada nenhuma diferença significativa na taxa de proliferação das células silenciadas ou editadas em *PBX1* em comparação às células controle. Wang *et al.* (2017) também não encontraram diferença na taxa de proliferação de células de câncer de mama triplo-negativas após a indução da expressão de PBX1. Ainda, foi possível demonstrar que o PBX1 aumenta a capacidade das células MCF7 em formar colônias, mas não altera a capacidade clonogênica de ZR-75-1. Zhang *et al.* (2017), por sua vez, sugerem que o PBX1 aumenta a capacidade clonogênica de ZR-75-1.

Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o PBX1 aumenta a resistência de MCF7 ao tamoxifeno. Os resultados aparentemente controversos entre os dados de silenciamento e de edição sugerem que mesmo uma baixa concentração de PBX1 residual pode ser o suficiente para reduzir a sensibilidade da célula tumoral ao tamoxifeno. Tendo em vista essa hipótese, seria interessante também editar o PBX1 em ZR-75-1, para entender se esse mesmo comportamento se repete em outra linhagem de células de câncer de mama luminal A. Apesar do PBX1 já ter sido associado

positivamente com a resistência à quimioterapia a base de platina em câncer de ovário (JUNG *et al.*, 2016) e à radioterapia em câncer de esôfago (YU *et al.*, 2020), não foi encontrado na literatura nenhum estudo que investigasse o papel de PBX1 na resistência ao tamoxifeno.

Em relação aos alvos transcricionais em potencial de PBX1, todos foram confirmados como positivamente regulados, direta ou indiretamente, por esse PF em ZR-75-1. Dos cinco alvos testados, apenas *CD46* é tido como um oncogene (SUROWIAK *et al.*, 2006; MACIEJCZYK *et al.*, 2011; ELVINGTON *et al.*, 2020). *CDKN1A*, *SPINT2* e *STK4* são reconhecidos supressores de tumor (WEINBERG, 2014; MA *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2022), e *CD44* é associado tanto com funções oncogênicas quanto supressoras de tumor (NAOR *et al.*, 2002; LOUDERBOUGH & SCHROEDER, 2011). Curiosamente, nas células MCF7 com *PBX1* editado, também houve regulação de *SPINT2*, mas de forma oposta, ou seja, PBX1 diminui a expressão de *SPINT2* em MCF7 enquanto aumenta em ZR-75-1. Tais diferenças na regulação da expressão desses genes alvo poderia explicar, parcialmente, como o PBX1 atua de maneira mais oncogênica em MCF7. Entretanto, essa visão é muito simplista, uma vez que foi avaliada a expressão de poucos genes que participam de vias distintas. Ainda, é possível notar uma grande variabilidade na expressão de alguns dos genes alvo em MCF7, tanto nos ensaios de silenciamento quanto de edição. Assim, seria interessante aumentar o número de replicatas.

Em conjunto, os resultados desse trabalho indicam que PBX1 atua de forma oncogênica em MCF7, aumentando a viabilidade celular, a capacidade clonogênica e a resistência ao tamoxifeno. No entanto, este comportamento não se repete em ZR-75-1, possivelmente em decorrência de diferenças nos programas transcricionais ativados por PBX1 em cada linhagem.

Conforme indicado no artigo do Capítulo III, o PBX1 está envolvido com diversos processos carcinogênicos. Contudo, os resultados apresentados no Capítulo IV sugerem que esse PF pode atuar de maneira diferente em um mesmo subtipo oncológico. Sendo assim, estudos mais aprofundados sobre os

mecanismos de atuação de PBX1 em câncer de mama luminal A devem ser conduzidos para validar essa proteína como um potencial alvo terapêutico.

8.2. CONCLUSÕES

O câncer de mama é o câncer mais incidente no mundo (SUNG *et al.*, 2021), com um risco estimado de 61,61 novos casos no Brasil para cada 100 mil mulheres (MS/INCA, 2019). Carcinomas mamários que expressam o receptor de estrogênio são os mais frequentes e se beneficiam da terapia hormonal ACS, 2019). Contudo, dada a característica contínua e prolongada desse tipo de tratamento, é comum o surgimento de células tumorais resistentes à medicação. Dessa forma, a busca por novos alvos terapêuticos é incessante.

O PBX1 é um fator de transcrição pioneiro que já foi associado com diversos *hallmarks* do câncer (revisado por VEIGA *et al.*, 2021). Oliveira (2018) indicou esse PF, por meio de investigações *in silico*, como um possível modulador do tamoxifeno. Todavia, os resultados do Capítulo IV desse trabalho sugerem que não seriam todos os tumores luminais que se beneficiariam de tratamento com inibidor de PBX1. Entender o mecanismo de atuação de PBX1 em MCF7 que leva ao fenótipo de resistência ao tamoxifeno pode ajudar a encontrar alvos mais promissores. Sendo assim, é preciso investigar de maneira mais integral os genes e proteínas que interagem com PBX1 em diferentes linhagens celulares.

8.3. PERSPECTIVAS

Por meio desse estudo, foi possível validar o PBX1 como um oncogene que aumenta a viabilidade celular, a capacidade clonogênica e a resistência de células MCF7 ao tamoxifeno. Contudo, uma vez que a viabilidade celular não foi influenciada pelas taxas de proliferação, seria interessante investigar se o PBX1 atua no ciclo ou na sobrevivência celular. Além disso, é preciso concluir os ensaios de *western blotting* com as células PBX1 #1 para validar se a edição de *PBX1* resultou em nocaute gênico, de fato.

Além disso, foi possível identificar que PBX1 aumenta a expressão de conhecidos supressores de tumor em ZR-75-1. Contudo, para entender como essas alterações vão impactar na fisiologia celular é necessário aprofundar o estudo. Futuramente, seria interessante utilizar a tecnologia CRISPR/Cas9 para editar o gene *PBX1* também em ZR-75-1, para entender se uma quantidade residual da proteína ainda exerce impactos importantes para a carcinogênese.

Assim como para EPHA2 #6, amostras de RNA total de PBX1 #1 e de MCF7 wt também foram extraídas em triplicatas independentes e enviadas para o estudo de RNAseq. Com isso, será possível uma análise aprofundada da modificação no perfil de expressão gênica em células editadas, em comparação às selvagens. Caso a edição de *PBX1* também seja efetuada em ZR-75-1, seria bastante enriquecedor realizar o RNAseq também para essa linhagem, permitindo a comparação entre os perfis transcricionais das duas linhagens.

9. REFERÊNCIAS

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

ADDGENE. Addgene: pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461). <<https://www.addgene.org/48140/>> Acessado em Novembro, 2018.

ALANKARAGE, D.; SZOT, J.O.; PACHTER, N.; SLAVOTINEK, A.; SELLERI, L.; SHIEH, J.T.; WINLAW, D.; GIANNOULATOU, E.; CHAPMAN, G.; DUNWOODIE, S.L. Functional characterization of a novel PBX1 de novo missense variant identified in a patient with syndromic congenital heart disease. **Human Molecular Genetics**. V. 29(7), p. 1068-1082. 2020.

AMATO, K.R.; WANG, S.; TAN, L.; HASTINGS, A.K.; SONG, W.; LOVELY, C.M.; MEADOR, C.B.; YE, F.; LU, P.; BALKO, J.M.; COLVIN, D.C.; CATES, J.M.; PAO, W.; GRAY, N.S.; CHEN, J. EPHA2 Blockade Overcomes Acquired Resistance to EGFR Kinase Inhibitors in Lung Cancer. **Cancer Research**. V. 76(2), p. 305-18. 2016.

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

AZIMI, A.; TUOMINEN, R.; SVEDMAN, F.C.; CARAMUTA, S.; PERNEMALM, M.; STOLT, M. F.; KANTER, L.; KHARAZIHA, P.; LEHTIÖ, J.; JOHANSSON, C.H.; HÖIOM, V.; HANSSON, J.; BRAGE, S.E. Silencing FLI or targeting CD13/ANPEP lead to dephosphorylation of EPHA2, a mediator of BRAF inhibitor resistance, and induce growth arrest or apoptosis in melanoma cells. **Cell Death and Disease**. V. 8(8), e3029. 2017.

BARAZETTI, J.F.; JUCOSKI, T.S.; CARVALHO, T.M.; VEIGA, R.N.; KOHLER, A.F.; BAIG, J.; AL BIZRI, H.; GRADIA, D.F.; MADER, S.; OLIVEIRA, J.C. From Micro to Long: Non-Coding RNAs in Tamoxifen Resistance of Breast Cancer Cells. **Cancers (Basel)**. V. 13(15), 3688. 2021.

BJERKE, G.A.; HYMAN-WALSH, C.; WOTTON, D. Cooperative transcriptional activation by Klf4, Meis2, and Pbx1. **Molecular and Cellular Biology**. V. 31(18), p. 3723-33. 2011.

BONACHO, T.; RODRIGUES, F.; LIBERAL, J. Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. **Biotechnic & Histochemistry**. V. 95(2), p. 71-91. 2020.

BRANTLEY-SIEDERS, D.M.; JIANG, A.; SARMA, K.; BADU-NKANSAH, A.; WALTER, D.L.; SHYR, Y.; CHEN, J. Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. **PLoS One**. V. 6(9), e24426. 2011.

BRANTLEY-SIEDERS, D.M.; ZHUANG, G.; HICKS, S.; FANG, W.B.; HWANG, Y.; CATES, J.M.M.; COFFMAN, K.; JACKSON, S.; BRUCKHEIMER, E.; MURAOKA-COOK, R.S.; CHEN, J. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastasis progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 118(1), p. 64-78, 2008.

BROMLEIGH, V.C.; FREEDMAN, L.P. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. **Genes & Development**. V. 14(20), 2581-6. 2000.

BURASCHI, S.; NEILL, T.; XU, S.Q.; PALLADINO, C.; BELFIORE, A.; IOZZO, R.V.; MORRIONE, A. Progranulin/EphA2 axis: A novel oncogenic mechanism in bladder cancer. **Matrix Biology**. V. 93, p. 10-24. 2020.

CAMPBELL, T.M.; CASTRO, M.A.A.; SANTIAGO, I.; FLTCHER, M.N.C.; HALIM, S.; PRATHALINGAM, R.; PONDER, B.A.J.; MEYER, K.B. FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting oestrogen responsiveness. **Carcinogenesis**. V. 37(8), p. 741-750, 2016.

CASTRO, M.A.A.; SANTIAGO, I.; CAMPBELL, T.M.; VAUGHN, C.; HICKEY, T.E.; ROSS, E.; TILLEY, W.D.; MARKOWETZ, F.; PONDER, B.A.J.; MEYER, K.B. Regulators of genetic risk of breast cancer identified by integrative network analysis. **Nature Genetics**. V. 48(1), p. 1-12, 2015.

CHEN, C.T.; LIAO, L.Z.; LU, C.H.; HUANG, Y.H.; LIN, Y.K.; LIN, J.H.; CHOW, L.P. Quantitative phosphoproteomic analysis identifies the potential therapeutic target EphA2 for overcoming sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells. **Experimental & Molecular Medicine**. V. 52(3), p. 497-513. 2020.

CHEN, Z.; LIU, Z.; ZHANG, M.; HUANG, W.; LI, Z.; WANG, S.; ZHANG, C.; DONG, B.; GAO, J.; SHEN, L. EPHA2 blockade reverses acquired resistance to afatinib induced by EPHA2-mediated MAPK pathway activation in gastric cancer cells and avatar mice. **International Journal of Cancer**. V. 145, p. 2440-2449. 2019.

CHENG, C.; ANSARI, M.M.; COOPER, J.A.; GONG, X. EphA2 and Src regulate equatorial cell morphogenesis during lens development. **Development**. V. 140(20), p. 4237-45. 2013.

COELHO, L.R.T. Vascularization: plant decellularization and electrospinning techniques for the development of small and medium caliber blood vessels. **Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Nova de Lisboa**. P. 1-129, 2018.

CUYÀS, E.; QUERALT, B.; MARTIN-CASTILLO, B.; BOSCH-BARRERA, J.; MENENDEZ, J.A. EphA2 receptor activation with ephrin-A1 ligand restores cetuximab efficacy in NRAS-mutant colorectal cancer cells. **Oncology Reports**. V. 38, p. 263-270. 2017.

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**. V. 7(10), p. 1281-1294, 2016.

DARLING, T.K.; LAMB, T.J. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. **Frontiers in Immunology**. V. 10, 1473. 2019.

DeSANTIS, C.E.; BRAY, F.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; ANDERSON, B.O.; JEMAL, A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. V. 24(10), p. OF1-OF12, 2015.

DOHN, M.; JIANG, J.; CHEN, X. Receptor tyrosine kinase EphA2 is regulated by p53-family proteins and induces apoptosis. **Oncogene**. V. 20(45), p. 6503-15. 2001.

DONG, W.; CHEN, X.; XIE, J.; SUN, P.; WU, Y. Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/SPINT2 in gastric cancer. **International Journal of Cancer**. V. 127(7), p. 1526-34. 2010.

EASTON, D.F.; FORD, D.; BISHOP, D.T.; BCLC – Breast Cancer Linkage Consortium. Breast and Ovarian Cancer Incidence in BRCA1-Mutation Carriers. **American Journal of Human Genetics**. V. 56, p. 265-271, 1995.

ELVINGTON, M.; LISZEWSKI, M.K.; ATKINSON, J.P. CD46 and Oncologic Interactions: Friendly Fire against Cancer. **Antibodies (Basel, Switzerland)**. V. 9(4), 59. 2020.

FACKENTHAL, J.D.; OLOPADE, O.I.; Breast cancer risk associated with *BRCA1* and *BRCA2* in diverse populations. **Nature Reviews Cancer**. V. 7, p.937-948, 2007.

FARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FUMOLEAU, P.; LARSIMONT, D.; MacGROGAN, G.; BERGH, J.; CAMERON, D.; GOLDSTEIN, D.; DUSS, S.; NICOULAZ, A-L.; BRISKEN, C.; FICHE, M.; DELORENZI, M.; IGGO, R. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**. V. 24, p. 4660-4671, 2005.

FLETCHER, M.N.C.; CASTRO, M.A.A.; WANG, X.; SANTIAGO, I.; O'REILLY, M.; CHIN, S-F.; RUEDA, O.M.; CALDAS, C.; PONDER, B.A.J.; MARKOWETZ, F.; MEYER, K.B. Master regulators of FGFR2 signalling and breast cancer risk. **Nature Communications**. V. 4, p. 1-12, 2013.

GAO, Z.; HAN, X.; ZHU, Y.; ZHANG, H.; TIAN, R.; WANG, Z.; CUI, Y.; WANG, Z.; NIU, R.; ZHANG, F. Drug-resistant cancer cell-derived exosomal EphA2 promotes breast cancer metastasis via the EphA2-Ephrin A1 reverse signaling. *Cell Death & Disease*. V. 12, 414. 2021.

GÖKMEN-POLAR, Y.; TORONI, R.A.; HOCEVAR, B.A.; BADVE, S.; ZHAO, Q.; SHEN, C.; BRUCKHEIMER, E.; KINCH, M.S.; MILLER, K.D. Dual targeting of EphA2 and ER restores tamoxifen sensitivity in ER/EphA2-positive breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. V. 127, p. 375-84. 2011.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.J. Strategies for Subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**. V. 22, p. 1736-1747, 2011.

GONG, J.; KÖRNER, R.; GAITANOS, L.; KLEIN, R. Exosomes mediate cell contact-independent ephrin-Eph signaling during axon guidance. **Journal of Cell Biology**. V. 214(1), p. 35-44. 2016.

GONG, S.; LI, Y.; LV, L.; MEN, W. Restored microRNA-519a enhances the radiosensitivity of non-small cell lung cancer via suppressing EphA2. **Gene Therapy**. 2021.

GREBBIN, B.M.; SCHULTE, D. PBX1 as a pioneer factor: a case still open. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. V. 5. 2017.

HAMMOND, M.E.H.; HAYES, D.F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D.C.; HAGERTY, K.L.; BADVE, S.; FITZGIBBONS, P.L.; FRANCIS, G.; GOLDSTEIN, N.S. HAYES, M.; HICKS, D.G.; LESTER, S.; LOVE, R.; MANGU, P.B.; McSHANE, L.; MILLER, K.; OSBORNE, C.K.; PAIK, S.; PERLMUTTER, J.; RHODES, A.; SASANO, H.; SCHWARTZ, J.N.; SWEEP, F.C.G.; TAUBE, S.; TORLAKOVIC, E.E.; VALENSTEIN, P.; VIALE, G.; VISSCHER, D.; WHEELER, T.; WILLIAMS, R.B.; WITTLIFF, J.L.; WOLFF, A.C. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Guideline Recommendation for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. V.132, p. e48-e72, 2010.

HAN, B.; ZHANG, H.; TIAN, R.; LIU, H.; WANG, Z.; WANG, Z.; TIAN, J.; CUI, Y.; REN, S.; ZUO, X.; TIAN, R.; NIU, R.; ZHANG, F. Exosomal EPHA2 derived from highly metastatic breast cancer cells promotes angiogenesis by activating

the AMPK signaling pathway through Ephrin A1-EPHA2 forward signaling. **Theranostics**. V. 12(9), p. 4127-4146. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. V. 144(5), p. 646-74. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. V. 100(1), p. 57-70. 2000.

HIMANEN, J-P.; RAJASHANKAR, K.R.; LACKMANN, M.; COWAN, C.A.; HENKEMEYER, M.; NIKOLOV, D.B. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*. V. 414(6866), p. 933-938. 2001.

HSU, T.I.; HSU, C.H.; LEE, K.H.; LIN, J.T.; CHEN, C.S.; CHANG, K.C.; SU, C.Y.; HSIAO, M.; LU, P.J. MicroRNA-18a is elevated in prostate cancer and promotes tumorigenesis through suppressing STK4 in vitro and in vivo. **Oncogenesis**. V. 3(4), e99. 2014.

HUANG, C.; CHEN, Z.; HE, Y.; HE, Z.; BAN, Z.; ZHU, Y.; DING, L.; YANG, C.; JEONG, J.H.; YUAN, W.; YANG, L. EphA2 promotes tumorigenicity of cervical cancer by up-regulating CDK6. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. V. 25(6), p. 2967-2975. 2021.

HUANG, C.; YUAN, W.; LAI, C.; ZHONG, S.; YANG, C.; WANG, R.; MAO, L.; CHEN, Z.; CHEN, Z. EphA2-to-YAP pathway drives gastric cancer growth and therapy resistance. *International Journal of Cancer*. V. 146(7), p. 1937-1949. 2020.

IGNATIADIS, M. & SOTIRIOU, C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**. V. 10, p. 494-506, 2013.

INCA: Instituto Nacional de Câncer. Disponível em <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>> Acessado em Setembro, 2022.

IRIE, N.; TAKADA, Y.; WATANABE, Y.; MATSUZAKI, Y.; NARUSE, C.; ASANO, M.; IWAKURA, Y.; SUDA, T.; MATSUO, K. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 284(21), p. 14637–14644. 2009.

ISHIGAKI, H.; MINAMI, T.; MORIMURA, O.; KITAI, H.; HORIO, D.; KODA, Y.; FUJIMOTO, E.; NEGI, Y.; NAKAJIMA, Y.; NIKI, M.; KANEMURA, S.; SHIBATA, E.; MIKAMI, K.; TAKAHASHI, R.; YOKOI, T.; KURIBAYASHI, K.; KIJIMA, T. EphA2 inhibition suppresses proliferation of small-cell lung cancer cells through inducing cell cycle arrest. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 519(4), p. 846-853. 2019.

JANES, P.W.; GRIESSHABER, B.; ATAPATTU, L.; NIEVERGALL, E.; HII, L.L.; MENSINGA, A.; CHHEANG, C.; DAY, B.W.; BOYD, A.W.; BASTIAENS, P.I.; JØRGENSEN, C.; PAWSON, T.; LACKMANN, M. Eph receptor function is modulated by heterooligomerization of A and B type Eph receptors. **The Journal of Cell Biology**. V. 195(6), p. 1033–1045. 2011.

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

JOZWIK, K.M.; CARROLL, J.S. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. **Nature Reviews**. V. 12(6), p. 381-385. 2012.

JUNG, J.G.; SHIH, I.M.; PARK, J.T.; GERRY, E.; KIM, T.H.; AYHAN, A.; HANDSCHUH, K.; DAVIDSON, B.; FADER, A.N.; SELLERI, L.; WANG, T.L. Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell Reprogramming Factor PBX1. **Cancer Research**. V. 76(21), p. 6351-6361. 2016.

KIM, S.K.; SELLERI, L.; LEE, J.S.; ZHANG, A.Y.; GU, X.; JACOBS, Y.; CLEARY, M.L. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpf-1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. **Nature Genetics**. V. 30(4), p. 430-435. 2002.

KINCH, M.S.; CARLES-KINCH, K. Overexpression and functional alterations of the EphA2 tyrosine kinase in cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**. V. 20(1), p. 59-68. 2003.

LACHMANN, A.; XU, H.; KRISHNAN, J.; BERGER, S.I.; MAZLOOM, A.R.; MA'AYAN, A. ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. **Bioinformatics**. V. 26(19), p. 2438-44. 2010.

LARSEN, A.B.; PEDERSEN, M.W.; STOCKHAUSEN, M-T.; GRANDAL, M.V.; DEURS, B.; POULSEN, H.S. Activation of the EGFR Gene Target EphA2

Inhibits Epidermal Growth Factor-Induced Cancer Cell Motility. **Molecular Cancer Research**. V. 5(3), p. 283-293, 2007.

LARSEN, A.B.; STOCKHAUSEN, M.T.; POULSEN, H.S. Cell adhesion and EGFR activation regulate EphA2 expression in cancer. **Cellular Signalling**. V. 22(4), p. 636-44. 2010.

LÉVÊQUE, R.; CORBET, C.; AUBERT, L.; GUILBERT, M.; LAGADEC, C.; ADRIAENSSENS, E.; DUVAL, J.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D.; MAGNÉ, N.; CHOPIN, V.; BERTUCCI, F.; LE BOURHIS, X.; TOILLON, R.A. ProNGF increases breast tumor aggressiveness through functional association of TrkA with EphA2. **Cancer Letters**. V. 449, p. 196-206. 2019.

LI, J.Y.; XIAO, T.; YI, H.M.; YI, H.; FENG, J.; ZHU, J.F.; HUANG, W.; LU, S.S.; ZHOU, Y.H.; LI, X.H.; XIAO, Z.Q. S897 phosphorylation of EphA2 is indispensable for EphA2-dependent nasopharyngeal carcinoma cell invasion, metastasis and stem properties. **Cancer Letters**. V. 444, p. 162-174. 2019.

LI, W.; HUANG, K.; GUO, H.; CUI, G.; ZHAO, S. Inhibition of non-small-cell lung cancer cell proliferation by Pbx1. **Chinese Journal of Cancer Research**. V. 26(5), p. 573-8. 2014.

LIANG, L-Y.; PATEL, O.; JANES, P.W.; MURPHY, J.M.; LUCET, I.S. Eph receptor signalling: from catalytic to non-catalytic functions. **Oncogene**. V. 38(39), p. 6567–6584. 2019.

LIM, S.Z.; ONG, K.W.; TAN, B.K.T.; SELVARAJAN, S.; TAN, P.H. Sarcoma of the breast: an update on a rare entity. **Journal of Clinical Pathology**. V. 0, p. 1-9, 2016.

LIN, Y.G.; HAN, L.Y.; KAMAT, A.A.; MERRITT, W.M.; LANDEN, C.N.; DEAVERS, M.T.; FLETCHER, M.S.; URBAUER, D.L.; KINCH, M.S.; SOOD, A.K. EphA2 overexpression is associated with angiogenesis in ovarian cancer. **Cancer**. V. 109, p. 332-40. 2007.

LIU, Y.; XU, X.; LIN, P.; HE, Y.; ZHANG, Y.; CAO, B.; ZHANG, Z.; SETHI, G.; LIU, J.; ZHOU, X.; MAO, X. Inhibition of the deubiquitinase USP9x induces pre-B cell homeobox 1 (PBX1) degradation and thereby stimulates prostate cancer cell apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 294(12), p. 4572-4582. 2019.

LIU, Y.; YU, C.; QIU, Y.; HUANG, D.; ZHOU, X.; ZHANG, X.; TIAN, Y. Downregulation of EphA2 expression suppresses the growth and metastasis in squamous-cell carcinoma of the head and neck in vitro and in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. V. 138(2), p. 195-202. 2012.

LOI, S.; GIOBBIE-HURDER, A.; GOMBOS, A.; BACHELOT, T.; HUI, R.; CURIGLIANO, G.; CAMPONE, M.; BIGANZOLI, L.; BONNEFOI, H.; JERUSALEM, G.; BARTSCH, R.; RABAGLIO-PORETTI, M.; KAMMLER, R.; MAIBACH, R.; SMYTH, M.J.; DI LEO, A.; COLLEONI, M.; VIALE, G.; REGAN, M.M.; ANDRÉ, F. International Breast Cancer Study Group and the Breast International Group. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. **The Lancet Oncology**. V. 20(3), p. 371-382. 2019.

LOUDERBOUGH, J.M.; SCHROEDER, J.A. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. **Molecular Cancer Research: MCR**. V. 9(12), p. 1573-86. 2011.

LU, M.; MILLER, K.D.; GOKMEN-POLAR, Y.; JENG, M.H.; KINCH, M.S. EphA2 overexpression decreases estrogen dependence and tamoxifen sensitivity. **Cancer Research**. V. 63(12), p. 3425-9. 2003.

MA, Z.; LIU, D.; LI, W.; DI, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, J.; XU, L.; GUO, K.; ZHU, Y.; HAN, J.; LI, X.; YAN, X. STYK1 promotes tumor growth and metastasis by reducing SPINT2/HAI-2 expression in non-small cell lung cancer. **Cell Death & Disease**. V. 10(6), 435. 2019.

MACIEJCZYK, A.; SZELACHOWSKA, J.; SZYNGLAREWICZ, B.; SZULC, R.; SZULC, A.; WYSOCKA, T.; JAGODA, E.; LAGE, H.; SUROWIAK, P. CD46 Expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM**. V. 19(6), p. 540-6. 2011.

MACRAE, M.; NEVE, R.M.; RODRIGUEZ-VICIANA, P.; HAQQ, C.; YEH, J.; CHEN, C.; GRAY, J.W.; MCCORMICK, F. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. **Cancer Cell**. V. 8(2), p. 111-8. 2005.

MAGNANI, L.; BALLANTYNE, E.B.; ZHANG, X.; LUPIEN, M. PBX1 Genomic Pioneer Function Drives ER α Signaling Underling Progression in Breast Cancer. **PLoS Genetics**. V. 7(11), p. 1-15, 2011.

MAGNANI, L.; PATTEN, D.K.; NGUYEN, V.T.M.; HONG, S-P.; STEEL, J.H.; PATEL, N.; LOMBARDO, Y.; FARONATO, M.; GOMES, A.R.; WOODLEY, L.; PAGE, K.; GUTTERY, D.; PRIMROSE, L.; GARCIA, D.F.; SHAW, J.; VIOLA, P.; GREEN, A.; NOLAN, C.; ELLIS, I.O.; RAKHA, E.A.; SHOUSHA, S.; LAM, E.W-F.; GIORFFY, B.; LUPIEN, M.; COOMBES, R.C. The pioneer factor PBX1 is a novel driver of metastatic progression in ER α -positive breast cancer. **Oncotarget**. V. 6(26), p. 21878-21891. 2015.

MAGNANI, L.; STOECK, A.; ZHANG, X.; LÁNCZKY, A.; MIRABELLA, A.C.; WANG, T-L.; GYORFFY, B.; LUPIEN, M. Genome-wide reprogramming of the chromatin landscape underlies endocrine therapy resistance in breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 110(16), p. E1490-E1499. 2013.

MELLO, R.A.; FIGUEIREDO, P.; MARQUES, M.; SOUSA, G.; CARVALHO, T.; GERVÁSIO, H. Concurrent breast stroma sarcoma and breast carcinoma: a case report. **Journal of Medical Case Reports**. V. 4, 414, 2010.

MEYER, K.B.; MAIA, A-T.; O'REILLY, M.; TESCHENDORFF, A.E.; CHIN, S-F.; CALDAS, C.; PONDER, B.A.J. Allele-Specific Up-Regulation of *FGFR2* Increases Susceptibility to Breast Cancer. **PLoS Biology**. V. 6(5), p. 1098-1103, 2008.

MIAO, H.; LI, D-Q.; MUKHERJEE, A.; GUO, H.; PETTY, A.; CUTTER, J.; BASILION, J.P.; SEDOR, J.; WU, J.; DANIELPOUR, D.; SLOAN, A.E.; COHEN, M.L.; WANG, B. EphA2 Mediates Ligand-Dependent Inhibition and Ligand-Independent Promotion of Cell Migration and Invasion via a Reciprocal Regulatory Loop with Akt. **Cancer Cell**. V. 16(1), p. 9–20. 2009.

MIAO, H.; WEI, B.R.; PEEHL, D.M.; LI, Q.; ALEXANDROU, T.; SCHELLING, J.R.; RHIM, J.S.; SEDOR, J.R.; BURNETT, E.; WANG, B. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. **Nature Cell Biology**. V. 3(5), p. 527-30. 2001.

MONICA, K.; GALILI, N.; NOURSE, J.; SALTMAN, D.; CLEARY, M.L. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Molecular and Cellular Biology*. V. 11(12), p. 6149-6157. 1991.

MORGAN, E.L.; PATTERSON, M.R.; RYDER, E.L.; LEE, S.Y.; WASSON, C.W.; HARPER, K.L.; LI, Y.; GRIFFIN, S.; BLAIR, G.E.; WHITEHOUSE, A.; MACDONALD, A. MicroRNA-18a targeting of the STK4/MST1 tumour

suppressor is necessary for transformation in HPV positive cervical cancer. **PLoS Pathogens**. V. 16(6), e1008624. 2020.

MORRIS, M.R.; GENTLE, D.; ABDULRAHMAN, M.; MAINA, E.N.; GUPTA, K.; BANKS, R.E.; WIESENER, M.S.; KISHIDA, T.; YAO, M.; TEH, B.; LATIF, F.; MAHER, E.R. Tumor suppressor activity and epigenetic inactivation of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2/SPINT2 in papillary and clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Research**. V. 65(11), p. 4598-606. 2005.

MS/INCA: Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer. Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil. **Coordenação de Ensino**. p. 1-130, 2019.

NAOR, D.; NEDVETZKI, S.; GOLAN, I.; MELNIK, L.; FAITELSON, Y. CD44 in cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. V. 39(6), p. 527-79. 2002.

NASREEN, N.; MOHAMMED, K.A.; LAI, Y.; ANTONY, V.B. Receptor EphA2 activation with ephrinA1 suppresses growth of malignant mesothelioma (MM). **Cancer Letters**. V. 258(2), p. 215-22. 2007.

NIU, Y.; SENGUPTA, M.; TITOV, A.A.; CHOI, S.C.; MOREL, L. The PBX1 lupus susceptibility gene regulates CD44 expression. **Molecular Immunology**. V. 85, p. 148-154, 2017.

NOBLITT, L.W.; BANGARI, D.S.; SHUKLA, S.; KNAPP, D.W.; MOHAMMED, S.; KINCH, M.S.; MITTAL, S.K. Decreased tumorigenic potential of EphA2-overexpressing breast cancer cells following treatment with adenoviral vectors that express EphrinA1. **Cancer Gene Therapy**. V. 11(11), p. 757-66. 2004.

OLIVEIRA, K.G. Análise de interatomos centrados no receptor FGFR2 – Potenciais alvos terapêuticos no câncer de mama. **Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Paraná**. P. 1-71, 2018.

PAN, H.; GRAY, R.; BRAYBROOKE, J.; DAVIES, C.; TAYLOR, C.; MCGALE, P.; PETO, R.; PRITCHARD, K.I.; BERGH, J.; DOWSETT, M.; HAYES, D.F.; EBCTCG. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. **The New England Journal of Medicine**. V. 377(19), p. 1836-1846. 2017.

PARK, J.T.; SHIH, I-M., WANG, T.L. Identification of Pbx1, a potential oncogene, as a Notch3 target gene in ovarian cancer. **Cancer Research**. V. 68(21), p. 8852-60. 2008.

PARTIPILO, G.; SIMONE, G.; SCATTONE, A.; SCARPI, E.; AZZARITI, A.; MANGIA, A. Expression of proteins involved in DNA damage response in familial and sporadic breast cancer patients. **International Journal of Cancer**. V. 138, p. 110-120, 2016.

PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. **Nature Reviews**. V. 10(3), p. 165-180. 2010.

PASQUALE, E. B. Exosomes expand the sphere of influence of Eph receptors and ephrins. **The Journal of Cell Biology**. V. 214(1), p. 5-7. 2016.

PENG, X.; ZHU, Y.; LIN, S.; YU, W.; ZHANG, C.; TAN, L.; LONG, M.; LUO, D.; JI, C. Circular RNA_0057209 Acts as ceRNA to Inhibit Thyroid Cancer Progression by Promoting the STK4-Mediated Hippo Pathway via Sponging MicroRNA-183. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. V. 2022, 9974639. 2022.

PEREIRA, T.C. Introdução à técnica de CRISPR. **Sociedade Brasileira de Genética**. Editora Cubo. 2016.

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

POLLARD, S.G.; MARKS, P.V.; TMEPLE, L.N.; THOMPSON, H.H. Breast Sarcoma. A clinicopathologic review of 25 cases. **Cancer**. V. 66(5), p.941-944, 1990.

PRAT, A.; PARKER, J.S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J.I.; HE, X.; PEROU, C.M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**. V. 12, p. 1-18, 2010.

RAN, F.A.; HSU, P.D.; LIN, C-Y.; GOOTENBERG, J.S.; KONERMANN, S.; TREVINO, A. E.; COTT, D.A.; INOUE, A.; MATOBA, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, F. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*. V. 154, p. 1380-1389, 2013a.

RAN, F.A.; HSU, P.D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D.A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**. V. 8(11), p. 2281-2308. 2013b.

RIEDHAMMER, K.M.; SIEGEL, C.; ALHADDAD, B.; MONTOYA, C.; KOVACS-NAGY, R.; WAGNER, M.; MEITINGER, T.; HOEFELE, J. Identification of a novel heterozygous de novo 7-bp frameshift deletion in PBX1 by whole-exome sequencing causing a multi-organ syndrome including bilateral dysplastic kidneys and hypoplastic clavicles. **Frontiers in Pediatrics**. V. 5, 251. 2017.

ROBSON, M.E. Clinical Considerations in the Management of Individuals at Risk for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. **Cancer Control**. V. 9(6), p.457-465, 2002.

ROUILLARD, A.D.; GUNDERSEN, G.W.; FERNANDEZ, N.F.; WANG, Z.; MONTEIRO, C.D.; MCDERMOTT, M.G.; MA'AYAN, A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. **Database (Oxford)**. V. 2016, baw100. 2016.

SAHOO, A. R.; BUCK, M. Structural and functional insights into the transmembrane domain association of the Eph Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 22(16), 8593. 2021.

SAITO, T.; MASUDA, N.; MIYAZAKI, T.; KANO, K.; SUZUKI, H.; SHIMURA, T.; ASAO, T.; KUWANO, H. Expression of EphA2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. **Oncology Reports**. V. 11(3), p. 605-11. 2004.

SCHNABEL, C.A.; SELLERI, L.; CLEARY, M.L. Pbx1 is essential for adrenal development and urogenital differentiation. **Genesis**. V. 37(3), p. 123-130. 2003b.

SERVIK, K. Breast Cancer: A World of Differences. **Science**. V. 343, p. 1452-1453, 2014.

SHI, Y.; DE MARIA, A.; BENNETT, T.; SHIELS, A.; BASSNETT, S. A role for epha2 in cell migration and refractive organization of the ocular lens. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. V. 53(2), p. 551-9. 2012.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. V. 72(1), p. 7-33, 2022.

SILVA, D.A.S.; TREMBLAY, M.S.; SOUZA, M.F.M.; GUERRA, M.R.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M.; MALTA, D.C. Mortality and years of life lost due to breast cancer attributable to physical inactivity in the Brazilian female population (1990-2015). **Scientific Reports**. V. 8(1), 11141. 2018.

SONG, W.; HWANG, Y.; YOUNGBLOOD, V.M.; VOOK, R.S.; BALKO, J.M.; CHEN, J.; BRANTLEY-SIEDERS, D.M. Targeting EphA2 impairs cell cycle pregression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. **Oncogene**. V. 36, p. 5620-5630, 2017.

SØRLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P.E.; BØRRESEN-DALE, A-L. Gene expression. Patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 98(19), p. 10869-10874, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C.M.; LØNNING, P.E.; BROWN, P.O.; BØRRESEN-DALE, A-L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 100(14), p. 8418-8423, 2003.

STACEY, S.N.; MANOLESCU, A.; SULEM, P. *et al.* Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. **Nature Genetics**. V. 40(6), p. 703-706, 2008.

STEWART, B.W.; WILD, C.P. World Cancer Report. **International Agency for Research on Cancer – World Health Organization**. WHO Press, p. 1-632, 2014.

STRUEWING, J.P.; HARTGE, P.; WACHOLDER, S.; BAKER, S.M.; BERLIN, M.; McADAMS, M.; TIMMERMAN, M.M.; BRODY, L.C.; TUCKER, M.A. The Risk of Cancer Associated with Specific Mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. **The New England Journal of Medicine**. V.336, p. 1401-1408, 1997.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. 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, p. 209-249. 2021.

SUROWIAK, P.; MATERNA, V., MACIEJCZYK, A.; KAPLENKO, I.; SPACZYNSKI, M.; DIETEL, M.; LAGE, H.; ZABEL, M. CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Research*. V. 26(6C), p. 4943-8. 2006.

TAN, P.; LIU, Y.; YU, C.; SU, Z.; LI, G.; ZHOU, X.; HUANG, D.; ZHANG, X.; QIU, Y.; TIAN, Y. EphA2 silencing in nasopharyngeal carcinoma leads to decreased proliferation, invasion and increased sensitization to paclitaxel. **Oncology Letters**. V. 4(3), p. 429-434. 2012.

THIAVILLE, M.M.; STOECK, A.; CHEN, L.; WU, R.C.; MAGNANI, L.; OIETMAN, J.; SHIH, I-M.; LUPIEN, M.; WANG, T.L. Identification of PBX1 target genes in cancer cells by global mapping of PBX1 binding sites. **PLoS One**. V. 7(5), e36054. 2012.

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

VAUGHT, D.; CHEN, J.; BRANTLEY-SIEDERS, D.M. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by EphA2 receptor tyrosine kinase. **Molecular Biology of the Cell**. V. 20(10), p. 2572-81. 2009.

VEIGA, R.N.; DE OLIVEIRA, J.C.; GRADIA, D.F. PBX1: a key character of the hallmarks of cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. V. 99(12), p. 1667-1680. 2021.

VUONG, D.; SIMPSON, P.T.; GREEN, B.; CUMMINGS, M.C.; LAKHANI, S.R. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**. V. 465(1), p. 1-14, 2014.

WAGNER, K.; MINCHEVA, A.; KORN, B.; LICHTER, P.; PÖPPERL, H. Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. **Mechanisms of development**. V. 103(1-2), p. 127-131. 2001.

WALKER-DANIELS, J.; COFFMAN, K.; AZIMI, M.; RHIM, J.S.; BOSTWICK, D.G.; SNYDER, P.; KERNS, B.J.; WATERS, D.J.; KINCH, M.S. Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. **The Prostate**. V. 41, p. 275-80. 1999.

WALKER-DANIELS, J.; RIESE, D.J. 2ND; KINCH, M.S. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. **Molecular Cancer Research**. V. 1(1), p. 79-87. 2002.

WANG, J.; SHIDFAR, A.; IVANCIC, D.; RANJAN, M.; LIU, L.; CHOI, M-R.; PARIMI, V.; GURSEL, D. B.; SULLIVAN, M. E.; NAJOR, M. S.; ABUKHDEIR, A. M.; SCHOLTENS, D.; KHAN, S. A. 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(11), p. 2484-2497. 2017.

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

WEI, X.; YU, L.; LI, Y. PBX1 promotes the cell proliferation via JAK2/STAT3 signaling in clear cell renal carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 500(3), p. 650-657. 2018.

WEINBERG, R.A. The Biology of Cancer. **Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC**. Segunda edição, 2014.

WERLE, E.; SCHNEIDER, C.; RENNER, M.; VÖLKER, M.; FIEHN, W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. **Nucleic Acids Research**. V. 22, n. 20, p. 4354-4355. 1994.

WIŚNIEWSKI, J.R.; GAUGAZ, F.Z. Fast and sensitive total protein and Peptide assays for proteomic analysis. **Analytical Chemistry**. V. 87(8), p. 4110-4116. 2015.

WU, Q.; YIN, G.; LUO, J.; ZHANG, Y.; AI, T.; TIAN, J.; JIN, Y.; LEI, J.; LIU, S. Comprehensive Analysis of the Expression and Prognostic Value of SPINT1/2 in Breast Carcinoma. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. V. 12, 665666. 2021.

YAO, F.; HUANG, X.; XIE, Z.; CHEN, J.; ZHANG, L.; WANG, Q.; LONG, H.; JIANG, J.; WU, Q. LINC02418 upregulates EPHA2 by competitively sponging miR-372-3p to promote 5-Fu/DDP chemoresistance in colorectal cancer. **Carcinogenesis**. V. 43(9), p. 895-907. 2022.

YEDDULA, N.; XIA, Y.; KE, E.; BEUMER, J.; VERMA, I.M. Screening for tumor suppressors: Loss of ephrin receptor A2 cooperates with oncogenic KRas in promoting lung adenocarcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 112(47), E6476-85. 2015.

YU, D.; MA, Y.; FENG, C.; MA, Z.; GUO, J.; CHEN, H.; HE, T.; GUO, J.; SUN, X.; QIN, Q.; SUN, X.; MA, J. PBX1 increases radiosensitivity of oesophageal squamous cancer by targeting of STAT3. **Pathology and Oncology Research**. V. 26(4), p. 2161-2168. 2020.

YUAN, W.; CHEN, Z.; WU, S.; GE, J.; CHANG, S.; WANG, X.; CHEN, J.; CHEN, Z. Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis. **Pathology Oncology Research**. V. 15(3), p. 473-8. 2009.

YUE, D.; FAN, Q.; CHEN, X.; LI, F.; WANG, L.; HUANG, L.; DONG, W.; CHEN, X.; ZHANG, Z.; LIU, J.; WANG, F.; WANG, M.; ZHANG, B.; ZHANG, Y. Epigenetic inactivation of SPINT2 is associated with tumor suppressive function in esophageal squamous cell carcinoma. **Experimental Cell Research**. V. 322(1), p. 149-58. 2014.

ZANG, X.P.; PENTO, T. Keratinocyte growth factor-induced motility of breast cancer cells. **Clinical & Experimental Metastasis**. V. 18, p. 573-580, 2001.

ZHANG, L-X.; XU, L.; ZHANG, C-H.; LU, Y-H.; JI, T-H.; LING, L-J. uc38 induces breast cancer cell apoptosis via PBX1. *American Journal of Cancer Research*. V. 7(12), p. 2438-2451. 2017.

ZHOU, Y.; YAMADA, N.; TANAKA, T.; HORI, T.; YOKOYAMA, S.; HAYAKAWA, Y.; YANO, S.; FUKUOKA, J.; KOIZUMI, K.; SAIKI, I.; SAKURAI, H. Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2. **Nature Communications**. V. 6, 7679. 2015.

ZHUANG, G.; BRANTLEY-SIEDERS, D.M.; VAUGHT, D.; YU, J.; XIE, L.; WELLS, S.; JACKSON, D.; MURAOKA-COOK, R.; ARTEAGA, C.; CHEN, J. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Research*. V. 70(1), p. 299-308. 2010.

APÊNDICE 1 – RESUMO DE ATIVIDADES REALIZADAS

Além das atividades que compõem esse projeto de pesquisa, diversas outras foram realizadas durante o período do curso de Doutorado. Participei de um projeto para a classificação molecular de tumores mamários por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, bem como em um projeto sobre o câncer de mama e a via das lectinas. Coorientei um trabalho de conclusão de curso, fui membro de banca avaliadora de curso de extensão, de iniciação científica e de iniciação científica júnior. Também apresentei e participei de trabalhos apresentados em eventos científicos. Ainda, fui representante discente, ministrei cursos e palestras, fui discente em cursos de curta duração e participei da organização de eventos.

ARTIGOS PUBLICADOS

I. *From Micro to Long: Non-Coding RNAs in Tamoxifen Resistance of Breast Cancer Cells* (Cancers (Basel), 2021, FI 6,575).

Fui coautora neste artigo de revisão, cuja primeira autoria é da MSc. Jéssica Fernanda Barazetti, e fui responsável por parte das análises e escrita do artigo.

DOI: [10.3390/cancers13153688](https://doi.org/10.3390/cancers13153688)

II. *PBX1: a key character of the hallmarks of cancer* (Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2021, FI 5,606).

Fui a primeira autora desse artigo de revisão, sendo responsável pela escrita, revisão e edição do artigo.

DOI: [10.1007/s00109-021-02139-2](https://doi.org/10.1007/s00109-021-02139-2)

ARTIGO SUBMETIDO

I. *Targeting EphA2: a promising strategy to overcome chemoresistance and drug resistance in cancer* (International Journal of Molecular Sciences, FI 6,208).

Sou a primeira autora desse artigo de revisão, sendo responsável pela escrita, revisão e edição do artigo.

ARTIGOS A SEREM ESCRITOS

Os resultados experimentais, descritos nos Capítulos II e IV dessa Tese, ainda não foram submetidos para publicação em nenhuma revista científica porque entendemos que alguns experimentos precisam ser concluídos e outros incluídos no estudo. Com esses dados, serão produzidos dois artigos: um referente aos resultados de análises com EphA2, e outro com PBX1.

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

I. *Regulation of Immune Cells by microRNAs and microRNA-Based Cancer Immunotherapy* (Springer, 2022).

Sou a primeira autora desse capítulo, publicado no livro *Systems Biology of MicroRNAs in Cancer*, pela Springer. Fui uma das responsáveis escrita e edição do capítulo.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-031-08356-3_3

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS POR ALGUM DOS AUTORES

- I. VEIGA, R. N.; OLIVEIRA, K. G.; PEREIRA, I. T.; DALLAGIOVANNA, B.; OLIVEIRA, J. C.; CASTRO, M. A. A.; GRADIA, D. F. EPHA2 and PBX1 mediate FGFR2 signaling and modulate tamoxifen responsiveness in estrogen receptor positive breast cancers. XXXII Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2021.

- II. CARVALHO, T. M.; VEIGA, R. N.; CUPERTINO, S. E. S.; ALENCAR, N. M.; RODRIGUES, A. C.; BOLDT, A. B. W.; GRADIA, D. F.; RIBEIRO, E. M. S. F. Análise de associação entre polimorfismos do gene MASP2 e o câncer de mama esporádico. XXXII Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2021.
- III. ALENCAR, N. M.; CARVALHO, T. M.; VEIGA, R. N.; MATHIAS, C.; RODRIGUES, A. C.; BOLDT, A. B. W.; GRADIA, D. F. Estudo de associação de polimorfismo dos genes FCN1 e MASP2 via das lectinas do sistema complemento em câncer de mama. XII Simpósio Sul de Imunologia, 2019.
- IV. OLIVEIRA, K. G.; VEIGA, R. N.; OLIVEIRA, J. C.; GRADIA, D. F.; CASTRO, M. A. A. EPHA2 and PBX1 mediate FGFR2 signalling and modulate tamoxifen responsiveness in luminal A and B breast cancers. Genética 2019 - 65th Brazilian Congress of Genetics, 2019.
- V. POWROSNEK, LETICIA C. B.; CONINCK, JOSE CARLOS P.; ANTONIASSI, MARCELO; KAMIKAWACHI, RICARDO C.; VEIGA, RAFAELA N.; DE OLIVEIRA, JAQUELINE C. Cell Lines Molecular Classification by FT-IR Spectroscopy Using the Recurrence Quantification Analysis (RQA) Technique. In: 2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2019, Sao Paulo. 2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2019.

COORIENTAÇÃO EM TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Fui coorientadora da acadêmica Fernanda V. Telechi em seu Trabalho de Estágio Curricular – Monografia do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, da Universidade Federal do Paraná, intitulado “Estudo da ocorrência da síndrome de li-fraumeni na população do Paraná”, sob orientação da Prof. Daniela Fiori Gradia.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

I. Membro da Banca Avaliadora de Trabalhos apresentados durante a 7ª Feira de Ciências Júnior da PUCPR. 2022. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

II. Participação em banca de Rosimeri Sabim Batista. Trabalho intitulado: Dificuldades e metodologias no ensino - aprendizagem da genética: revisão bibliográfica. 2019. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio) - Universidade Federal do Paraná.

III. Membro da Banca Avaliadora de Trabalhos apresentados durante a 11ª SIEPE: Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2019. Universidade Federal do Paraná.

CURSOS E AULAS MINISTRADOS / MONITORIA

- I. Carcinogênese e Oncologia Clínica. 2021. (Curso de curta duração ministrado na Faculdade ILAPEO).
- II. Carcinogênese e Oncologia Clínica. 2021. (Curso de curta duração ministrado nas Faculdades Integradas Camões, 2º semestre).
- III. Carcinogênese e Oncologia Clínica. 2021. (Curso de curta duração ministrado nas Faculdades Integradas Camões, 1º semestre).
- IV. Carcinogênese e Oncologia Clínica. 2020. (Curso de curta duração ministrado nas Faculdades Integradas Camões).
- V. Biologia do Câncer. 2019. (Curso de curta duração ministrado no XXIX Ciclo de Atualizações em Ciências Biológicas).
- VI. Biologia do Câncer. 2019. (Curso de curta duração ministrado no XII Curso de Inverno de Genética).
- VII. Genética Molecular I. 2019. (Curso de curta duração ministrado no REMendel2019: Aprendendo e Ensinando Genética).

- VIII. Monitoria em REMENDEL 2018: revisitando a Genética Clássica. (Universidade Federal do Paraná).

PALESTRAS MINISTRADAS

- I. CRISPR: A Revolução na Engenharia Genética. 2020. XLIII Semana de Biologia da UFJF.
- II. CRISPR/Cas9 como Ferramenta para Nocaute Gênico em Células Humanas. 2019. XXIX Ciclo de Atualizações em Ciências Biológicas.
- III. CRISPR como uma ferramenta para nocaute gênico em estudos de células humanas. 2019. XII Curso de Inverno de Genética.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos realizados durante o período do curso de Doutorado:

- I. Minicurso Terapia Gênica. (Carga horária: 2h) - Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil. 2020.
- II. Ferramentas de Biologia Molecular para Estudos de Função Gênica. (Carga horária: 15h) - Instituto Carlos Chagas, ICC, Brasil. 2020.
- III. I Curso de Atualização em Genética Médica. (Carga horária: 20h) - Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil. 2020.
- IV. Minicurso Da citogenética à citogenômica. (Carga horária: 2h) - Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil. 2020.
- V. Minicurso Genética para não-geneticistas. (Carga horária: 2h) - Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil. 2020.
- VI. Minicurso Política Nacional de Doenças Raras. (Carga horária: 2h) - Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil. 2020.

- VII. Sinalização Celular: principais vias de transdução e mecanismos de regulação. (Carga horária: 4h) - Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil. 2019.
- VIII. Bioinformática para a Identificação e Anotação de Non-coding RNAs. (Carga horária: 12h) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil. 2019.

PARTICIPAÇÃO NA ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

- I. XII Curso de Inverno de Genética. 2019
- II. VIII Simpósio do Programa de Pós-graduação em Genética. 2019
- III. REMendel 2019: Aprendendo e Ensinando Genética. 2019

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- I. XXXII Congresso Brasileiro de Genética Médica. 2021.
- II. AACR Virtual Annual Meeting I 2020. 2020.
- III. EDGE - Encontro Digital de Genética. 2020.
- IV. EGENE 2020 - 6º Encontro de Residentes e Geneticistas e 6º Interligas de Genética. 2020.
- V. ESMO Breast Cancer Virtual Meeting 2020. 2020.
- VI. Genética Viva!. 2020.
- VII. Oncodata: Aplicações da Ciência de Dados na Oncologia. 2020.
- VIII. The Allied Genetics Conference. 2020.
- IX. VI Simpósio Internacional de Câncer de Mama Oncologia D'Or. 2020.
- X. Workshop de metodologia científica - EDGE. 2020.
- XI. Workshop Sessão Clínica de Investigação Diagnóstica - EDGE. 2020.

- XII. 11^a SIEPE: Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2019.
- XIII. Escola Paranaense de Bioinformática. 2019.
- XIV. Genética 2019 - 65th Brazilian Congress of Genetics. 2019.
- XV. II Workshop: Reflexões Bioéticas na Genética Médica. 2019.
- XVI. Café com Ciência Bio-Rad. 2018.
- XVII. VII Jornada Científica Internacional do IOP: MoonShot Brasil Sul. 2018.
- XVIII. VI Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Genética.
- XIX. XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica, VII Congresso Brasileiro da SBTEIM e IV Congresso Brasileiro de Enfermagem em Genética e Genômica. 2018.

OUTROS

Fui Representante Discente no Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, durante o período de janeiro de 2019 a dezembro de 2019.