



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**



**ANDRESSA DE VASCONCELOS E SOUZA**

**Expressão dos genes da família NOX e seu significado  
clínico no câncer de mama**

**Rio de Janeiro**

**2020**

**ANDRESSA DE VASCONCELOS E SOUZA**

**Expressão dos genes da família NOX e seu significado  
clínico no câncer de mama**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Orientador: Rodrigo Soares Fortunato**

**Rio de Janeiro**

**2020**

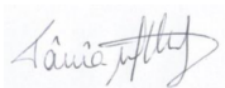
**“EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA NOX E SEU  
SIGNIFICADO CLÍNICO NO CÂNCER DE MAMA”**

**ANDRESSA VASCONCELOS E SOUZA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)


APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 31 DE MARÇO DE 2020.



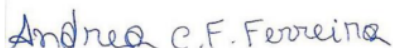
---

DRA. TANIA MARIA RUFFONI ORTIGA (DOUTOR – UFRJ)  
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISIOLOGIA



---

DR. RODRIGO SOARES FORTUNATO (DOUTOR – UFRJ) - ORIENTADOR



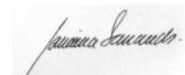
---

DRA. ANDREA CLAUDIA FREITAS FERREIRA (DOUTORA – UFRJ) - REVISORA



---

DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA – UFRJ)



---

DRA. JANAINDA FERNANDES (DOUTORA – UFRJ)



---

DR. LEONARDO FREIRE DE LIMA (DOUTOR – UFRJ)

Dedico essa dissertação a todos que participaram da minha construção como pesquisadora e ser humano.

## **Agradecimentos**

Assim como a célula não é uma ilha, o ser humano também não. Ao longo de toda vida, pessoas cruzam nosso caminho e deixam um pouquinho delas conosco. A vida acadêmica não é simples e muito menos fácil, mas ao lado de bons companheiros tudo se torna mais leve.

Ao meu Deus, por me dar vida, força, saúde e me sustentar desde o dia do meu nascimento.

Aos meus pais, Gláucia e Davi, por me proporcionarem todos os meios que eu precisei para chegar até esse ponto da jornada.

À minha irmã, Vanessa por sempre ser uma amiga em todos os momentos.

Ao meu orientador, Rodrigo Fortunato, por esses dois anos de muito ensino e paciência. Agradeço todos os dias por ter um orientador que se importa verdadeiramente com seus alunos e não somente com seus méritos acadêmicos. Tenho a certeza de que estou em ótimas mãos.

Aos amigos de pós-graduação do laboratório de Fisiologia e Sinalização Redox: Caroline, Cinthia, Íris Leonardo e Luiz. O meu muito obrigada por toda a ajuda quando solicitada e muitas vezes quando não solicitada. Pelas conversas diárias, sejam elas esquisitas ou não.

Aos alunos de iniciação científica que por muitas vezes me socorreram quando eu precisei.

À minha família, Kléber e Letícia. Obrigada pelos exemplos de amor durante todos esses anos. Ao meu esposo o meu obrigada por sempre me apoiar e me incentivar a crescer. A minha filha o meu obrigada por ser meu motor diário. Minha vida mudou quando você chegou e agradeço sempre por isso.

“A dúvida é o princípio da sabedoria. ”

**Aristóteles**

## Resumo

Souza, Andressa Vasconcelos. **Expressão dos genes da família NOX e seu significado clínico no câncer de mama.** Rio de Janeiro, 2020. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem como característica principal a proliferação aumentada das células. O câncer de mama é o mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas normalmente na célula e participam de inúmeros processos biológicos. Níveis elevados dessas moléculas são encontrados em diferentes tipos de tumor, incluindo o de mama. As NADPH oxidases (NOX) são enzimas que tem como função exclusiva a produção de ERO. Já se sabe que as NOX participam do processo de carcinogênese. Entretanto, o papel dessas enzimas no câncer de mama não é conhecido. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de genes da família NOX em diferentes subtipos de câncer de mama comparado ao tecido normal e seu papel na agressividade tumoral e sobrevivência dos pacientes. Para isso, foram utilizados dados de estudos depositados em plataformas *online* (cBioPortal, Kaplan-Meier Plotter e The Human Protein Atlas). Além disso, em células tumorais de mama MCF7 tratadas com diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol, avaliamos a produção de ERO pela sonda Amplex red (extracelular) e DCFH-DA (intracelular) e a expressão de NOX foi avaliada por qPCR. Comparando a expressão das diferentes isoformas das NOXs no tecido de mama normal, encontramos uma maior expressão de NOX2, NOX4 e DUOX1. Em seguida, comparamos a expressão de NOX entre o tecido normal e diferentes subtipos de câncer de mama. A expressão de NOX1, NOX2 e NOX4 foi maior nos tecidos tumorais, com exceção do subtipo basal em que a expressão de NOX4 foi menor. Por outro lado, os níveis de RNAm de DUOX1 foram menores nos subtipos de câncer de mama comparadas ao tecido normal. Avaliamos também se o *status* do receptor de estrogênio teria relação com a expressão de NOX. Os níveis de RNAm para NOX1, NOX2 e DUOX1 foram maiores em tecidos negativos para o receptor, enquanto os da NOX4 foram menores quando comparados aos que expressavam esse receptor. Também observamos maiores níveis de RNAm para NOX2, NOX4 e NOX5 conforme avanço dos estágios do tumor. Entretanto, menores níveis de expressão de NOX1 e DUOX1 nos estágios mais avançados do tumor foram encontrados. Pacientes com baixa expressão de NOX1, NOX4 e DUOX1 tiveram menor taxa de sobrevida comparados a pacientes com alta expressão dessas enzimas. No estudo *in vitro*, observamos aumento na produção extra (nas concentrações de 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M e 10<sup>-7</sup>M de estradiol) e intracelular (estradiol 10<sup>-8</sup>M e 10<sup>-7</sup>M) de ERO nas células tratadas com estrogênio. A exposição ao estrogênio também levou ao aumento na expressão de NOX2 (na dose de 10<sup>-7</sup>M de estradiol) sem diferenças significativas na expressão de NOX4 e DUOX1. Nossos dados sugerem que as isoformas de NADPH oxidases estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama. As diferentes isoformas podem ter papéis distintos nos subtipos de câncer, no estágio do tumor e também na sobrevivência dos pacientes.

Palavras-chave: Câncer de mama, NADPH oxidases, espécies reativas de oxigênio, agressividade tumoral.





## Abstract

Souza, Andressa Vasconcelos. **Expression of NOX family genes and their clinical significance in breast cancer.** Rio de Janeiro, 2020. Master's Dissertation in Biological Sciences (Physiology) - Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Cancer is a set of diseases whose main characteristic is the increased cellular proliferation. Breast cancer is the most prevalent type of cancer in women. Reactive oxygen species (ROS) are normally produced by cells, being involved in numerous biological processes. Higher levels of ROS have been found in different types of tumor, including breast cancer. NADPH oxidases (NOX) are enzymes that only function is ROS production. NOX are already known to participate in carcinogenesis. However, the role of these enzymes in breast cancer is not completely understood. Thus, the aim of this work was to evaluate the expression of NOX family genes in different breast cancer subtypes compared to normal tissue and their role in tumor aggressiveness and patient survival. For this, data from studies deposited on online platforms (cBioPortal, Kaplan-Meier Plotter and The Human Protein Atlas) were used. In addition, we evaluated the production of ROS by the Amplex red probe (extracellular) and DCFH-DA (intracellular), and the expression of NOX was evaluated by qPCR in MCF7 breast tumor cell line treated with different concentrations of 17 $\beta$ -estradiol. Online data show that in normal breast tissue NOX2, NOX4 and DUOX1 were highly expressed. We found a higher expression of NOX2, NOX4 e DUOX1 in normal breast tissue. Then, we compared NOX levels between normal tissue and different breast cancer subtypes. The expression of NOX1, NOX2 and NOX4 was higher in tumor tissues, with the exception of the basal subtype in which the expression of NOX4 was lower. On the other hand, DUOX1 mRNA levels were lower in breast cancer subtypes compared to normal tissue. We also evaluated whether the status of the estrogen receptor alters NOX expression. mRNA levels of NOX1, NOX2 and DUOX1 were higher in tissues negative for estrogen receptor, while NOX4 mRNA levels were lower when compared to those expressing this receptor. We also observed higher mRNA levels of NOX2, NOX4 and NOX5, in more advanced tumor stages, but NOX1 and DUOX1 mRNA levels were lower. Patients with low expression of NOX1, NOX4 and DUOX1 showed a lower survival rate compared to patients with high expression. In the in vitro study, we observed an increase in the extra (at concentrations of 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M and 10<sup>-7</sup>M estradiol) and intracellular (10<sup>-8</sup>M and 10<sup>-7</sup>M estradiol) production of ROS in cells treated with estrogen. Exposure to estrogen also led to an increase in NOX2 expression, with no significant differences for NOX4 and DUOX1 mRNA levels. Our data, suggest that the NOX isoforms can participate in the development of breast cancer. The different isoforms can have different roles in the cancer subtypes, in the tumor stage and in the patients' survival.

Keywords: Breast cancer, NADPH oxidases, reactive oxygen species, tumor aggressiveness.

**Lista de abreviações:**

**AKT** – proteína quinase B, do inglês *protein kinase B*

**AMPK** – proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina, do inglês *AMP-activated protein kinase*

**BRCA1** – gene do câncer de mama 1, do inglês *breast cancer 1*

**BRCA2** – gene do câncer de mama 2, do inglês *breast cancer 2*

**cDNA** – DNA complementar

**Cox** – ciclooxigenase

**DCFH-DA** – diacetato de 2', 7'-diclorofluorescina, do inglês *2',7'-Dichlorofluorescin Diacetate*

**DDR** – resposta ao dano no DNA, do inglês *DNA damage response*

**DMEM** – Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês *dulbecco's modified eagle medium*

**DNA** – ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

**DPI** – difenileniodônio, do inglês *diphenyleneiodonium*

**DUOX1** – dual oxidase 1

**DUOX2** – dual oxidase 2

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*

**eNOS** – óxido nítrico sintase endotelial

**ERO** – espécies reativas de oxigênio

**ER $\alpha$**  – receptor para estrogênio alfa, do inglês *estrogen receptors alpha*

**ER $\beta$**  – receptor para estrogênio beta, do inglês *estrogen receptors beta*

**ESR1** – gene para receptor de estrogênio 1, do inglês *estrogen Receptor 1 gene*

**ESR2** – gene para receptor de estrogênio 2, do inglês *estrogen Receptor 1 gene*

**GPx** – glutational peroxidase

**HBBS** – solução salina balanceada de Hank, do inglês *hank's balanced salt solution*

**HER2** – receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano, do inglês *human epidermal growth factor Receptor-type 2*

**HIF-1 $\alpha$**  – fator 1-alfa induzível por hipóxia, do inglês *hypoxia-inducible factor 1-alpha*

**HK2** – hexoquinase 2, do inglês *hexokinase 2*

**HRP** – enzima peroxidase de raiz forte, do inglês *horseradish peroxidase*

**mTOR** – alvo de mamíferos da rapamicina, do inglês *mammalian target of rapamycin*

**NAC** – n-acetilcisteína

**NOS** – óxido nítrico sintase, do inglês *nitric oxide synthase*

**NOX** – NADPH oxidase

**NOX1** – NADPH oxidase 1

**NOX2** – NADPH oxidase 2

**NOX3** – NADPH oxidase 3

**NOX4** – NADPH oxidase 4

**NOX5** – NADPH oxidase 5

**PBS** – tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*

**PFK1** – fosfofrutoquinase-1, do inglês *Phosphofructokinase-1*

**PFKFB3** – frutose-2,6-bifosfatase 3, do inglês *Fructose-2,6-Biphosphatase 3*

**PI3K** – fosfoinositídeo 3-quinase, do inglês *Phosphoinositide 3-kinases*

**PR** – receptor progesterona, do inglês *progesterone receptor*

**PRA** – gene para receptor de progesterona A, do inglês *progesterone receptor A gene*

**PRB** – gene para receptor de progesterona B, do inglês *progesterone receptor B gene*

**PRX** – peroxiredoxina

**PTEN** – homofosfatase e tensina, do inglês *phosphatase and tensin homolog*

**PTP-1B** – proteína-tirosina fosfatase 1B, do inglês *protein-tyrosine phosphatase 1B*

**RNA** – ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*

**RNAm** – RNA mensageiro

**SEER** – Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais, do inglês *Surveillance, Epidemiology and End Results*

**SERD** – reguladores negativos de receptores de estrogênio, do inglês *selective estrogen receptor degrader*

**SERM** – modulador seletivo de receptores de estrogênio, do inglês *Selective estrogen receptor modulators*

**SFB** – soro fetal bovino

**SOD** – superóxido dismutase

**TGF $\beta$**  – fator de transformação do crescimento beta, do inglês *transforming growth factor beta*

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1 Câncer</b> .....	1
<b>1.2 Espécies Reativas de Oxigênio</b> .....	3
<b>1.3 NADPH oxidases e câncer</b> .....	8
<b>1.4 Estrogênio</b> .....	11
<b>1.4.1 Estrogênio e seu papel fisiológico</b> .....	11
<b>1.4.2 Estrogênio e câncer</b> .....	12
<b>1.5 Mama</b> .....	14
<b>1.5.1 Fisiologia da mama</b> .....	14
<b>1.5.2 Câncer de mama</b> .....	15
<b>2. Objetivos</b> .....	21
<b>2.1 Objetivo geral:</b> .....	21
<b>2.2 Objetivos específicos:</b> .....	21
<b>3. Material e métodos</b> .....	22
<b>3.1 Análise da expressão de mRNA de NOX em tecidos normais</b> .....	22
<b>3.2 Comparação da expressão de mRNA de NOX em tecidos normais e tumorais de mama</b> .....	23
<b>3.3 Análise da sobrevivência de acordo com a expressão de NOX</b> .....	25
<b>3.4 Cultura de células</b> .....	25
<b>3.5 Geração extracelular de ERO</b> .....	25
<b>3.6 Geração intracelular de ERO</b> .....	26
<b>3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	27

3.7.1 Extração do RNA e síntese do cDNA .....	27
3.7.2 qPCR .....	27
3.8 Análise Estatística .....	28
4. Resultados .....	30
4.1. Expressão de NADPH oxidases em tecido de mama normal .....	30
4.2 Comparação dos níveis de mRNA da família NOX em tecidos normais e tumoriais de mama. ....	30
4.4 Diferença na expressão de genes da família NOX em diferentes estágios de desenvolvimento do tumor .....	35
4.6 Relação entre os níveis de RNAm para NOX e porcentagem de sobrevivência .....	36
4.7 Produção de ERO em células expostas ao estrogênio .....	37
4.8 Expressão de NOX em células MCF7 expostas ao estrogênio .....	38
5. Discussão .....	40
6. Conclusões .....	46
7. Referências .....	48

## 1. Introdução

### 1.1 Câncer

As células são rotineiramente expostas a fatores de estresse internos e externos, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e radiações ionizantes, que têm o potencial de induzir danos no DNA que podem ser reparáveis ou irreparáveis (PEARL et al., 2015). Esses danos no DNA podem levar a uma resposta na qual as células ativam pontos de verificação que impedem a progressão do ciclo celular e também ativam os mecanismos de reparo, para reparar completamente os danos ou prosseguir em direção à apoptose quando as lesões no DNA são muito graves e não conseguem ser reparadas. Portanto, essa resposta permite que as células preservem a estabilidade e integridade do genoma e continuem a replicação e transcrição (TIAN et al., 2014).

Câncer é a designação dada a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. Uma sequência de eventos moleculares e celulares compõe o complexo processo da carcinogênese que transformam uma célula normal em tumoral. As células tumorais adquirem características específicas como: permanente estímulo à proliferação, resistência à morte celular, inibição de supressores de crescimento, aquisição da capacidade de se replicar indefinidamente, indução da angiogênese e capacidade de invasão e metástase. Além dessas características, as células cancerosas possuem instabilidade genômica, reprogramação metabólica e fuga do sistema imunológico (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A fim de compreender melhor o processo de carcinogênese, pode-se dividi-lo didaticamente em três fases: iniciação, progressão e promoção (WEITZMAN; GORDON, 1990).

A iniciação é a primeira etapa da carcinogênese e tem como principais eventos as alterações genéticas irreversíveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Essas modificações genéticas podem ser alterações somáticas não-reparadas, que se propagaram nas células conforme sua proliferação, ou aberrações cromossômicas. Diversos fatores, sejam eles exógenos ou endógenos, podem agir como iniciadores desse processo, como por exemplo, a radiação ionizante. Outro possível agente iniciador são as ERO que podem

levar a quebras na fita de DNA ou mudanças oxidativas nas bases nitrogenadas (COOKE et al., 2003).

A promoção ocorre através da exposição a agentes promotores, que podem ser exógenos ou endógenos. Esse processo pode induzir a expansão e proliferação de células que foram iniciadas. Como os agentes promotores não são necessariamente mutagênicos, a exposição a eles pode levar a formação de tumores benignos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Assim como na iniciação, ERO também tem participação na promoção do câncer. Promotores químicos podem levar a um quadro de estresse oxidativo, enquanto moléculas antioxidantes podem inibir a promoção; portanto, as ERO parecem estar envolvidas na promoção. Ao vincular o estresse oxidativo à promoção, não se deve esquecer que outras biomoléculas que não o DNA, podem sofrer modificações oxidativas (COOKE et al., 2003). ERO tem conhecida função de diminuir a atividade de enzimas tirosinas-fosfatases como PTEN, que desfosforila os alvos fosforilados por PI3K, e PTP-1B e leva à hiperativação das vias de PI3K/AKT pela ausência da regulação inibitória destas enzimas. A ausência dessa regulação gera como consequência estímulos de proliferação e inibição de apoptose pela via PI3K/AKT. De fato, é amplamente relatado que mutações inativadoras em PTEN promovem tumorigênese em diversos modelos experimentais (CHALHOUB; BAKER, 2009).

A progressão tumoral tem como característica a transformação dos tumores benignos em malignos e é caracterizada por aumento da invasão, bem como da migração, angiogênese e instabilidade genética (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Para que um tumor gere metástase, este deve vencer a membrana basal, deixando sua localização primária e migrando até vasos sanguíneos ou linfáticos, por onde as células tumorais vão se disseminar e colonizar outros tecidos. A perda de adesão célula a célula, a sobrevivência após o descolamento da matriz, a capacidade migratória e a capacidade de romper a membrana basal são características críticas da metástase do tumor, e as ERO têm sido implicadas nesses processos (CHIANG; MASSAGUÉ, 2008). Por exemplo, em fibroblastos 3T3, mostrou-se que as ERO derivadas das enzimas NADPH oxidases (NOX), que tem como função exclusiva gerar superóxido ou peróxido de hidrogênio, levam à formação de protruções da



membrana plasmática dessas células. Estudos *in vitro* já demonstraram que essas protrusões auxiliam na migração e invasão celular (KARIYA et al., 2003). O tratamento com o antioxidante NAC (n-acetil-cisteína) ou DPI (cloreto de difenilenoiodônio) - um inibidor da família NOX - impediu a formação dessas protrusões na membrana plasmática (DIAZ et al., 2009). Uma importante característica de uma célula invasiva é a perda do seu caráter diferenciado e isso pode se dar através de um processo denominado transição epitélio-mesênquima. Neste processo, uma célula epitelial polarizada que normalmente interage com a membrana basal sofre modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, resistência a apoptose aumenta. Vários estudos demonstram que vias relacionadas a esse processo, como TGF $\beta$ /Smad, Snail, E-Caderina e  $\beta$ -catenina, podem ser ativadas por espécies reativas de oxigênio (HAORAH et al., 2007; SOSA et al., 2013).

Assim, podemos inferir que as espécies reativas de oxigênio têm participação em todas as etapas da carcinogênese.

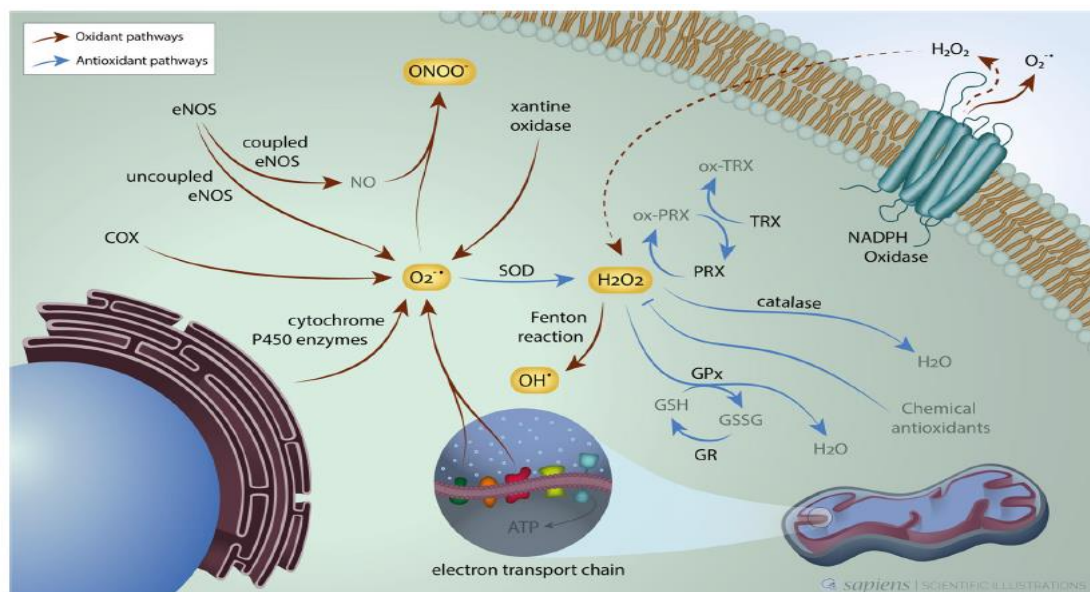
## 1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas derivadas do oxigênio molecular ( $O_2$ ) que possuem elétrons desemparelhados na última camada de valência. Essas moléculas podem ser radiculares [superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxil ( $\bullet OH$ ), peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ )] ou não radiculares, mas têm alta capacidade oxidante ou são facilmente convertidos em algum radical, como ácido hipocloroso (HOCl), ozônio ( $O_3$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MOLONEY; COTTER, 2018).

As ERO desempenham um papel importante no desenvolvimento de várias doenças humanas. Em baixas concentrações, as ERO levam a efeitos fisiológicos através da regulação de vias de sinalização intracelular; em níveis mais elevados, no entanto, essas moléculas podem levar ao dano oxidativo de proteínas, lipídios e DNA (ACHARYA et al., 2010). Existe um delicado equilíbrio entre a produção de ERO e sua detoxificação. Quando esse equilíbrio é quebrado, com aumento da produção e/ou redução da detoxificação, ocorre um

aumento da disponibilidade dessas moléculas, o que pode induzir danos ao DNA. Um aumento no dano do DNA pode levar à mutagênese e transformação celular, especialmente se combinado com mutações nas vias apoptóticas (KRYSTON et al., 2011).

A geração de ERO se dá por meio de uma sequência de reações. O superóxido é dismutado a peróxido de hidrogênio espontaneamente, principalmente em um pH baixo, ou através de uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Outros elementos da cascata da geração de ERO incluem a reação de superóxido com óxido nítrico para formar peroxinitrito, a formação de ácido hipocloroso catalisada por peroxidases, a partir de peróxido de hidrogênio e a reação de Fenton catalisada pelo ferro, levando à geração de radical hidroxila, que é altamente reativo (KLEBANOFF, 1980; THANNICKAL; FANBURG, 2000).



**Figura 1: Homeostase redox.** Vias de formação de ERO e sua detoxificação fisiológica na célula (Hecht et al, 2016).

A geração de superóxido pode se dar por diferentes vias, como citocromo p450, cadeia transportadora de elétrons, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), xantina oxidase e cicloxigenases (COX), bem como pelas NADPH oxidases, tendo a cadeia transportadora de elétrons a maior participação da geração de superóxido. Esse superóxido, gerado como um subproduto dessas vias, pode seguir dois caminhos: sofrer uma reação com óxido nítrico (NO), gerando peroxinitrito ou ser dismutado pela superóxido

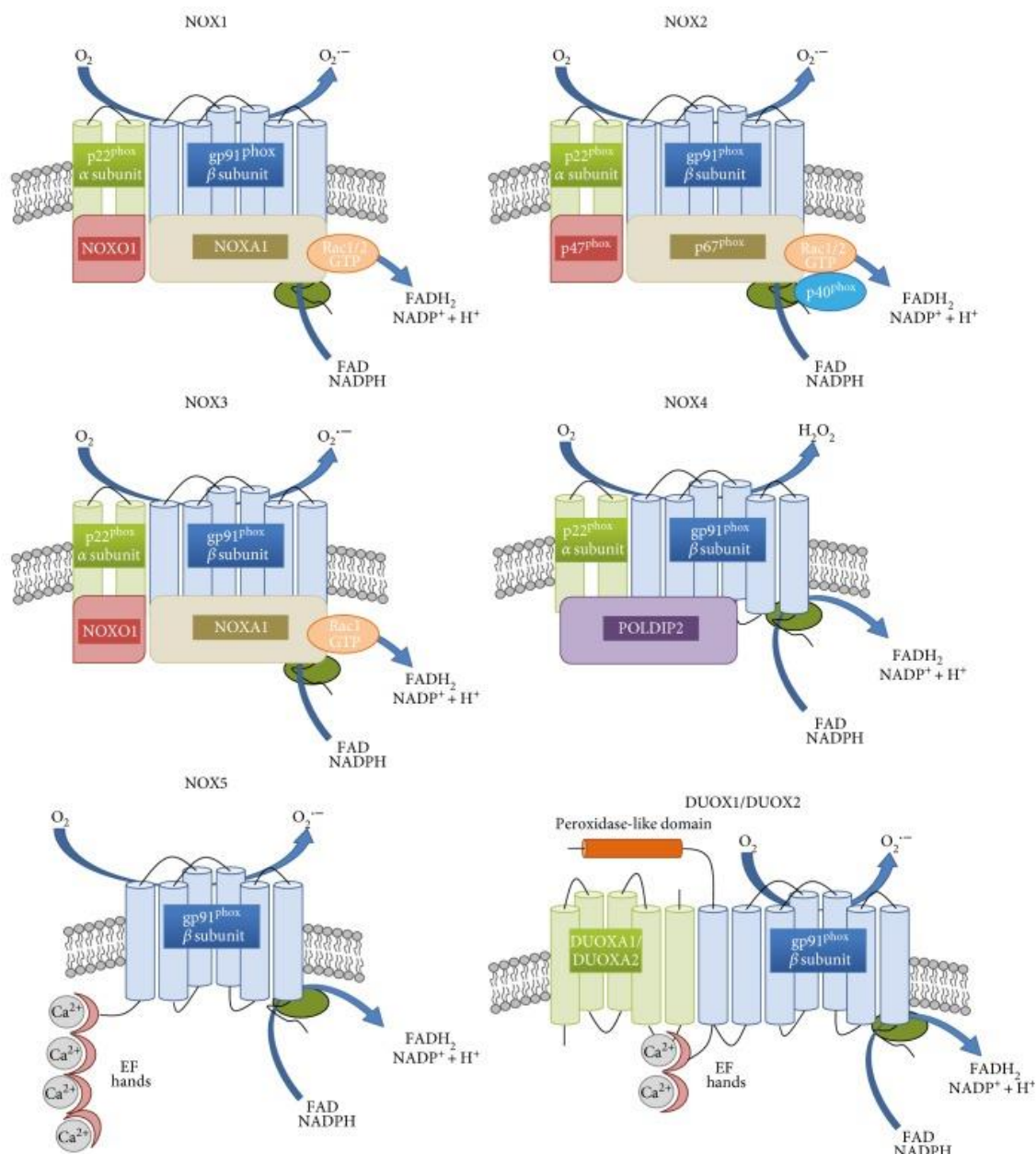
dismutase em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode ser detoxificado por enzimas como glutathione peroxidase (GPx), peroxiredoxina (PRX) e catalase e também por moléculas antioxidantes. Tanto o peróxido de hidrogênio como o superóxido podem ser formados diretamente por proteínas transmembranas denominadas NADPH oxidases (NOX) (Fig. 1) (HECHT et al., 2016).

A família NOX é composta por um grupo de proteínas transmembranares capazes de transportar elétrons através de membranas biológicas. Os elétrons provenientes do NADPH reduzem o oxigênio, convertendo-o a  $O_2^{\cdot -}$  ou  $H_2O_2$  (BEDARD; KRAUSE, 2007). As NOX e a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais são considerados as fontes principais de ERO nas células, embora outras fontes potenciais como citocromo p450, xantina oxidase (XO) ou óxido nítrico sintase (NOS) também contribuam para o potencial redox (ROY et al., 2015). Nos mamíferos, existem sete isoformas da família NOX: NOX1 a NOX5 e DUOX1 (oxidase dual 1) e DUOX2; no entanto, a NOX5 não é encontrada em roedores (HOLTERMAN et al., 2014). As NADPH oxidases podem ser encontradas em outros compartimentos além da membrana plasmática (NOX1–5 e DUOX1-2), como o retículo endoplasmático (NOX2, NOX4 e NOX5), membrana mitocondrial (NOX4) e membrana nuclear (NOX4 e NOX5) (BLOCK; GORIN, 2012; BUUL; et al., 2005; GRAHAM et al., 2010; HILENSKI et al., 2004).

Todo membro da família NOX encontra-se ancorado à membrana através de seis hélices transmembranares e tem quatro histidinas de ligação a heme (MEITZLER; BRANDMAN; ORTIZ DE MONTELLANO, 2010). O domínio C-terminal liga-se ao FAD/NADPH e permite a transferência de elétrons através do grupo heme para o oxigênio molecular (BLOCK; GORIN, 2012; BROWN; GRIENGLING, 2009; JACKSON et al., 2010). DUOX1, DUOX2 e NOX5 têm regiões de ligação ao cálcio em seu terminal N, o que as torna diferentes das outras NOX (AMEZIANE-EL-HASSANI et al., 2005; BÁNFI et al., 2004). NOX1, NOX2, NOX3 e NOX5 produzem  $O_2^{\cdot -}$ , enquanto NOX4, DUOX1 e DUOX2 geram diretamente  $H_2O_2$  (BROWN; GRIENGLING, 2009).

As NOX geralmente se encontram em seu estado inativo, e precisam de moléculas auxiliares para formar um complexo ativo. O complexo estável

NOX1–3 precisa da ligação de uma proteína de membrana chamada p22phox, proteínas citosólicas p47phox, p67phox (ou seus homólogos denominados NOXO1 e NOXA1, respectivamente), p40phox (apenas para NOX2) e ligação a proteína Rac1/2 (Fig.2) (DAHAN; SMITH; PICK, 2015; GEISZT, 2006; JACKSON et al., 2010; LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007; PETRY; WEITNAUER; GÖRLACH, 2010). O principal papel dessas subunidades é aproximar o FAD e o NADPH para auxiliar o transporte de elétrons (COUGHLIN, 2005). A NOX4 interage com o p22phox, mas não com as outras proteínas, logo, acredita-se que a NOX4 seja constitutivamente ativa e regulada no nível de expressão, ou a ativação pode ocorrer de uma maneira ainda desconhecida (AMBASTA et al., 2004; BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014; MARTYN et al., 2006).



**Figura 2: Estrutura das NADPH oxidases.** Representação esquemática da estrutura das enzimas NADPH oxidases e suas subunidades funcionais (SKONIECZNA et al., 2017).

A NOX2 foi identificada pela primeira vez em fagócitos. Estudos demonstram que a NOX2 é a isoforma de NOX mais amplamente distribuída em humanos, podendo ser encontrada em hepatócitos, linfócitos, neurônios, músculo esquelético, cardiomiócitos, entre outros (BEDARD; KRAUSE, 2007). A NOX1 é mais expressa no epitélio do cólon, mas também em outros tecidos, incluindo células endoteliais (AGO et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2004) e próstata (BÁNFI et al., 2000). A NOX4 foi originalmente identificada como sendo altamente expressa no rim entre outros tecidos (CHENG et al., 2001). A

NOX5 é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, linfonodos, ovário, pâncreas, placenta, baço, estômago, testículo, útero, músculo liso vascular e vários tecidos fetais (CHENG et al., 2001). DUOX1 e DUOX2 são expressos principalmente na tireóide e no epitélio respiratório (DONKÓ et al., 2005). Um resumo da expressão das NOX pode ser observado na tabela 1.

NADPH	Tecido com alta expressão	Outros tecidos em que são expressas
NOX1	Cólon	Músculo liso, endotélio, útero, placenta, próstata, osteoclastos
NOX2	Fagócitos	Linfócitos B, neurônios, cardiomiócitos, músculo esquelético, hepatócitos, endotélio, células-tronco hematopoiéticas, músculo liso
NOX3	Ouvido interno	Rim fetal, baço fetal, osso do crânio, cérebro
NOX4	Rim, vasos sanguíneos	Osteoclastos, endotélio, músculo liso, células-tronco hematopoiéticas, fibroblastos, queratinócitos, células de melanoma, neurônios
NOX5	Tecidos linfóide, testículos	Endotélio, músculo liso, pâncreas, placenta, ovário, útero, estômago, vários tecidos fetais
DUOX1	Tireoide	Epitélio das vias aéreas, epitélio da língua, cerebelo, testículo
DUOX2	Tireoide	Glândulas salivares e retais, epitélios gastrointestinais, epitélios das vias aéreas, útero, vesícula biliar, ilhotas pancreáticas

**Tabela 1:** Expressão de NADPH oxidases em diferentes tecidos. (BEDARD; KRAUSE, 2007).

### 1.3 NADPH oxidases e câncer

O papel das ERO na proliferação de células tumorais tem sido observado em diferentes trabalhos. Vários estudos têm mostrado o papel dessas moléculas na iniciação e também na manutenção de tumores por diferentes mecanismos. Um desses estudos mostrou que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno em baixa concentração promoveu a proliferação celular através do aumento dos níveis intracelulares de ERO (WANG et al., 2013). As ERO também funcionam como segundos mensageiros para regular várias vias de sinalização relacionadas a metástases (YANG et al., 2014). A principal fonte geradora de ERO é a cadeia transportadora de elétrons. Porém, particularmente nos tumores, as NADPH oxidases tem se mostrado cada vez mais importantes.

Um estudo avaliou a expressão de NOX em diferentes linhagens celulares tumorais. A expressão de NOX1 em níveis elevados foi observada em linhagens celulares de câncer de cólon e de pulmão. NOX2 foi expressa apenas em neoplasias hematopoiéticas. Uma alta expressão de NOX4 foi encontrada em linhagem celular de câncer de pele (M14) e também ovariano. Níveis intermediários a altos de expressão de NOX5 foram observados em células de melanoma, células de câncer de próstata e células de câncer de pulmão. Tanto DUOX1 quanto DUOX2 tiveram baixa expressão em todas as linhagens examinadas, exceto para algumas linhagens de câncer de pâncreas (ROY et al., 2015).

Em 2009, um estudo avaliou diferentes tecidos de câncer em busca de entender a diferença de expressão das NADPH oxidases. A expressão de NOX1 foi significativamente maior em cânceres de cólon em comparação ao intestino grosso adjacente. Os níveis de expressão do DUOX2 também foram mais altos em amostras de pacientes com câncer colorretal. NOX1 e NOX4 foram significativamente maiores em adenocarcinomas do estômago em comparação com tecido gástrico adjacente, a NOX4 foi elevado em certos tipos de câncer de ovário e os níveis de expressão de NOX4 e NOX5 foram intermediários ou altos em várias amostras de melanoma (JUHASZ et al., 2009).

Cada isoforma da família NADPH oxidase parece desempenhar papel diferente no processo carcinogênico. Por exemplo, NOX1 desempenha um papel importante na migração de células tumorais mediada por  $\alpha$ -integrinas (SADOK et al., 2008). As ERO produzidas pelo NOX4 podem levar a disfunção mitocondrial e danos no DNA mitocondrial (GRAHAM et al., 2010). Como a NOX4 também pode ser encontrado no núcleo, ela também pode ser responsável pela oxidação direta de proteínas nucleares e DNA (SPENCER et al., 2011). Além disso, os efeitos promotores de crescimento da NOX4 nas linhagens celulares de câncer de ovário e melanoma e da NOX5 no câncer de próstata e esôfago também foram descritos (HÖLL et al., 2016; SI et al., 2007; XIA et al., 2007; YAMAURA et al., 2009). Também foi demonstrado que NOX1 e 4 estimulam a angiogênese, uma característica muito importante para o crescimento do tumor, promovendo a geração de novos vasos sanguíneos e

melhorando o suprimento de oxigênio e nutrientes, que pode em parte estar associado à regulação positiva dependente da oxidação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BLOCK; GORIN, 2012; XIA et al., 2007).

Em 2001 houve a primeira citação referente à NADPH oxidase 5 (NOX5) e desde então a expressão de NOX5 tem sido amplamente estudada em diversos tipos de câncer ou células de linhagem de câncer, entre eles câncer de próstata, pancreático, mama, melanoma e outros (FU et al., 2006; ZHOU et al., 2011). Um estudo avaliou a expressão de NOX5 em diferentes tipos de câncer como cérebro, ovário, mama, próstata, melanoma e linfoma. Foi demonstrado que a expressão de NOX5 está aumentada nos tecidos tumorais em comparação aos tecidos normais, levando a uma hipótese de que a NOX5 pode ter uma função significativa no desenvolvimento e na manutenção do tumor (ANTONY et al., 2013).

Células de câncer de mama SK-BR-3 silenciadas para NOX5 apresentaram diminuição na sua proliferação, assim como uma inibição do seu potencial de invasão e migração. Células com inibição de NOX5 tiveram sua produção intracelular de ERO diminuída. A inibição de NOX5 *in vivo* mediada por um anticorpo reduziu significativamente o surgimento de câncer, assim como o tamanho dos tumores. Por outro lado, uma alta expressão de NOX5 aumentou a chance de desenvolvimento do tumor na mama (DHO et al., 2017).

Recentemente, também foi demonstrado que a perda da expressão de DUOX1 em linhagens celulares de câncer de pulmão foi associada à perda do marcador epitelial E-caderina e que o silenciamento de DUOX1 promoveu características de uma transição epitelial para mesenquimal (EMT), uma característica fundamental do câncer metastático (LITTLE et al., 2016). Além disso, foi descoberto que as enzimas DUOX mantêm constitutivamente os níveis de ERO nas células do câncer de próstata e promovem a sinalização de AKT, levando ao aumento da resistência à apoptose (REYA; et al., 2001).



## 1.4 Estrogênio

### 1.4.1 Estrogênio e seu papel fisiológico

As três principais formas de estrogênio em humanos são estradiol, estrona e estriol, sendo o estradiol a forma mais abundante (CASARINI et al., 2017; LEBLANC et al., 2017). O ovário é a principal fonte de estrogênio no período pré-menopausa, e as células da granulosa são as células responsáveis pela produção de estrogênio (LIU et al., 2017; TSUI et al., 2017).

Estas formas de estrogênio desempenham um papel importante no controle da reprodução em fêmeas e em machos, nestes com menor grau de importância. Além disso, concentrações fisiológicas de estrogênio são essenciais para a manutenção do crescimento celular de determinadas células como células do músculo liso do útero e células de mama, e outras atividades biológicas como, por exemplo, o controle do ciclo menstrual (GARCIA; WALKER; ZOELLNER, 2018).

Em 1896, ainda não se tinha ciência sobre os hormônios. Um pesquisador, no entanto, verificou que mulheres que tinham tumor na mama e posteriormente retiravam seus ovários, comumente entravam no processo de remissão do tumor (BEATSON, 1896). Hoje é possível estabelecer que depois da estimulação com estrogênio ocorrem mudanças na expressão gênica, indicando que o receptor de estrogênio atua como um fator de transcrição (PENG; SENGUPTA; JORDAN, 2012).

Embora o ER $\alpha$  seja essencial para a função normal da glândula mamária, nem todos os diferentes tipos de células da glândula mamária expressam o receptor de estrogênio. Este ponto pode ser observado pelo fato de que em um dado momento apenas uma porção de células em um ducto mamário expressa o ER $\alpha$  (SMITH, 2005). Durante o desenvolvimento da glândula, por exemplo, as células na ponta dos ductos em crescimento não expressam o ER $\alpha$ . Em um estudo realizado com os camundongos *knockout* para ER $\alpha$ , transplantou-se os ductos que não se desenvolveram, provenientes do camundongo *knockout* para ER $\alpha$ , na camada gordurosa da mama de um camundongo selvagem e foi observado que os ductos transplantados foram capazes de crescer (BOCCHINFUSO et al., 2000; HEWITT; COUSE;

KORACH, 2000). Logo, isso indica que a presença do ER $\alpha$  nas células da camada adiposa do camundongo normal é suficiente para estimular o desenvolvimento dos ductos, mesmo que essas células não tenham o ER $\alpha$ .

Assim como foi feito com o ER $\alpha$ , um camundongo *knockout* para ER $\beta$  foi gerado. Este estudo evidenciou que as glândulas mamárias desses camundongos são totalmente normais, sugerindo que o ER $\beta$  não tem papel crucial no desenvolvimento normal da mama (ANTAL et al., 2008).

#### 1.4.2 Estrogênio e câncer

Dentre os diferentes tipos de câncer mais comuns nas sociedades ocidentais, muitos ocorrem em tecidos que respondem a hormônios, incluindo mama, endométrio e ovário em mulheres e próstata em homens. Esses cânceres têm sido associados eventualmente à exposição a hormônios esteróides sintéticos ou endógenos ou mesmo aos seus metabólitos (MØRCH et al., 2017).

O estrogênio tem um importante papel da produção de ERO. O metabolismo do estrogênio pode levar à formação de ERO devido à sua metabolização a catecol e semi-quinonas, que gera ERO como subproduto (PENG et al., 2010).

As mitocôndrias participam da geração de mais de 90% de energia da célula, através da fosforilação oxidativa, e simultaneamente ocorre a produção de ERO como subproduto da reação principal. Como o estrogênio está associado a uma alta proliferação celular, a exposição a esse hormônio leva a um aumento do metabolismo celular e conseqüentemente da atividade mitocondrial, levando a um aumento de ERO (CHEN et al., 2004). A ativação dos ERs não apenas afetam a bioenergética mitocondrial, mas também iniciam o processo de instabilidade genômica do DNA mitocondrial envolvido em processos metastáticos (TAN; BAI; WONG, 2002). Além disso, essas ERO produzidas em maior quantidade aceleram ainda mais a mutação de proto-oncogenes, resultando na progressão do tumor (WALLACE, 2005).

Moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), reguladores negativos (SERDs) e inibidores de aromatase são os primeiros tratamentos utilizados para tumores ER+ (PAN et al., 2017). Entretanto, um terço de todos os tumores de mama ER+ em algum momento desenvolve resistência a esses tratamentos. Os clones capazes de invadir e gerar metástase que são resistentes a medicamentos vão sendo selecionados quando os tumores reprogramam seu metabolismo para se adaptarem à má perfusão, privação transitória de nutrientes e aumento da acidez. Além disso, a maneira como o tumor se reprograma define o órgão que sofrerá com a metástase das células de câncer de mama; por exemplo, quando vias de proteína quinase B (AKT) são ativadas, foi possível observar metástases específicas no fígado, enfatizando a importância de adaptações únicas da via metabólica nas células cancerosas (DUPUY et al., 2015). As enzimas que atuam na glicólise geralmente estão desreguladas e podem ser alvos potenciais em tumores recorrentes da mama. A frutose-2,6-bisfosfatase 3 (PFKFB3) é um ativador da fosfofrutoquinase-1 (PFK1), o principal regulador da segunda etapa da glicólise. Vários grupos demonstraram que o direcionamento ao PFKFB3 pode ser uma estratégia potencial para superar a resistência endócrina (TRENTI et al., 2017; YANG; HOU, 2017). A inibição da hexoquinase-2 (HK2), que facilita a primeira etapa da glicólise, está associada ao crescimento retardado de tumores mamários resistentes ao tamoxifeno, que é um antagonista de receptor de estrogênio. A hiperativação do fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) via modulação das vias de sinalização AKT, alvo de mamíferos da rapamicina (mTOR) e/ou proteína quinase ativada por AMP (AMPK) contribui para a resistência ao tamoxifeno (WOO et al., 2015). Esses dados mostram que existe uma resistência endócrina e ela pode ser causada através de múltiplos mecanismos que aumentam o fluxo glicolítico nos tumores de mama.

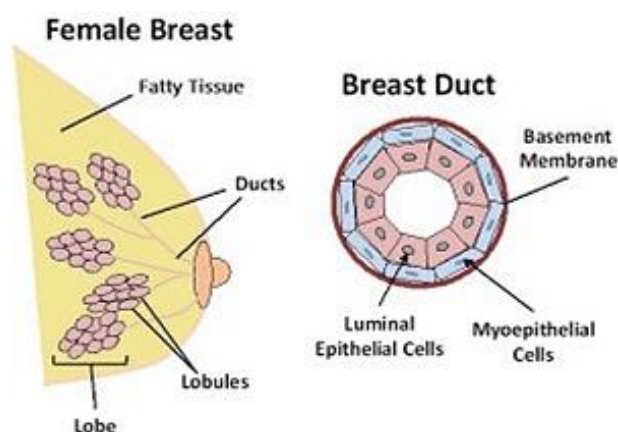
Como vários desses fatores de risco conhecidos estão diretamente relacionados aos níveis endógenos de estrogênio, o efeito dos estrogênios na carcinogênese da mama chama muita atenção, com evidências sugerindo que os estrogênios desempenham um papel importante do desenvolvimento do câncer de mama (ALTHUIS et al., 2004).

## 1.5 Mama

### 1.5.1 Fisiologia da mama

A glândula mamária é um órgão dinâmico, que começa a se desenvolver no embrião através de trocas de sinais entre as células epiteliais ventrais e as células mesenquimais subjacentes (FU; LINDEMAN; VISVADER, 2014).

A glândula mamária é um tecido secretório que possui um sistema extensivamente ramificado de ductos epiteliais, terminando em múltiplos alvéolos ou estruturas acinares (Figura 3). Duas camadas de epitélio estão presentes na mama. Uma camada interna, composta por células luminais, e uma camada externa, composta por células basais ou mioepiteliais. As células mioepiteliais envolvem as células epiteliais luminais nos ductos e essas estão em contato com uma membrana basal que é rica em laminina e colágeno IV. Já nos alvéolos, as células epiteliais e mioepiteliais entram em contato com a membrana basal. O leite é produzido pelas células luminais secretórias nos lóbulos, enquanto a contração muscular lisa das células mioepiteliais ductais e lobulares é responsável pela liberação do leite (MACIAS;; HINCK, 2012; VISVADER; STINGL, 2014).



**Figura 3: Estrutura anatômica da glândula mamária.** Adaptado de *life line cell technology*, 2015.

Na gravidez, a glândula mamária sofre uma extensa ramificação lateral e ocorre desenvolvimento do alvéolo em preparação para a lactação. Quando há interrupção da lactação acontece um processo chamado involução. A glândula

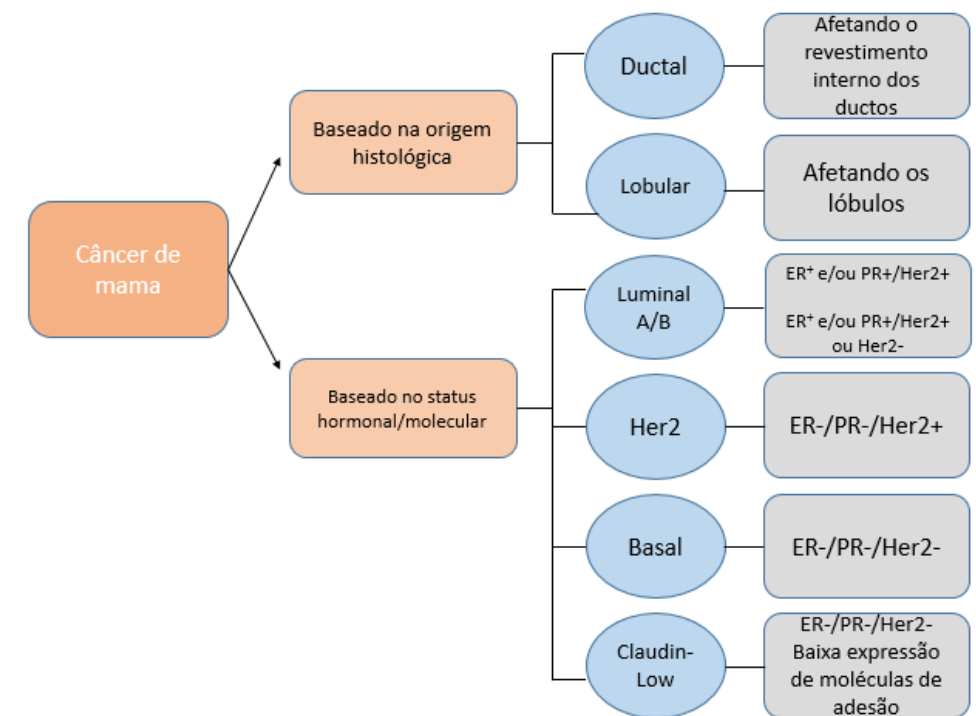
regredir para um estado anterior, que se assemelha à glândula virgem ou nulípara. As células epiteliais da glândula mamária têm uma grande plasticidade. Essa é influenciada pelos hormônios ovarianos (por exemplo, estrogênio, progesterona) e hipofisários (por exemplo, prolactina), bem como por fatores de crescimento produzidos localmente que também são regulados por hormônios e podem ser expressos nas células epiteliais do estroma, adipócitos, mastócitos ou macrófagos (RANGEL et al., 2012).

### **1.5.2 Câncer de mama**

O câncer mais comum em mulheres é o câncer de mama sendo uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer em mulheres (FERLAY et al., 2010). Na maioria dos casos, os tumores de mama apresentam expressão de receptores de estrogênio e progesterona, hormônios que levam ao crescimento e à proliferação das células tumorais (RHODES et al., 2000).

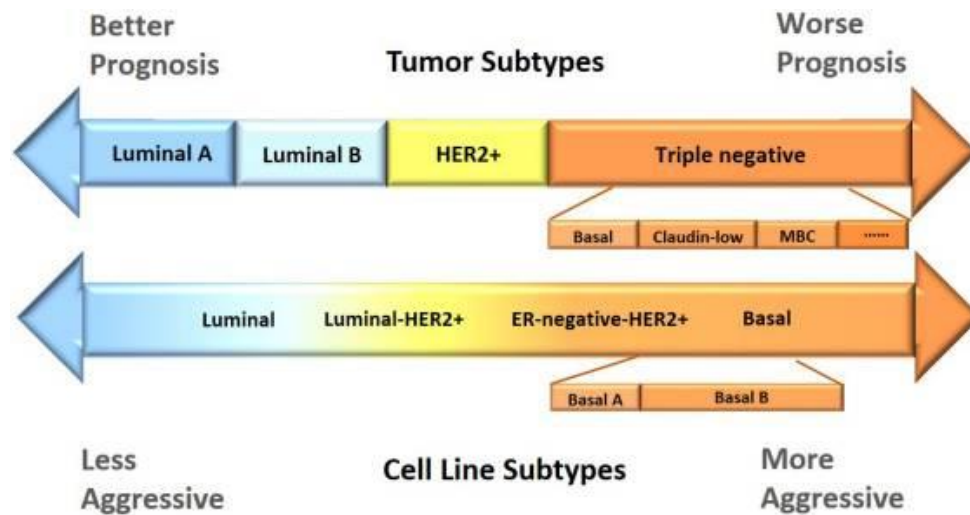
O câncer de mama é uma doença complexa com alto grau de heterogeneidade tumoral. O tipo de câncer de mama pode ser classificado com base principalmente na expressão dos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Certamente o estabelecimento desses marcadores moleculares auxilia no tipo de terapia que cada paciente pode receber. Essa terapia pode ser direcionada de forma mais específica. Avanços tecnológicos revelaram maior complexidade com o surgimento de cinco subtipos moleculares diferentes (Luminal A, luminal B, Her2 enriquecido, basal e normal), com base nos genes que são expressos (PEROU et al., 2000). Estudos de expressão gênica de diversos genes relacionados à progressão tumoral, resposta hormonal e dos principais fatores preditivos, como ER, PR e Her2 originaram os subtipos hoje conhecidos: basal (triplo-negativo, ou seja: Her2-, ER-, PR-), Her2-superexpresso (Her2+, ER-, PR-), luminal A (Her2+, ER+ e/ou PR+), luminal B-Her2 positivo (Her2+, ER+ e/ou PR+), luminal B-Her2 negativo (Her2-, ER+ e/ou PR+). Recentemente, foi adicionado à lista mais um subtipo classificado como Baixa-Claudina, também triplo-negativo

(Her2-, ER-, RP-), mas que se diferencia do basal pela expressão de várias proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima como: claudina3/4/7<sup>baixo</sup>, vimentina<sup>alto</sup>, e-caderina<sup>baixo</sup> (HOLLIDAY;; SPEIRS, 2011; PRAT et al., 2010) (Fig.4)



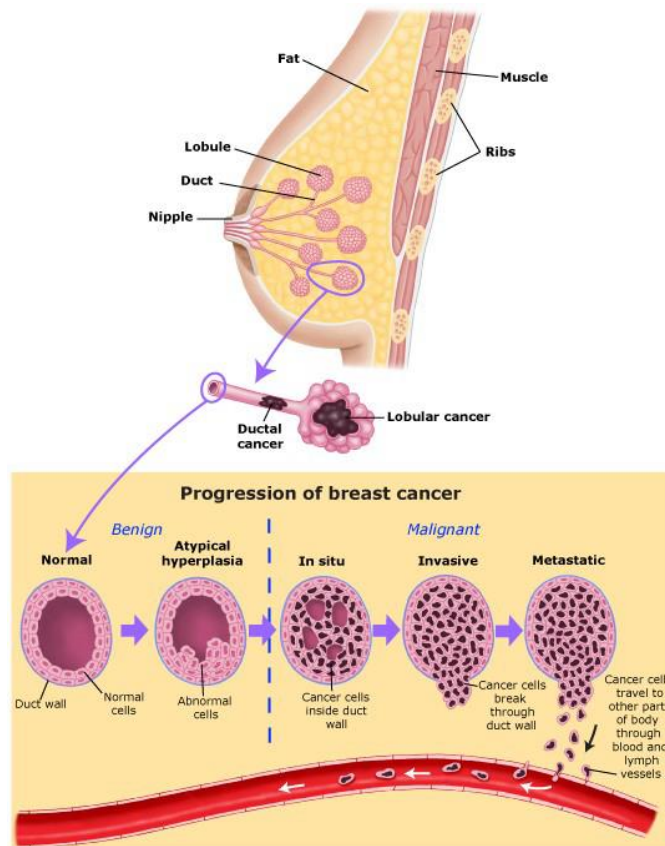
**Figura 4:** Classificação câncer de mama baseado em sua origem histológica e no *status* hormonal/receptor.

Estes subtipos predizem uma diferença muito expressiva na sobrevida global e sobrevida livre de doença dos pacientes por eles acometidos, sendo o basal relacionado à menor sobrevida e o luminal A, a maior (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008) (Fig.5).



**Figura 5:** Prognóstico dos diferentes subtipos de câncer de mama. (DAI et al., 2017)

O tumor pode ser classificado como não invasivo (*in situ*) ou invasivo, levando em consideração se o tumor rompeu a membrana basal e invadiu outros tecidos. Os carcinomas invasivos são tumores em que as células alteradas se difundem para os tecidos conjuntivos circundantes e levam a metástase em órgãos distantes. Cerca de dois terços dos carcinomas de mama são provenientes de células epiteliais dos ductos, chamado de carcinoma ductal, e cerca de um terço provêm dos lóbulos, chamado de carcinoma lobular (MALHOTRA et al., 2010; RUSSNES et al., 2017) (Fig.6).



**Figura 6: Desenvolvimento do câncer de mama.** Progressão de câncer de mama ductal. O câncer pode ser manter *in situ* (no próprio tecido) ou adquirir capacidade invasiva e levar a metástase (<https://www.saintjohnscancer.org/breast/breast-cancer/types-of-breast-cancer/>).

Os mecanismos moleculares pelos quais o estrogênio se liga ao seu receptor já são estabelecidos. O estradiol se difunde através da membrana plasmática da célula epitelial da mama e se liga ao seu receptor que se encontra no núcleo. Isso provoca uma mudança na conformação do receptor e o estradiol ligado ao seu receptor forma dímeros com outros receptores, levando à ativação de genes que respondem ao estrogênio. Existem duas formas diferentes do ER,  $\alpha$  e  $\beta$ , que são codificadas por dois genes diferentes, ESR1 e ESR2, respectivamente. A progesterona se liga ao seu receptor nuclear de maneira muito similar ao estrogênio. Assim como o ER, o receptor é expresso em duas isoformas diferentes, PRA e PRB. Contudo, diferentemente do ER, essas isoformas são geradas pelo mesmo gene PR, a diferença entre os receptores é que PRA é uma forma truncada de PRB (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005).



Pacientes mais jovens têm maior probabilidade de serem ER-negativos (ER-) em comparação com pacientes mais velhos (CHU; ANDERSON, 2002). Há também uma grande variação geográfica na proporção de cânceres de mama ER positivos (ER+), existindo maior chance de ser ER+ nos países ocidentais desenvolvidos e menor nos países em desenvolvimento. Em Hong Kong (China), nas mulheres com câncer de mama o ER+ foi observado em 53 e 61,6% das mulheres na pré e pós-menopausa com câncer de mama, respectivamente, enquanto a presença PR+ foi encontrada em 51,5 e 46,2% das mulheres na pré e pós-menopausa, respectivamente. Esses valores são menores comparados aos observados nos EUA, onde os registros de câncer do *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) relataram uma taxa global de ER+ de 77% e taxa de PR+ de 66% (DUNNWALD; ROSSING; LI, 2007). Até no mesmo país, a taxa de ER+ pode variar entre diferentes grupos étnicos, como foi observado nos EUA, onde foi demonstrado que os americanos negros têm maior propensão a serem ER- em comparados aos caucasianos americanos (RICHARDSON et al., 2005). Em um país asiático multiétnico, os malaios eram mais propensos a serem ER- quando comparados aos chineses e indianos (YIP et al., 2011).

Embora o *status* de ER seja essencial para a tomada de decisão sobre o melhor tratamento a ser adotado, o papel do PR é menos bem definido (OLIVOTTO; et al., 2004). Mulheres com câncer de mama ER+ que foram tratadas durante 5 anos com tamoxifeno adjuvante, que é um modulador seletivo do receptor de estrogênio, apresentaram uma redução na taxa anual de mortalidade por câncer de mama em 31%, independentemente do uso de quimioterapia ou da idade (ABE et al., 2005). Além disso, existem também evidências clínicas de que o câncer de mama ER+ PR+ responde ao tamoxifeno melhor que os cânceres de mama ER+ PR- (ARPINO et al., 2005; CUI et al., 2005), levando a uma proposta de que a falta de expressão de PR nos tumores ER+ pode ser um marcador molecular para o crescimento anormal do tumor, que pode auxiliar para que aconteça uma resistência ao tamoxifeno. Logo, a diminuição dos níveis de estrogênio através da utilização de inibidores da aromatase em mulheres na pós-menopausa pode ser o melhor tratamento para pacientes com esses tumores (ARPINO et al., 2005).

Cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama fazem parte da estatística de tumores com alteração no DNA, resultante de mutações, alteração do padrão de expressão, amplificação e metilação em genes de alta suscetibilidade à penetração, que de maneira geral contribuem para a regulação da resposta ao dano no DNA (DDR) ou do ciclo celular. Mesmo com todo esforço para a identificação dos genes de suscetibilidade ao câncer de mama, somente 30-50% dos casos hereditários de câncer de mama podem ser explicados por alterações em genes específicos. Isso pode ser explicado por um impacto misto de genes não identificados, múltiplos genes de baixa penetração e novos genes de alta penetração, levando a um maior risco de câncer de mama. Logo, genes e proteínas envolvidos na DDR e na manutenção da estabilidade e integridade do genoma são bons candidatos como fatores de risco controlados e como genes de susceptibilidade provável para cânceres de mama familiares e esporádicos (ABE et al., 2005).

Até o momento, múltiplos fatores de risco adicionais para câncer de mama foram identificados. Alguns fatores de risco não podem ser alterados, como idade, mutações nos genes para câncer de mama 1 (BRCA1) 2 e (BRCA2), histórico familiar, histórico reprodutivo e altas doses de radiação na mama. Outros são potencialmente modificáveis, como estrógenos endógenos elevados, terapia hormonal, obesidade e consumo de álcool (HULKA; MOORMAN, 2001).

Visto que as ERO têm sido associadas a diferentes tipos de câncer, é necessário que avaliação da expressão de NADPH oxidases seja melhor elucidada também no câncer de mama. Além disso, como o estrogênio parece ter efeito no desenvolvimento de câncer de mama, também é importante avaliar seus mecanismos de ação e sua possível via na carcinogênese mamária.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral:**

Avaliar a expressão de genes da família NOX e seu significado clínico no câncer de mama

### **2.2 Objetivos específicos:**

Utilizando plataformas e programas com dados de genômica de câncer, avaliar:

- Nível de expressão das NOX em tecido de mama normal;

- Nível de expressão de cada NOX nos diferentes subtipos de câncer de mama, comparando com o tecido normal;
- Relacionar o nível de expressão das NOX com a sobrevivência dos pacientes, estágio do tumor e *status* do receptor de estrogênio.

Em células de linhagem tumoral de mama MCF7, tratadas ou não com 17- $\beta$  estradiol, avaliar:

- A geração extracelular e intracelular de ERO;
- A expressão de mRNA de NOX.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1 Análise da expressão de mRNA de NOX em tecidos normais**

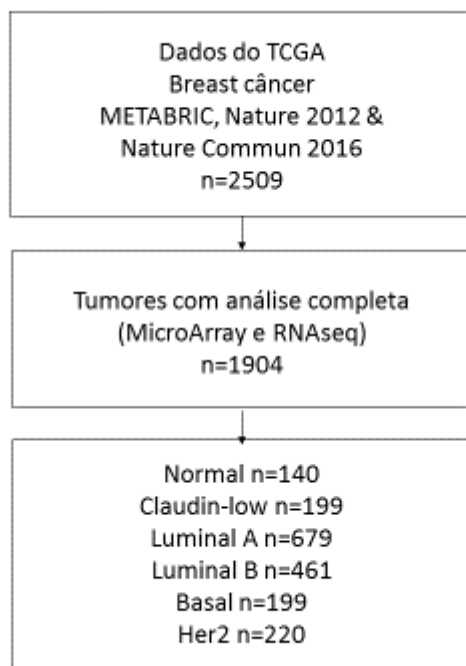
Todos os dados de bioinformática analisados utilizaram duas técnicas para avaliação dos níveis de expressão de RNA mensageiro: RNA Seq e microarray. Para cada análise realizada somente um estudo foi utilizado, evitando análises com técnicas diferentes e possíveis diferenças nas expressões de RNA avaliadas.

O banco de dados *The Human Protein Atlas* (HPA) (<https://www.proteinatlas.org>) fornece dados de transcriptoma e proteoma em

tecidos humanos específicos e consiste em Atlas de Tecidos, Atlas de Células e Atlas de Patologia. Nosso objetivo era de avaliar as NOX em tecido normal então utilizamos o Atlas de Tecidos. Genes individuais (NOX1, CYBB (NOX2), NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2) foram avaliados na plataforma, que permite a avaliação dos genes de interesse em diferentes tecidos do corpo. Nós avaliamos os genes de interessa na mama. Todos os dados quantitativos de transcriptoma (RNA-Seq) foram recuperados do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA). Um total de 290 amostras de mama normal foi analisado. Os dados foram baixados do Atlas de tecidos e replotados no *Graphpad Prism software*.

### **3.2 Comparação da expressão de mRNA de NOX em tecidos normais e tumorais de mama**

O *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) é um grande banco de dados que contém informações de diferentes tipos de câncer humano. A alteração do status dos genes NOX em pacientes com câncer de mama foi obtida através da ferramenta de análise online cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>). Foi possível obter o perfil de expressão das NOX de diversos tipos de câncer de mama humanos e tecidos normais utilizando o seguinte estudo: METABRIC (NATURE, 2012 e NATURE COMMUNICATIONS, 2016), contendo 1904 amostras de pacientes que tiveram suas amostras de tecido mamário avaliados (Fig. 7).



**Figura 7:** Fluxograma referente aos dados do estudo disponíveis no TCGA.

Com a plataforma online cBioPortal foi possível analisar a expressão de mRNA de todas as NOX comparando diferentes tipos de câncer de mama com o tecido normal. Também foi possível avaliar a expressão nos diferentes estágios do tumor. A correlação do *status* do receptor de estrogênio também foi avaliada. Os dados foram baixados em forma de texto e plotados no *Graphpad Prism software*.

Estágio do tumor	0	1	2	3	4
Tamanho do tumor	Muito pequeno	Menor do que 2cm	Entre 2-5cm	Maior que 5cm	Qualquer tamanho
Capacidade de invasividade	In situ	In situ	In situ	In Situ	Invasivo

**Figura 8:** Classificação dos estágios do tumor

### 3.3 Análise da sobrevivência de acordo com a expressão de NOX

A significância do prognóstico em pacientes com câncer de mama com diferentes níveis de expressão de isoformas NOX foi realizada por meio do banco de dados Kaplan – Meier (<http://kmplot.com/analysis/>). A plataforma permite a avaliação dos genes de interesse em diferentes tipos de câncer. O banco de dados para câncer de mama foi estabelecido usando dados de expressão gênica e informações de sobrevivência de 876 pacientes. Genes individuais (NOX1, CYBB (NOX2), NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2) foram avaliados na plataforma. Para avaliação da relação entre expressão de NOX no tecido mamário e sobrevivência dos pacientes, os resultados foram divididos pela própria plataforma em 2 grupos, de acordo com a expressão mediana do gene da NOX em questão (alta vs. baixa expressão). A sobrevivência dos pacientes dos dois grupos foi então analisada através do gráfico de sobrevivência de Kaplan – Meier. O valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

### 3.4 Cultura de células

Foram utilizadas células de linhagem tumoral humana de mama MCF7 (subtipo luminal B). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sem vermelho de fenol e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina estreptomicina (2%), todos fornecidos pela Sigma-Aldrich Corporation, e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram expostas previamente a um meio de *starving* contendo 10% de soro livre de hormônios esteroides por 48 horas. Após o *starving*, as células foram expostas a diferentes concentrações de estrogênio (10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-8</sup>M e 10<sup>-9</sup>M), por 72 horas. 10<sup>-7</sup>M é a dose considerada fisiológica.

### 3.5 Geração extracelular de ERO

A geração extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurada utilizando o método Amplex Red/HRP (Molecular Probes, Invitrogen), que detecta o acúmulo de

produtos oxidados fluorescentes no meio de reação. Nesse método, o Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) é oxidado por uma peroxidase, que usa o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado pelas células como co-fator, originando um produto fluorescente chamado resorufina. A fluorescência emitida ao longo do tempo pela produção de resorufina foi analisada com um leitor de microplacas (Victor X5; PerkinElmer), usando feixes de excitação de 570nm e emissão de 590 nm. Nestes experimentos, após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 2000xg durante 5 minutos, ressuspensas e contadas. Após a contagem,  $1 \times 10^5$  células foram transferidas para uma placa de 96 poços branca e opaca, juntamente com o meio reacional composto por 1 mg/mL de D-glicose (Merck KGaA), 100 U/mL de superóxido dismutase (SOD) (Sigma-Aldrich Corporation), 0,5 U/mL de peroxidase de raiz forte (HRP) (Roche), 50  $\mu\text{M}$  do reagente Amplex Red<sup>TM</sup> (Molecular Probes, Invitrogen) e com ou sem 2  $\mu\text{M}$  ionomicina (Sigma-Aldrich Corporation), que é um ionóforo de cálcio e permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior das células. Esta reação ocorreu a 37°C e a fluorescência resultante da reação foi monitorada por 150 repetições de leitura da placa. A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi quantificada pela análise do coeficiente angular da curva formada por cada amostra em relação a uma curva de calibração padrão e expressa na unidade de nanomoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por hora por  $1 \times 10^5$  células ( $\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{h}/10^5$  células).

### 3.6 Geração intracelular de ERO

O CM-H2DCF-DA (Molecular Probes by Life Technologies) é um éster lipofílico não-fluorescente que é capaz de atravessar a membrana plasmática e pode, no citosol, ser clivado por esterases inespecíficas dando origem a, entre outros produtos, o produto não-fluorescente H2DCF (dihidrodiclorofluoresceína), que se torna incapaz de atravessar a membrana. A conversão do H2DCF ao composto fluorescente DCF (2'7'-diclorofluoresceína) ocorre através de uma reação oxidativa provocada pela presença de ERO no meio. Deste modo, a intensidade de fluorescência observada refletirá a quantidade de ERO dentro da célula naquele dado momento (KARLSSON et al., 2010). A fluorescência emitida foi avaliada por citometria de fluxo. Para tanto, após o tratamento, as células foram lavadas com Hank's Balanced Salt



Solution (HBBS, GIBCO®) e a adesão na placa foi perdida usando tripsina-EDTA por 5 min a 37°C. Em seguida, adicionou-se HBSS contendo 10% soro fetal bovino para inativar a ação da tripsina. As células ressuspensas foram transferidas para tubos eppendorf de 2 mL, e então centrifugados a 2000xg por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 400 µL de meio DMEM (0,2% de FSB) sem fenol contendo o CM-H2DCF-DA (Molecular Probes by Life Technologies), na concentração final de 10 µM por 30 minutos a 37°C. Então, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 200 µL de PBS. Após o período de incubação, as células tiveram sua intensidade de fluorescência quantificadas no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™/BD Biosciences – Plataforma de Imunoanálise, IBCCF/UFRJ), sendo o comprimento de onda de excitação 510 nm e o de emissão 580 nm. Durante o experimento foram registrados pelo menos 10.000 eventos em cada replicata.

### **3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

#### **3.7.1 Extração do RNA e síntese do cDNA**

O RNA total foi extraído das células MCF7 utilizando o kit de extração RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA total extraído foram avaliadas no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Após a extração, a integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (1%). A reação de transcrição reversa foi feita com 2 µg de RNA total utilizando o kit High Capacity Reverse Transcription® (Life Technologies), seguindo também as recomendações do fabricante. A reação foi realizada em termociclador Gene AMP PCR System 2400 (Applied Biosystems) e o programa de amplificação consistiu em 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e, em seguida, 85°C por 5 minutos.

#### **3.7.2 qPCR**

A quantificação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) foi avaliada por qPCR com quantificação relativa utilizando master mix HOT FIREPol®

EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne®). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em um volume final de reação de 10 µL, o qual foi composto por 4 µL de cDNA diluído (1:10), 2 µL de EvaGreen Master Mix, 3,5 µL de água livre de DNase e RNase, 0,25 µL de primer senso e 0,25 µL de primer anti-senso (na concentração de 10 µM) (tabela 2). A reação de amplificação foi realizada no termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems) e o programa de amplificação utilizado consistiu em: 50°C por 2 minutos, 95°C por 12 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Uma curva de dissociação ao final de cada amplificação foi realizada para checar a especificidade das amplificações. Cada cDNA foi amplificado em triplicata, uma amostra correspondente sem cDNA foi incluída como controle negativo. A quantidade relativa da expressão do RNAm do gene específico relacionado ao controle foi determinada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), usando-se como gene endógeno o GAPDH. O CT representa o ciclo *threshold* e é determinado para cada poço da placa.  $\Delta\Delta CT$  é a diferença entre o  $\Delta CT$  do RNAm do gene alvo e o  $\Delta CT$  do controle interno (GAPDH).

Gene	Espécie	Sequência	
NOX2	Homo Sapiens	Senso	AGG AGT TTC AAG ATG CGT GG
		Anti-senso	TTG AGA ATG GAT GCG AAG GG
NOX4	Homo Sapiens	Senso	GCT GAC GTT GCA TGT TTC AG
		Anti-senso	CGG GAG GGT GGG TAT CTA A
DUOX1	Homo Sapiens	Senso	AGG AGT GGC ATA AGT TTG AGG
		Anti-senso	GCG TCA CCC AGA TGA AGT AG
GAPDH	Homo Sapiens	Senso	ATC TTC CAG GAG CGA GAT CC
		Anti-senso	ACC ACT GAC ACG TTG GCA GT

**Tabela 2:** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.

### 3.8 Análise Estatística

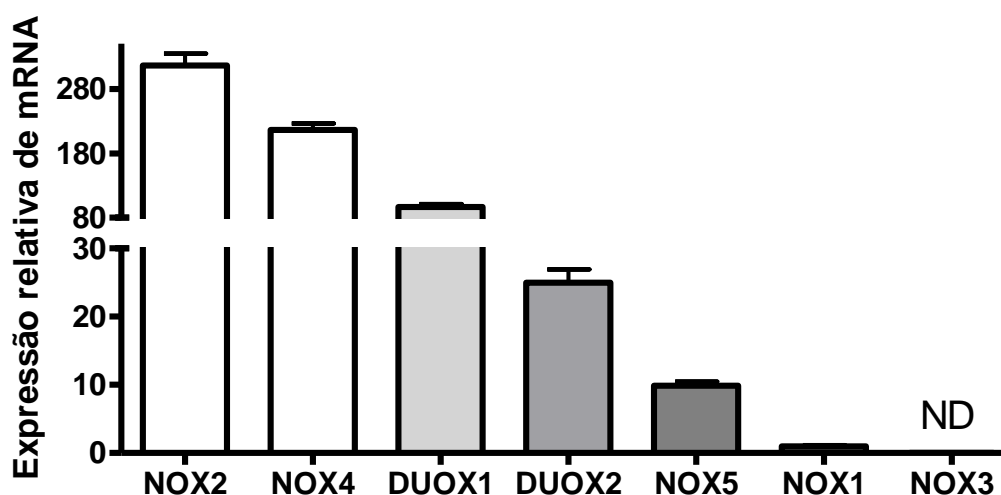
Os resultados de bioinformática foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade foi verificada através do teste D'Agostino and Pearson. Após a verificação os dados foram tratados como não-paramétricos. Os experimentos foram analisados através do teste *One Way*, exceto nos

resultados com somente 2 grupos, nos quais foi utilizado o teste T. Todos os pós-testes utilizados foram os recomendados pelo próprio programa para dados não-paramétricos. Para as análises in vitro os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os experimentos foram analisados através do teste *One Way* seguido pelo teste de múltiplas comparações *Dunnet*. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o Graphpad Prism (Versão 4, Graphpad Software Inc.) e o nível de significância mínimo estabelecido como  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Expressão de NADPH oxidases em tecido de mama normal

Os dados referentes aos níveis de RNAm dos tecidos normais de mama foram depositados no banco de dados do TCGA e a análise foi realizada através da plataforma online ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Foram observadas maiores expressões de NOX2, NOX4 e DUOX1 e em menores níveis DUOX2, NOX5 e NOX1. Nenhum valor de expressão foi encontrado para NOX3. Nessa ferramenta online, foram analisadas 290 amostras de tecido de mama normal diferentes (Fig.9). Os níveis de RNAm de NOX1 foram definidos como valor 1 e os demais NOX foram relativizadas em relação a ele.

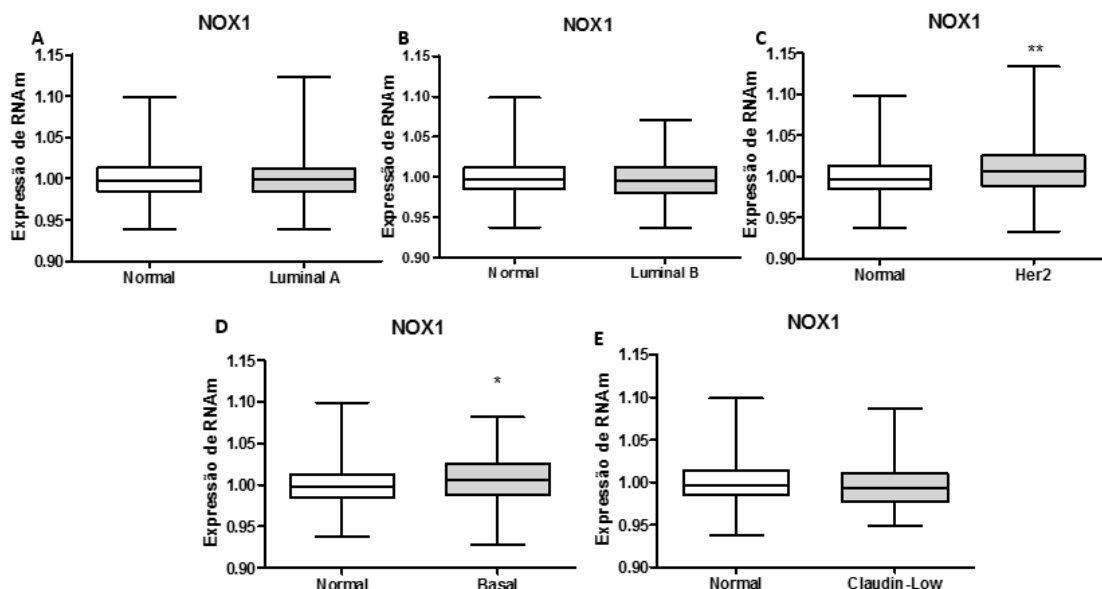


**Figura 9: Expressão de NADPH oxidases na mama.** Diferenças no tecido mamário das expressões entre os genes da família NOX. Dados obtidos da plataforma online The Human Protein Atlas. Resultado apresentado como média  $\pm$  erro padrão da média. N= 290

### 4.2 Comparação dos níveis de mRNA da família NOX em tecidos normais e tumorais de mama.

A fim de avaliar se a expressão de genes da família NOX mostra diferenças entre tecidos normais e tumorais, foram analisadas 1904 amostras do estudo *METABRIC*, *Nature 2012* & *Nat Commun 2016* através da ferramenta online ([cBioPortal.org](http://cBioPortal.org)). Como não foram encontrados níveis detectáveis de NOX3 em tecido normal de mama, optamos por não analisá-la. As amostras

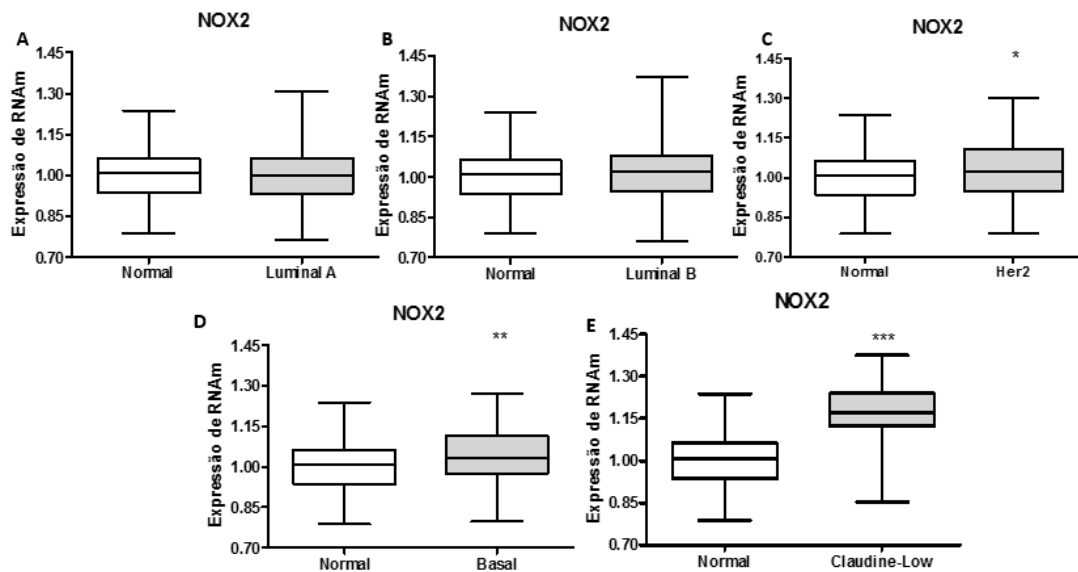
não tinham dados para DUOX2, logo, também, não foram analisados. As amostras foram divididas de acordo com sua classificação em claudin-low, luminal A, luminal B, basal e Her2. Os níveis de RNAm para NOX1 foram maiores nos subtipos basal e Her2 quando comparados aos valores do grupo normal (Figura 10D e 10C).



**Figura 10: Comparação dos níveis de mRNA da NOX1 em tecidos normais e tumorais de mama.**

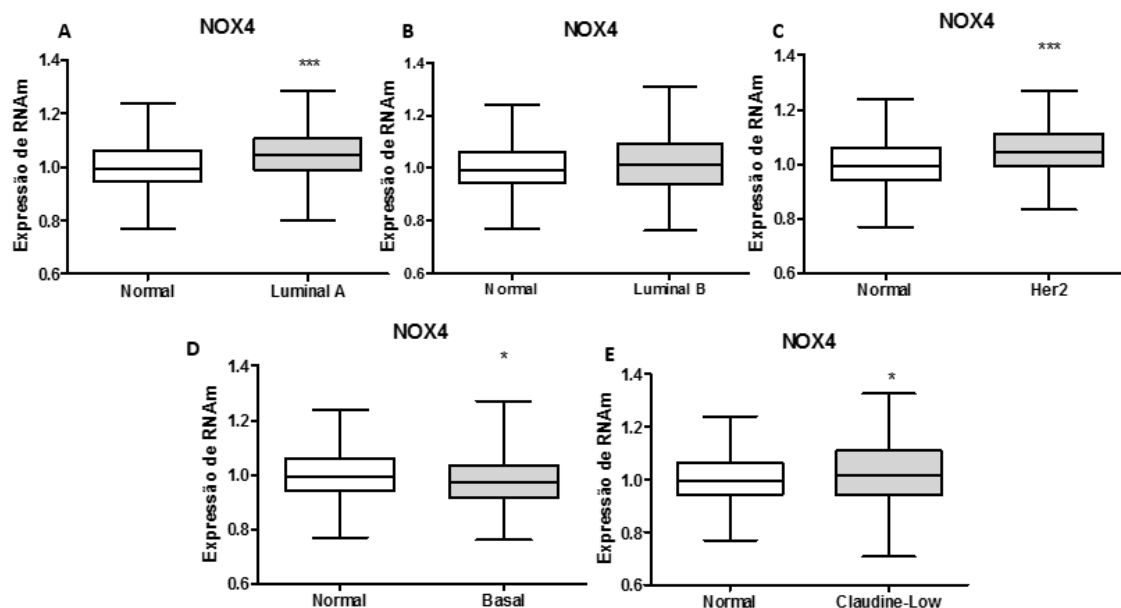
Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. Claudin-Low n=199; luminal A n=679; luminal B n=461; basal n=199; Her2 n=220; normal n=140. Nível de significância: \*p<0,05; \*\*p<0,01 em relação ao grupo normal.

Os níveis de RNAm para NOX2 tiveram mudanças significativas em três subtipos de câncer de mama. Claudin-Low, basal e Her2 mostraram aumento na expressão de NOX2 quando comparados ao tecido normal (Fig. 11E, 11D e 11C).



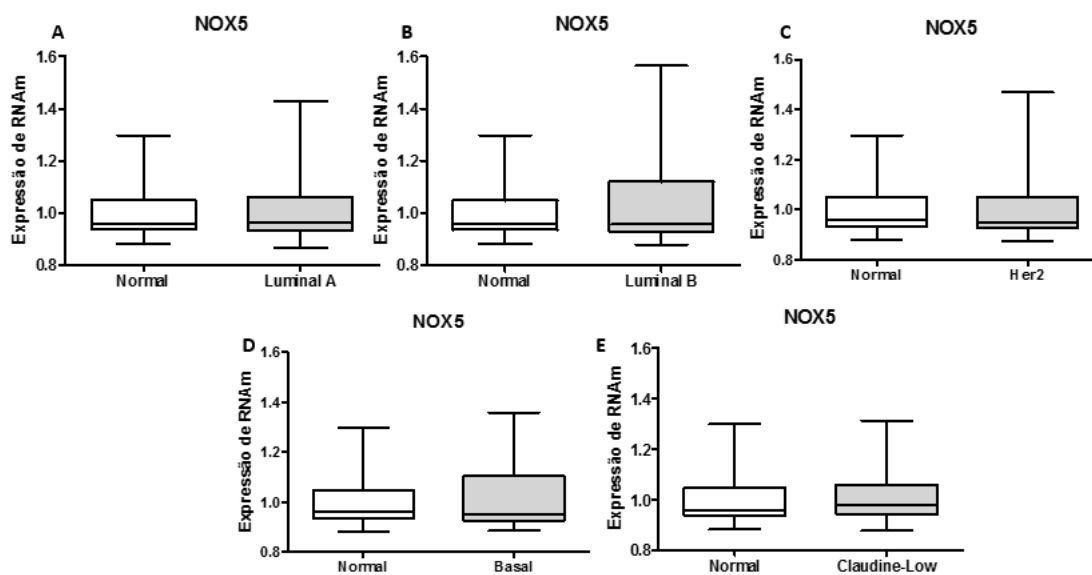
**Figura 11: Comparação dos níveis de mRNA da NOX2 em tecidos normais e tumorais de mama.** Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. Claudin-Low n=199; luminal A n=679; luminal B n=461; basal n=199; Her2 n=220; normal n=140. Nível de significância: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo normal.

NOX4, juntamente com DUOX1 foram as NADPH oxidases que mostraram alterações em um maior número de subtipos que foram analisados. Claudin-low, luminal A e Her2 mostraram um aumento na expressão de NOX4 em tecidos tumorais quando comparados ao grupo controle (Fig. 12E, 12A e 12C). Curiosamente, no subtipo de câncer basal foi observada uma diminuição na expressão de NOX4 no tecido tumoral (Fig 12D).



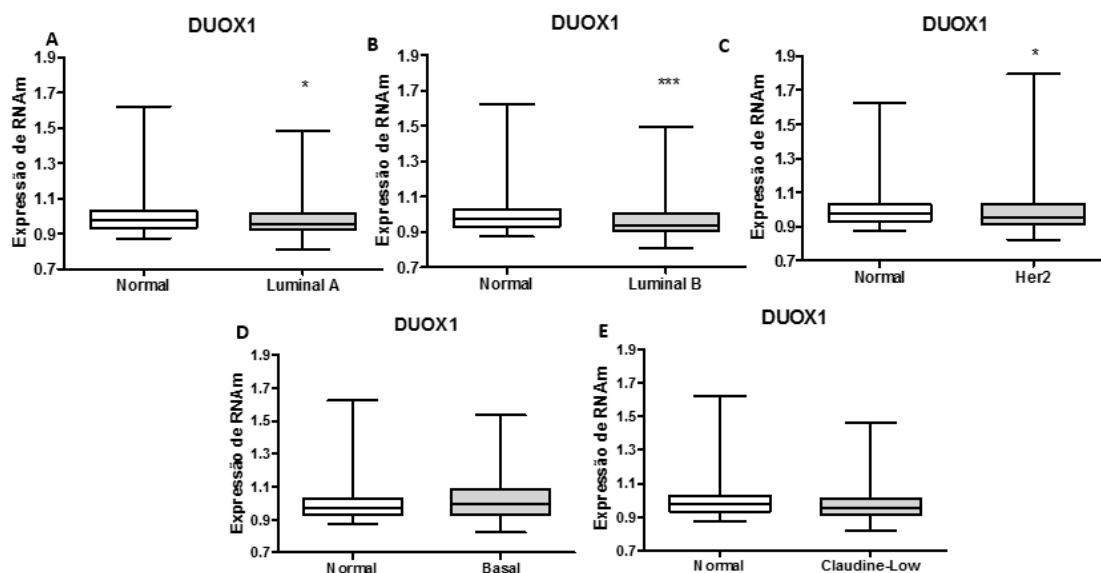
**Figura 12: Comparação dos níveis de mRNA da NOX4 em tecidos normais e tumorais de mama.** Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. Claudin-Low n=199; luminal A n=679; luminal B n=461; basal n=199; Her2 n=220; normal n=140. Nível de significância: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo normal.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de NOX5 em nenhum dos subtipos tumorais quando comparados ao grupo normal (Fig. 13).



**Figura 13: Comparação dos níveis de mRNA da NOX5 em tecidos normais e tumorais de mama.** Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. Claudin-Low n=199; luminal A n=679; luminal B n=461; basal n=199; Her2 n=220; normal n=140.

Em relação à DUOX1, observamos uma diminuição dos níveis de RNAm dessa enzima nos subtipos Claudin-low, luminal A, luminal B e Her2 quando comparadas ao controle (Fig. 14E, 14A, 14B, 14C).



**Figura 14: Comparação dos níveis de mRNA da DUOX1 em tecidos normais e tumorais de mama.** Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. Claudin-Low n=199; luminal A n=679; luminal B n=461; basal n=199; Her2 n=220; normal n=140. Nível de significância: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*P<0,001 em relação ao grupo normal.

Um resumo das alterações de cada isoforma de NADPH oxidase nos diferentes subtipos de câncer de mama avaliados estão listados na tabela 3.

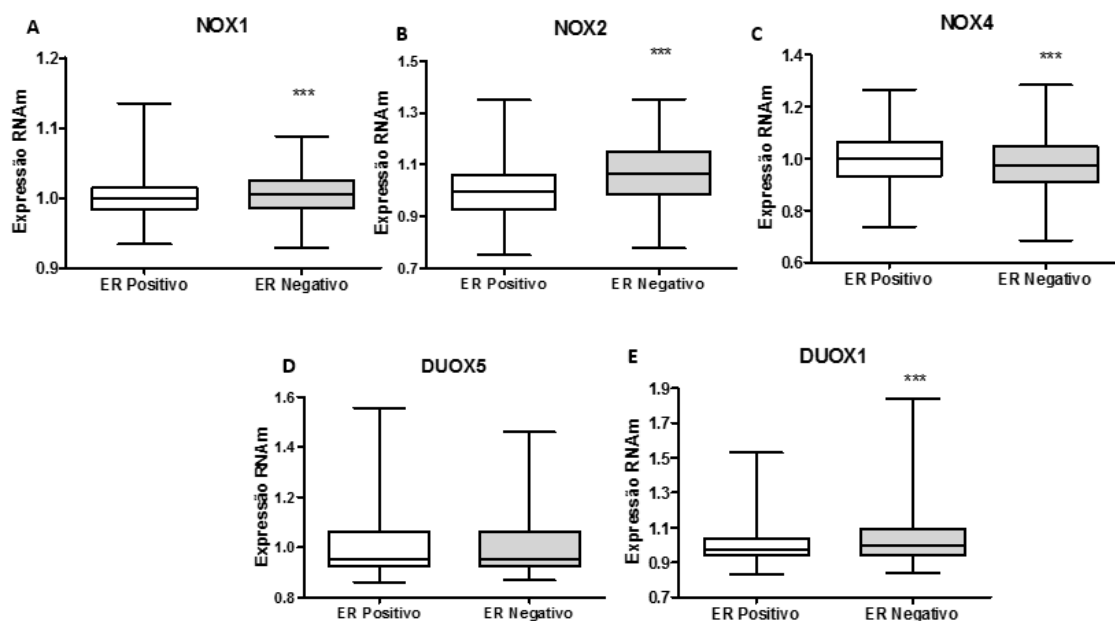
Subtipo de câncer	NADPH alteradas	Número de alterações
Luminal A	NOX4, DUOX1	2
Luminal B	DUOX1	1
Her2	NOX1, NOX2, NOX4, DUOX1	4
Basal	NOX1, NOX2, NOX4	3
Claudin-Low	NOX2, NOX4	2

**Tabela 3:** Alterações das NADPH oxidases em cada subtipo tumoral.



### 4.3 Comparação da expressão de genes da família NOX em relação ao *status* do receptor de estrogênio em amostras de câncer de mama.

Os níveis de RNAm para NOX1 (Fig 15A), NOX2 (Fig. 15B) e DUOX1 (Fig. 15E) foram maiores em tecidos com ausência do receptor quando comparados ao grupo com a presença do receptor. Curiosamente, NOX4 (Fig. 15C) teve a sua expressão diminuída nos tecidos com status negativo do receptor.

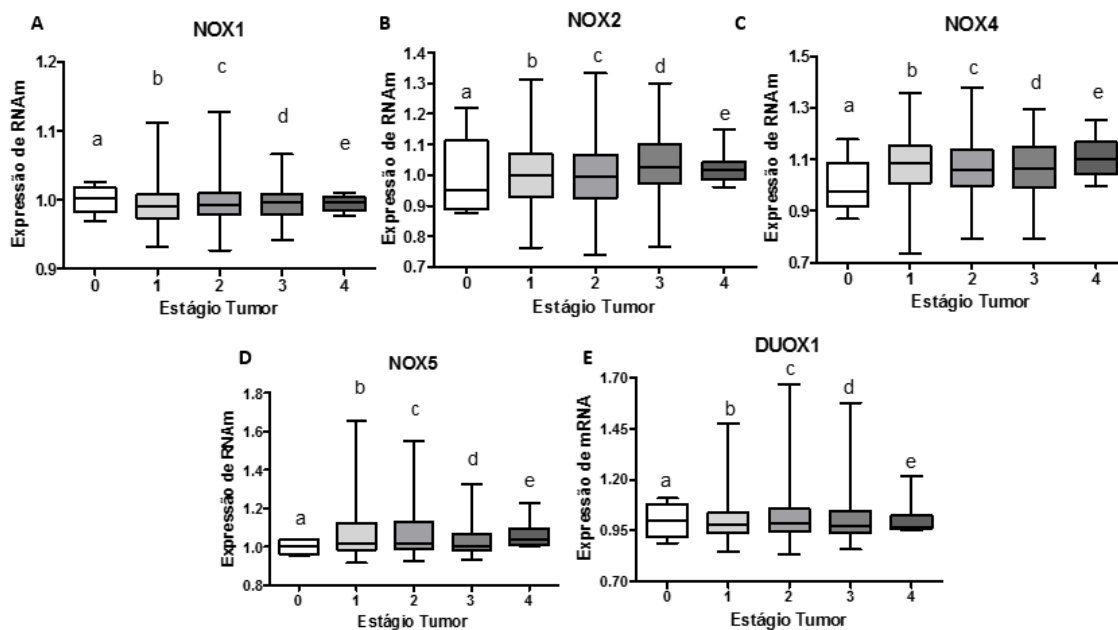


**Figura 15: Diferenças na expressão de genes da família NOX e o status ER.** Comparação entre a expressão de NOX1, NOX2, NOX4, NOX5, DUOX1 em relação ao *status* do receptor de estrogênio em tecidos mamários normais e tumorais. Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. N= 1904. Nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo normal.

### 4.4 Diferença na expressão de genes da família NOX em diferentes estágios de desenvolvimento do tumor

De maneira geral NOX1 e DUOX1 (Fig. 16A, 16C e 16F) tiveram uma diminuição da expressão nos estágios intermediários do tumor (1, 2 e 3) e um aumento no estágio final (4). Já NOX2, NOX4 e NOX5 mostraram aumento de acordo com a progressão do tumor (Fig. 16B, 16D e 16E). Todos os estágios

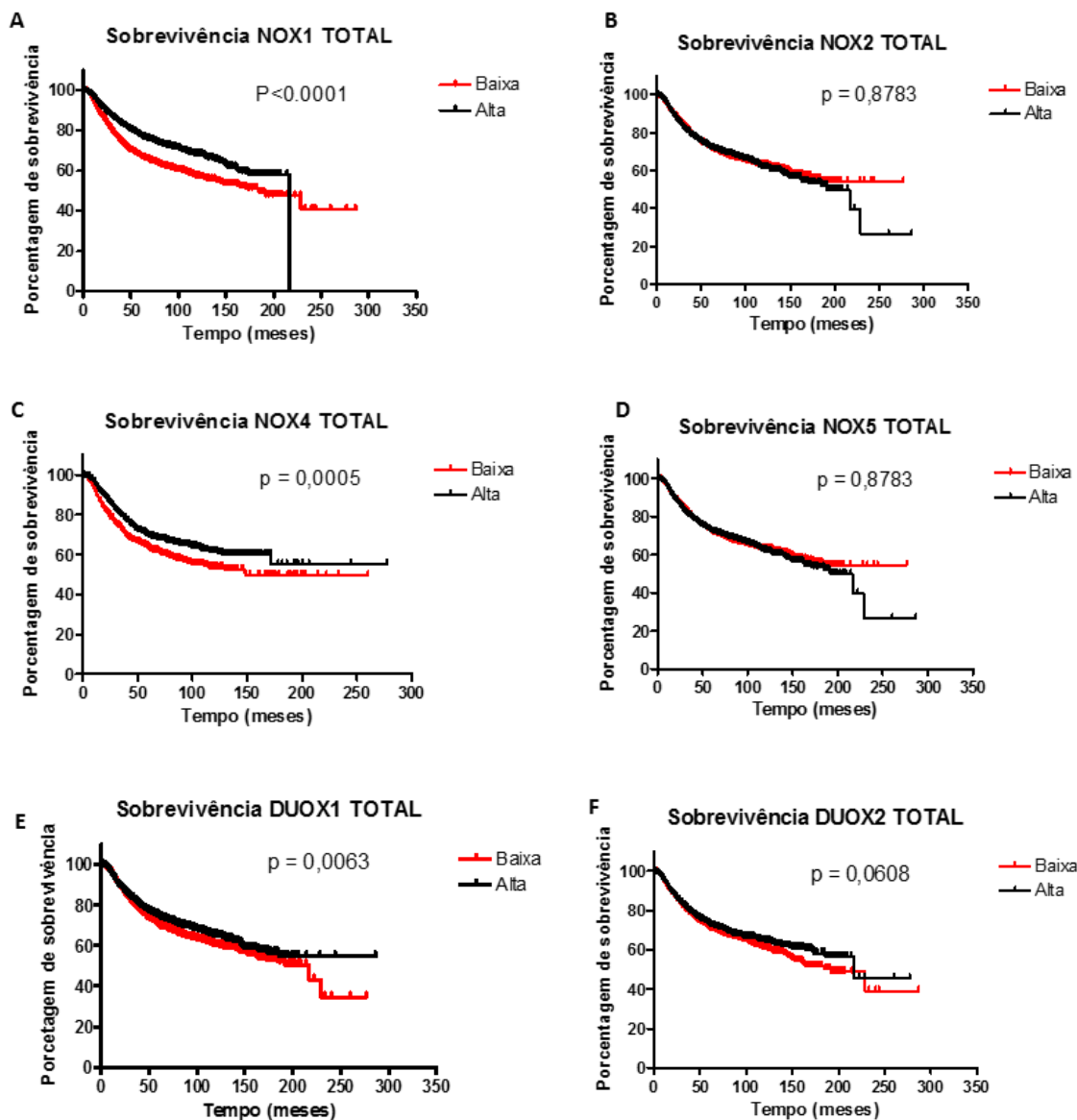
mostraram diferença significativa de  $p < 0,0001$  entre si em todas as NOX avaliadas.



**Figura 16: Diferenças na expressão de genes da família NOX em diferentes estágios do tumor.** Comparação entre a expressão de NOX1, NOX2, NOX4, NOX5, DUOX1 em relação ao estágio em que o tumor foi analisado em tecidos mamários normais e tumorais. Dados obtidos da plataforma online cBioPortal. Resultado apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. N= 1904. Nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo normal.

#### 4.6 Relação entre os níveis de RNAm para NOX e porcentagem de sobrevivência

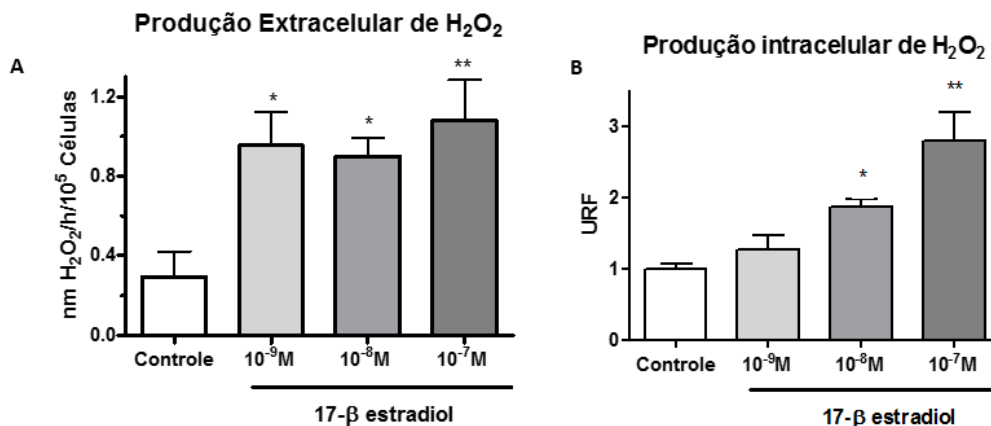
As amostras analisadas mostraram que pacientes com baixa expressão de NOX1, NOX4 e DUOX1 tiveram menores taxas de sobrevivência quando comparados a pacientes com alta expressão dessas NOX (Fig. 17A, 17C, 17E). Não há dados de sobrevivência de pacientes relacionando alta expressão de NOX1 logo após o tempo de 200 meses.



**Figura 17:** Diferenças na sobrevivência de acordo com a expressão de NADPH oxidases. Comparação entre a sobrevivência de pacientes com alta e baixa expressão de NOX1, NOX2, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 em tecidos mamários tumorais.

#### 4.7 Produção de ERO em células expostas ao estrogênio

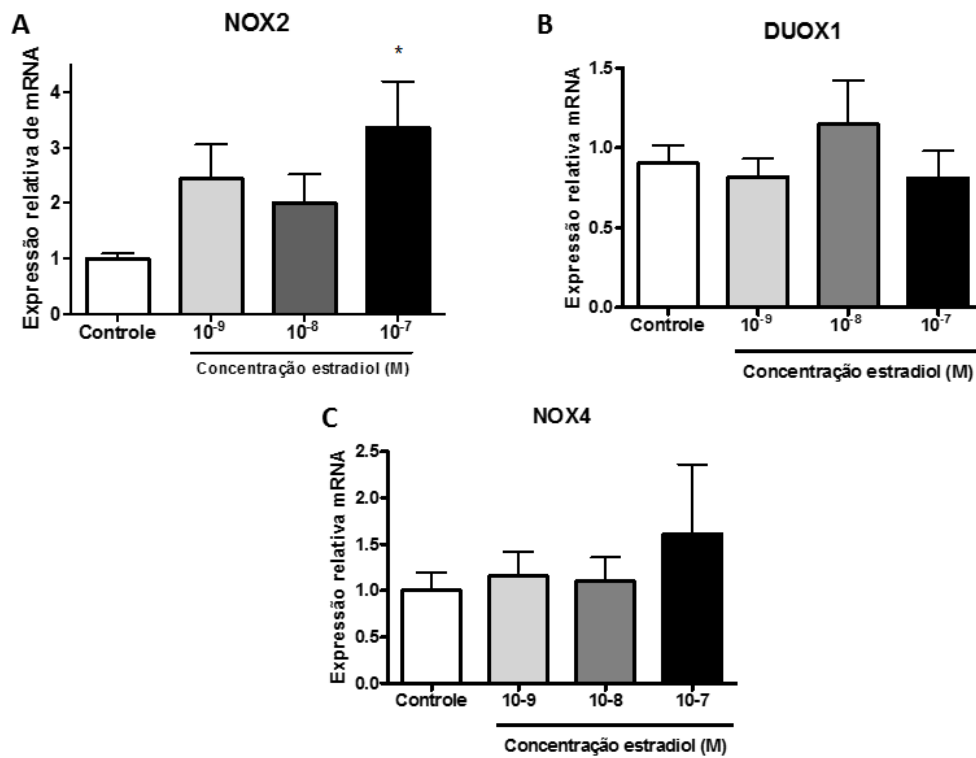
Com o objetivo de elucidar o papel do estrogênio na modulação das NOX, a produção extracelular de peróxido de hidrogênio foi avaliada. Houve um aumento significativo nos níveis de ERO em todas as concentrações de estradiol utilizadas (Fig.18A). A produção intracelular de ERO avaliada por DCFH também mostrou um aumento significativo nas concentrações de  $10^{-8}$ M e  $10^{-7}$ M (Fig 18B).



**Figura 18: Geração de ERO extra e intracelular em células MCF7 tratadas com estrogênio.** A geração extracelular de peróxido de hidrogênio foi avaliada através do método AmplexRed/HRP nas células MCF7 tratadas com estrogênio por 72h. Os resultados foram expressos em nmoles de peróxido de hidrogênio corrigidos por tempo e quantidade de células (A). Os níveis intracelulares de ERO foram avaliados nas células MCF7 tratadas com diferentes concentrações de estrogênio por 72h e avaliadas por citometria de fluxo utilizando a sonda CM-H2DCF-DA (B). Resultados apresentados como a média ± erro padrão da média em três experimentos independentes com 3 replicatas cada. Nível de significância: \*p<0,05; \*\*p<0,01 em relação ao controle.

#### 4.8 Expressão de NOX em células MCF7 expostas ao estrogênio

Observamos que a exposição ao estrogênio aumentou a expressão de RNAm da NOX2 na concentração de 10<sup>-7</sup>M (Fig. 19A) em células MCF7. Entretanto, a expressão de DUOX1 e NOX4 (Fig. 19B e 19C) não teve alteração significativa na presença do estrogênio. Como o tecido mamário normal mostrou baixa expressão de NOX1, NOX3 (indetectável) e DUOX2, decidimos não as avaliar.



**Figura 19: Expressão de NOX em células expostas ao estrogênio.** Células MCF7 foram incubadas com diferentes concentrações de estrogênio por 72 horas. O nível da expressão de NOX2(A), DUOX1(B) e NOX4(C) foi avaliado a partir de qPCR. Resultados apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média em três experimentos independentes com 3 replicatas cada. Nível de significância: \* $p < 0,05$ .

## 5. Discussão

O dano causado por ERO tem sido implicado em diversos processos como envelhecimento e também em inúmeras condições clínicas, incluindo o câncer (DROGE, 2002). Muitos cânceres epiteliais, como câncer de mama, cólon e pescoço, mostram um aumento da produção de ERO quando comparados aos tecidos normais (AYKIN-BURNS et al., 2009).

Diversos estudos mostram que o aumento de NOX e um consequente aumento de espécies reativas de oxigênio, é uma característica das células tumorais, muitas vezes conferindo vantagens fisiológicas às mesmas. As células tumorais podem ser intrinsecamente mais resistentes ao estresse oxidativo comparadas às células normais e, portanto, o estresse oxidativo pode fornecer uma vantagem seletiva no crescimento do tumor (USHIO-FUKAI; NAKAMURA, 2008).

Já é bem estabelecido que as ERO desempenham diversas funções de sinalização celular, dentre elas, vias que levam ao estímulo da proliferação (MOLONEY; COTTER, 2018). Logo, se a célula tumoral consegue ser mais resistente e sobreviver, é uma grande vantagem para ela ter maiores níveis de ERO, pois terá sua proliferação aumentada, o que é uma característica comum aos tumores em geral.

Um estudo de 2016 demonstrou que a alteração na expressão gênica da família das NOX, revelou ser um importante fator de suscetibilidade ao câncer. As ERO induzem a tumorigênese, afetando o comportamento das células tumorais e regulando suas interações metabólicas (ARCUCCI et al., 2016). Sabe-se que os tumores produzem altos níveis de ERO que podem derivar da disfunção mitocondrial, de um aumento na expressão de NADPH oxidases e/ou de alterações no sistema antioxidante (WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019). No entanto, quando os níveis de ERO nos tecidos tumorais se tornam extremamente altos, eles podem induzir a morte de células cancerosas. De fato, a citotoxicidade de muitos medicamentos quimioterapêuticos é mediada por um aumento adicional dos níveis de ERO nos tecidos tumorais (YAN; GUO; ZHANG, 2016).

O papel individual de várias NOX tem sido avaliado em diferentes tumores. O panorama que pode ser observado é que em cada tipo de câncer existe maior ou menor participação de determinada NOX. Isso é importante, visto que cada tecido expressa níveis diferentes de NADPH oxidases. Nossos dados mostram que na mama normal há uma maior expressão de NOX2, NOX4 e DUOX1. Os dados analisados não mostraram expressão de NOX3 nesse tecido. Em cada tecido, a presença de NOX está relacionada a diferentes funções. Não existem estudos mostrando uma função específica das NOX na mama. Porém, as ERO geradas podem exercer funções fisiológicas já bem estabelecidas como sobrevivência e proliferação.

Apesar dos nossos dados não mostrarem altos níveis de NOX1 no tecido mamário, essa NADPH oxidase foi encontrada mais expressa em dois subtipos de câncer de mama (Her2 e basal), comparadas com tecido normal. Isso corrobora estudos que analisaram tumores primários de mama humanos e mostraram níveis elevados de NOX1 em mais de 80% dos tecidos tumorais (DESOUKI et al., 2005). Nossos dados também revelaram que a NOX1 também é expressa em níveis mais elevados em tumores que são negativos para receptor de estrogênio. A falta do receptor pode indicar uma célula mais indiferenciada e conseqüentemente, um tumor mais agressivo. O estágio do tumor também levou a alterações no nível de expressão de NOX1. Observamos que em tumores com estágios mais avançados, a expressão de NOX1 estava diminuída. Isso pode ser explicado pela maior participação da NOX1, nos estágios iniciais da carcinogênese (GEISZT et al., 2003).

A NOX2 se mostrou a mais expressa no tecido mamário normal. Comparando o tecido normal e tumoral, observamos que a NOX2 tem sua expressão aumentada em três subtipos de câncer de mama comparados ao tecido normal. Assim como NOX1, NOX2 também se mostrou aumentada em tecidos tumorais negativos para receptor de estrogênio. Já existem estudos associando a ausência do receptor de estrogênio a características de maior agressividade do tumor. Em 2019, uma pesquisa utilizando células positivas ou negativas para receptor de estrogênio mostrou que as células que tinham a ausência do receptor, tiveram maior capacidade de invasão e migração (FENG et al., 2019). NOX2 se mostrou aumentada nos estágios avançados do tumor.

Isso sugere que essa NADPH oxidase pode ter um importante papel em todas as etapas da carcinogênese da mama.

O estudo sobre a NOX3 no câncer é bastante limitado. Dados mostraram que a expressão de RNAm de NOX3 foi praticamente ausente em todas as linhagens de células tumorais como: colorretal, próstata, mama, hematopoiético, ovário, melanoma, pulmão, entre outros (JUHASZ et al., 2009). Nossos dados corroboram esse estudo, pois o nível de RNAm de NOX3 foi indetectável. Assim, NOX3 parece não ter relevância no câncer de mama.

Entre os 7 membros da família NOX, a NOX4 é o membro mais estudado em tumores malignos. Um estudo demonstrou que a expressão de NOX4 no tecido tumoral da mama (e ovariano) via RT-PCR foi maior nas linhagens celulares de câncer de mama e nos tumores primários. Das 6 linhagens celulares de câncer de mama estudadas, 4 (66,6%) superexpressavam a NOX4. Análises semelhantes em tumores primários da mama mostram uma superexpressão de NOX4 em aproximadamente 87% dos tumores primários de mama no nível do mRNA (GRAHAM et al., 2010).

Esses dados em conjunto com estudos de outros grupos sugerem que a NOX4 pode funcionar como um oncogene envolvido na tumorigênese. Para fornecer evidência direta e relação de causa e efeito, os autores superexpressam a NOX4 em uma linhagem celular epitelial da mama normal. Eles demonstraram que a superexpressão de NOX4 na linhagem celular epitelial da mama normal levou a características tumorigênicas, incluindo senescência celular, crescimento celular independente de ancoragem, invasão e resistência à morte celular apoptótica. Adicionalmente, a superexpressão de NOX4 em uma linhagem celular maligna aumentou ainda mais as suas características tumorais. A superexpressão da NOX4 levou a um aumento da produção de  $H_2O_2$ , mas não na produção do radical superóxido. Isso é consistente com o que já se sabe na literatura que a NOX4 produz diretamente peróxido de hidrogênio (GRAHAM et al., 2010). Nossos dados mostraram que a expressão de NOX4 está aumentada em 3 subtipos de câncer de mama: Claudin-low, luminal A e Her2. Curiosamente, a NOX4 se mostrou diminuída no subtipo basal comparado ao tecido normal. Também observamos que NOX4 estava diminuída nos tecidos tumorais negativos para receptor de estrogênio.



Embora a presença de NOX4 esteja associada com maior agressividade em outros tipos de tumor, como por exemplo, no câncer de pâncreas (VAQUERO et al., 2004), isso não parece acontecer no câncer de mama. Entretanto, NOX4 se mostrou importante em todas as etapas da carcinogênese, pois estava aumentada em todos os estágios de progressão tumoral.

Vários estudos têm associado a NOX5 ao desenvolvimento tumoral. Essa enzima tem um papel de aumentar a migração e diminuir apoptose em células de câncer de próstata (BRAR et al., 2003). Outro estudo comprova que a NOX5 é significativamente superexpressa em melanomas, câncer de próstata e mama em comparação com tecidos não malignos da mesma origem histológica (ANTONY et al., 2017). O que observamos com nossas análises, é que não houve diferença significativa na expressão de NOX5 quando foram comparados tecidos tumorais e normais. Não houve mudanças com relação ao status do receptor de estrogênio, ou mesmo na sobrevivência dos pacientes, sugerindo que a NOX5 pode não ter uma participação importante na carcinogênese de mama.

A expressão e a função das DUOXs variam entre os diferentes tipos de câncer. O silenciamento epigenético da expressão de DUOXs foi observado no câncer de pulmão (LUXEN; BELINSKY; KNAUS, 2008). No entanto, no câncer colorretal foi detectada uma regulação positiva de DUOXs (JUHASZ et al., 2009; QI et al., 2016). Um estudo de 2017 mostrou que uma alta expressão de DUOXs está associada à redução da mortalidade por câncer de tireóide; (PULCRANO et al., 2007) enquanto as ERO provenientes das DUOXs ativariam a sinalização da AKT e promoveriam a sobrevivência celular em células de câncer de próstata (PETTIGREW; CLERKIN; COTTER, 2012).

Enquanto a maioria das NOX está aumentada em tecidos tumorais, a DUOX1 parece ter uma menor expressão nas células tumorais da mama e nos tecidos tumorais em comparação ao seu controle. Dados do nosso grupo mostram que células não-tumorais de mama silenciadas para DUOX1 apresentaram maior taxa de proliferação e menor adesão quando comparadas às células controle, o que sugere que a DUOX1 pode exercer um papel supressor de tumor (FORTUNATO et al., 2018). Além disso, células de câncer de pulmão silenciadas para DUOX apresentaram transição epitelial para

mesenquimal, uma alteração que está ligada a metástases (LITTLE et al., 2016). Nossos dados corroboram com que existe na literatura. Encontramos níveis mais baixos de DUOX1 nos subtipos claudin-low, luminal A, luminal B e Her2. Os níveis de DUOX1 também foram encontrados mais baixos conforme o estágio tumoral. Esses dados sugerem que ao contrário das outras NOX, a ausência de DUOX1 tem um papel significativo na progressão tumoral.

De maneira interessante, observamos que os subtipos com maiores alterações de expressão das NOX foram claudin-low, basal e Her2. Esses subtipos tem a ausência dos receptores de estrogênio e progesterona, tendo uma maior agressividade e um pior prognóstico. Ao contrário, o subtipo luminal A é menos agressivo e com um melhor prognóstico. Esse subtipo foi o que se mostrou com menos alterações na expressão das NADPH oxidases, sugerindo que os subtipos mais agressivos têm mais alterações e consequentemente maior participação das NOX no seu processo de carcinogênese.

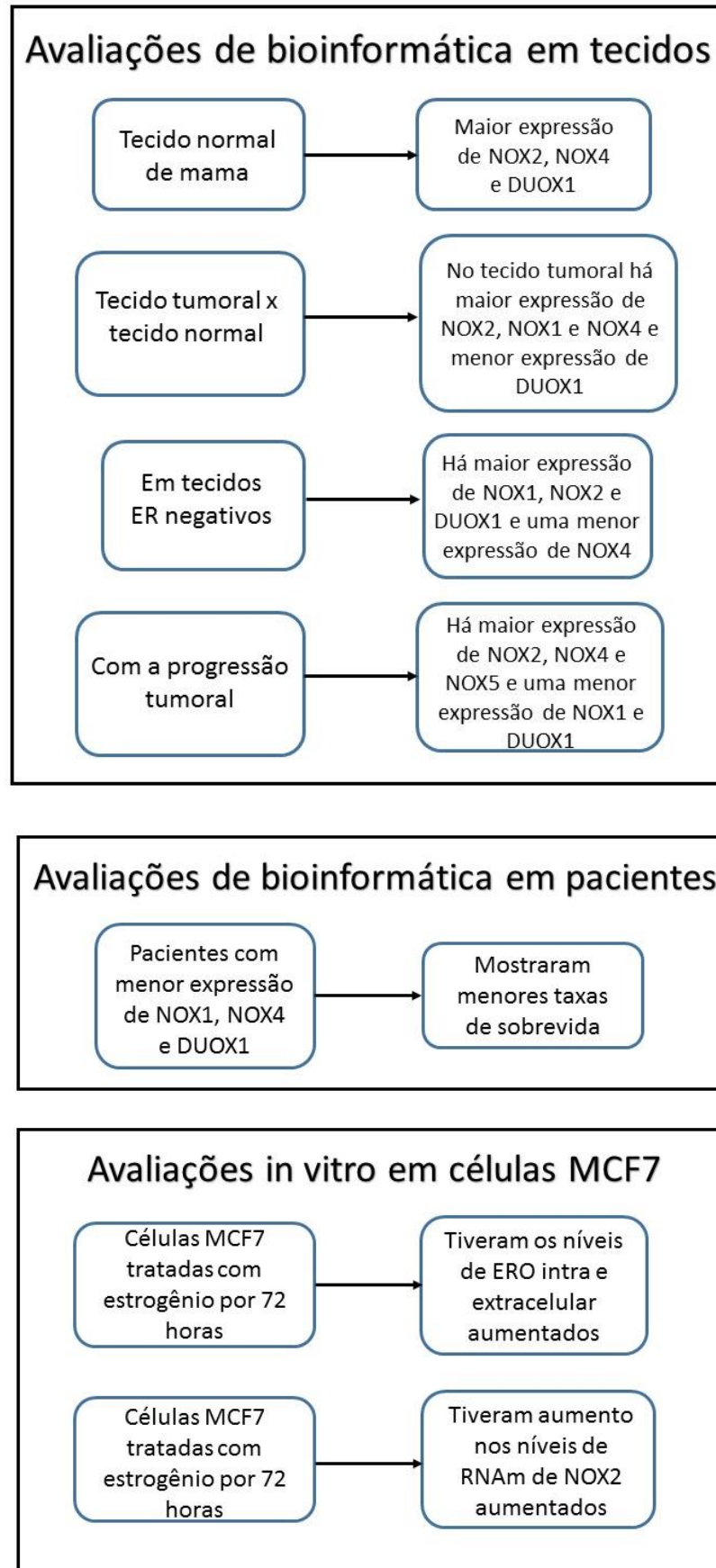
Inesperadamente, encontramos diferenças na sobrevivência dos pacientes com diferentes níveis de expressão de NOX. Os pacientes com menor expressão de NOX1, NOX4 e DUOX1 tiveram menor sobrevida, comparados aos pacientes com maiores níveis de NOX. Alguns estudos já associaram menor sobrevida dos pacientes com câncer de tireoide associados a baixos níveis de DUOX (PULCRANO et al., 2007), o que corrobora com os dados observados de que DUOX1 está diminuída em tecidos tumorais de mama, mas isso não se aplica a NOX1 e NOX4. Infelizmente, não existem dados sobre essas diferenças de expressão que possam auxiliar o entendimento desse evento.

O papel do estrogênio no desenvolvimento do câncer de mama tem sido bastante estudado. Já é bem sabido que uma das vias é através do aumento da produção de ERO. Nas células avaliadas, encontramos aumento na produção extra e intracelular de ERO quando expostas ao estrogênio. Observamos também que a exposição ao estrogênio levou ao aumento da expressão de NOX2, que pode ser o mecanismo que qual houve um aumento de ERO.

Nossos dados, juntamente com o que encontramos na literatura mostram que existe um papel das NOX na carcinogênese, seja em tecido mamário ou não. No entanto, muitos estudos ainda precisam ser feitos, para elucidar o papel de cada NADPH oxidase nos diferentes tipos de câncer e suas implicações.

## 6. Conclusões

- A mama tem um padrão de expressão de NOX em que o tecido normal mamário tem maior expressão de NOX2, NOX4 e DUOX1;
- Tecidos tumorais mostraram maior expressão de NOX1, NOX2 e NOX4 comparados a tecido mamário normal. Entretanto DUOX1 mostrou menores níveis de expressão em tecidos tumorais;
- O subtipo de câncer também se mostrou importante. Havia mais diferenças significativas na expressão de NOX nos subtipos mais agressivos: basal e claudin-low, enquanto o subtipo de câncer de mama com melhor prognóstico, luminal A, mostrou menos alterações na expressão das NADPH oxidases;
- Tumores que são negativos para receptor de estrogênio, mostraram maiores níveis de NOX (com exceção de NOX4), comparados aos tumores positivos para o receptor;
- Tumores em estágio mais avançado mostraram maiores níveis de NOX2, NOX4 e NOX5 comparados aos tumores em estágios iniciais, enquanto NOX1 e DUOX1 parecem diminuir sua expressão conforme o avanço dos estágios do tumor;
- Pacientes com baixa expressão de NOX1, NOX4 e DUOX1 mostraram uma menor taxa de sobrevida;
- Células MCF7 tratadas com estrogênio tiveram um aumento nos níveis de ERO intra e extracelular;
- Células MCF7 mostraram um aumento na expressão de NOX2 quando tratadas com estrogênio.



**Figura 20:** Conclusão dos resultados obtidos

## 7. Referências

- ABE, O. et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. **Lancet**, [s. l.], v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 2005.
- ACHARYA, Asha et al. Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 23–34, 2010.
- AGO, Tetsuro et al. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. **Stroke**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 1040–1046, 2005.
- ALTHUIS, Michelle D. et al. Etiology of Hormone Receptor – Defined Breast Cancer : A Systematic Review of the Literature. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1558–1569, 2004.
- AMBASTA, Rashmi K. et al. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 44, p. 45935–45941, 2004.
- AMEZIANE-EL-HASSANI, Rabii et al. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 34, p. 30046–30054, 2005.
- ANTAL, Maria Cristina et al. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER $\beta$ -null mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 7, p. 2433–2438, 2008.
- ANTONY, Smitha et al. Characterization of NADPH oxidase 5 expression in human tumors and tumor cell lines with a novel mouse monoclonal antibody. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 65, n. 301, p. 497–508, 2013.
- ANTONY, Smitha et al. NADPH oxidase 5 (NOX5)—induced reactive oxygen signaling modulates normoxic HIF-1 $\alpha$  and p27Kip1 expression in malignant melanoma and other human tumors. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 2643–2662, 2017.
- ARCUCCI, Alessandro et al. Cancer: An Oxidative Crosstalk between Solid

Tumor Cells and Cancer Associated Fibroblasts. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, 2016.

ARPINO, Grazia et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: Association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 97, n. 17, p. 1254–1261, 2005.

AYKIN-BURNS, Nùkhet et al. Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 418, n. 1, p. 29–37, 2009.

BÁNFI, Botond et al. A Mammalian H<sup>+</sup> Channel Generated through Alternative Splicing of the NADPH Oxidase Homolog NOH-1. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5450, p. 138–142, 2000.

BÁNFI, Botond et al. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> Activation of the NADPH Oxidase 5 (NOX5). **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 18, p. 18583–18591, 2004.

BEATSON, George T. Treatment of Inoperables Cases of Carinoma of Mamma: Suggestion For A New Method of Treatment. **Transactions. Medico-Chirurgical Society of Edinburgh**, [s. l.], v. 148, n. 3806, p. 153–179, 1896.

BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl Heinz. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BJÖRNSTRÖM, Linda; SJÖBERG, Maria. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005.

BLOCK, Karen; GORIN, Yves. Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 627–637, 2012.

BOCCHINFUSO, Wayne P. et al. Induction of mammary gland development in estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. **Endocrinology**, [s. l.], v. 141, n. 8, p. 2982–2994, 2000.

- BRANDES, Ralf P.; WEISSMANN, Norbert; SCHRÖDER, Katrin. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 76, p. 208–226, 2014.
- BRAR, Sukhdev S. et al. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 285, p. 353–369, 2003.
- BROWN, David I.; GRIENGLING, Kathy K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 1239–1253, 2009.
- BUUL, J. .. Van et al. Expression and Localization of NOX2 and NOX4 in Primary Human Endothelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 308–317, 2005.
- CASARINI, Livio et al. Estrogen modulates specific life and death signals induced by LH and hCG in human primary granulosa cells in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2017.
- CHALHOUB, Nader; BAKER, Suzanne J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 4, p. 127–150, 2009.
- CHEN, Jin Q. et al. Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  to human mitochondrial DNA estrogen response elements. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 358–373, 2004.
- CHENG, Guangjie et al. Homologs of gp91phox: Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. **Gene**, [s. l.], v. 269, n. 1–2, p. 131–140, 2001.
- CHIANG, Anne C.; MASSAGUÉ, Joan. Molecular Basis of Metastasis Anne. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 359, n. 26, p. 2814–2823, 2008.
- CHU, Kenneth C.; ANDERSON, William F. Rates for breast cancer characteristics by estrogen and progesterone receptor status in the major racial/ethnic groups. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 199–211, 2002.
- COOKE, MARCUS S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation,



and disease. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.

COUGHLIN, Shaun R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 1800–1814, 2005.

CUI, Xiaojiang et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 23, n. 30, p. 7721–7735, 2005.

DAHAN, I.; SMITH, S. M. E.; PICK, E. A Cys-Gly-Cys triad in the dehydrogenase region of Nox2 plays a key role in the interaction with p67phox. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 859–874, 2015.

DAI, Xiaofeng et al. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. **Journal of Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017.

DESOUKI, Mohamed Mokhtar et al. Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. **Cancer Biology and Therapy**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1367–1373, 2005.

DHO, So Hee et al. STAT5A-mediated NOX5-L expression promotes the proliferation and metastasis of breast cancer cells. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 351, n. 1, p. 51–58, 2017.

DIAZ, Begoña et al. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. **Science Signaling**, [s. l.], v. 2, n. 88, p. 1–14, 2009.

DONKÓ, Ágnes et al. Dual oxidases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 360, n. 1464, p. 2301–2308, 2005.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUNNWARD, Lisa K.; ROSSING, Mary Anne; LI, Christopher I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: A prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10,

2007.

DUPUY, Fanny et al. PDK1-dependent metabolic reprogramming dictates metastatic potential in breast cancer. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 577–589, 2015.

FENG, Xuefei et al. CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 361–379, 2019.

FERLAY, Jacques et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 127, n. 12, p. 2893–2917, 2010.

FORTUNATO, Rodrigo S. et al. DUOX1 silencing in mammary cell alters the response to genotoxic stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

FU, Naiyang; LINDEMAN, Geoffrey J.; VISVADER, Jane E. **The Mammary Stem Cell Hierarchy**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2014. v. 107

FU, Xiaoying et al. cAMP-response Element-binding Protein Mediates Acid-induced NADPH Oxidase NOX5-S Expression in Barrett Esophageal Adenocarcinoma Cells. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, [s. l.], v. 281, n. 29, p. 20368–20382, 2006.

GARCIA, Natalia M.; WALKER, Rosemary S.; ZOELLNER, Lori A. Estrogen, progesterone, and the menstrual cycle: A systematic review of fear learning, intrusive memories, and PTSD. **Clinical Psychology Review**, [s. l.], v. 66, p. 80–96, 2018.

GEISZT, Miklós et al. NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91 phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 299–306, 2003.

GEISZT, Miklós. NADPH oxidases: New kids on the block. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 289–299, 2006.

- GRAHAM, Kelly A. et al. NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. **Cancer Biology and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 223–231, 2010.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HAORAH, James et al. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 566–576, 2007.
- HECHT, Fabio et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 4281–4291, 2016.
- HEWITT, S. C; COUSE, J. F;; KORACH, K. S; Estrogen receptor knockout mice: What their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 345–352, 2000.
- HILENSKI, Lula L. et al. Distinct Subcellular Localizations of Nox1 and Nox4 in Vascular Smooth Muscle Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 677–683, 2004.
- HÖLL, Monika et al. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 27–39, 2016.
- HOLLIDAY;, Deborah L.; SPEIRS, Valerie. Choossing the right cell line for breast cancer reserach. **Holliday and Speirs Breast Cancer Reseach**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 215–222, 2011.
- HOLTERMAN, Chet E. et al. Nephropathy and elevated BP in mice with podocyte-specific NADPH oxidase 5 expression. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 784–797, 2014.
- HULKA, Barbara S.; MOORMAN, Patricia G. Breast cancer : hormones and other risk factors. **Maturitas**, [s. l.], v. 38, p. 103–113, 2001.
- JACKSON, Heather M. et al. Nox4 B-loop creates an interface between the transmembrane and dehydrogenase domains. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 14, p. 10281–10290, 2010.

- JUHASZ, Agnes et al. Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 523–532, 2009.
- KARIYA, Yoshinobu et al. Differential regulation of cellular adhesion and migration by recombinant laminin-5 forms with partial deletion or mutation within the G3 domain of  $\alpha 3$  chain. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 506–520, 2003.
- KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 480–489, 1980.
- KOBAYASHI, Satsuki et al. Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 300, n. 2, p. 455–462, 2004.
- KRYSTON, Thomas B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 711, n. 1–2, p. 193–201, 2011.
- LAMBETH, J. David; KAWAHARA, Tsukasa; DIEBOLD, Becky. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 319–331, 2007.
- LEBLANC, D. R. et al. The effect of estrogen on tendon and ligament metabolism and function. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 172, n. June, p. 106–116, 2017.
- LITTLE, A. C. et al. DUOX1 silencing in lung cancer promotes EMT, cancer stem cell characteristics and invasive properties. **Oncogenesis**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 1–11, 2016.
- LIU, Chia Hao et al. Granulosa cell tumor of ovary: Perspective of Taiwan. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 711–712, 2017.
- LUXEN, Sylvia; BELINSKY, Steven A.; KNAUS, Ulla G. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 1037–1045, 2008.

MACIAS, Hector; HINCK, Lindsay. Mammary Gland Development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 533–557, 2012.

MALHOTRA, Gautam K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.

MARTYN, Kendra D. et al. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 69–82, 2006.

MEITZLER, Jennifer L.; BRANDMAN, Relly; ORTIZ DE MONTELLANO, Paul R. Perturbed heme binding is responsible for the blistering phenotype associated with mutations in the *Caenorhabditis elegans* dual oxidase 1 (DUOX1) peroxidase domain. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 52, p. 40991–41000, 2010.

MOLONEY, Jennifer N.; COTTER, Thomas G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 80, p. 50–64, 2018.

MØRCH, Lina S. et al. Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 377, n. 23, p. 2228–2239, 2017.

OLIVOTTO, Ivo A. et al. Time to Stop Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer Management. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1769–1770, 2004.

PAN, Hongchao et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence After Stopping Endocrine Therapy At 5 Years. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 377, n. 19, p. 1836–1846, 2017.

PEARL, Laurence H. et al. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 166–180, 2015.

PENG, Jing; SENGUPTA, Surojeet; JORDAN, V. Potential of Selective Estrogen Receptor Modulators as Treatments and Preventives of Breast

Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 481–499, 2012.

PENG, Kuan Wei et al. Unexpected hormonal activity of a catechol equine estrogen metabolite reveals reversible glutathione conjugation. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1374–1383, 2010.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PETRY, Andreas; WEITNAUER, Michael; GÖRLACH, Agnes. Receptor activation of NADPH oxidases. **Antioxidants and Redox Signaling**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 467–487, 2010.

PETTIGREW, Christopher A.; CLERKIN, John S.; COTTER, Thomas G. DUOX enzyme activity promotes AKT signalling in prostate cancer cells. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 5175–5182, 2012.

PRAT, Aleix et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 68–86, 2010.

PULCRANO, Melania et al. Poorly differentiated follicular thyroid carcinoma: Prognostic factors and relevance of histological classification. **Thyroid**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 639–646, 2007.

QI, Ran et al. DUOX2 expression is increased in Barrett esophagus and cancerous tissues of stomach and colon. **Gastroenterology Research and Practice**, [s. l.], v. 2016, 2016.

RAKHA, Emad A.; REIS-FILHO, Jorge S.; ELLIS, Ian O. Basal-like breast cancer: A critical review. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 15, p. 2568–2581, 2008.

RANGEL, Maria C. et al. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. **American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 180, n. 6, p. 2188–2200, 2012.

REYA, Tannishtha et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, [s. l.], v. 414, n. 11, p. 105–111, 2001.

RHODES, A. et al. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: Correlation with patient age, assay sensitivity, threshold valued and mammographic screening. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 688–696, 2000.

RICHARDSON, Lisa et al. Re: Ethnicity and breast cancer: Factors influencing differences in incidence and outcome (multiple letters) [1]. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 97, n. 21, p. 1619–1620, 2005.

ROY, Krishnendu et al. NADPH oxidases and cancer. **Clinical Science**, [s. l.], v. 128, n. 12, p. 863–875, 2015.

RUSSNES, Hege G. et al. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. **American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 2017.

SADOK, Amine et al. Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1783, n. 1, p. 23–33, 2008.

SI, Jin et al. NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NF- $\kappa$ B in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 22, p. 16244–16255, 2007.

SKONIECZNA, Magdalena et al. NADPH Oxidases (NOX): Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2017, 2017.

SMITH, Gilbert H. Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. **Development**, [s. l.], v. 132, n. 4, p. 681–687, 2005.

SOSA, Venus et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

SPENCER, Netanya Y. et al. Control of hepatic nuclear superoxide production by glucose 6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase-4. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 286, n. 11, p. 8977–8987, 2011.

TAN, Duan Jun; BAI, Ren Kui; WONG, Lee Jun C. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 972–976, 2002.

THANNICKAL, Victor J.; FANBURG, Barry L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, [s. l.], v. 279, n. 6 23-6, 2000.

TIAN, Hui et al. DNA damage response - A double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 358, n. 1, p. 8–16, 2014.

TRENTI, Annalisa et al. The Glycolytic Enzyme PFKFB3 Is Involved in Estrogen-Mediated Angiogenesis via GPER1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 361, n. 3, p. 361–398, 2017.

TSUI, Kuan Hao et al. DHEA protects mitochondria against dual modes of apoptosis and necroptosis in human granulosa HO23 cells. **Reproduction**, [s. l.], v. 154, n. 2, p. 101–110, 2017.

USHIO-FUKAI, Masuko; NAKAMURA, Yoshimasa. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 266, n. 1, p. 37–52, 2008.

VAQUERO, Eva C. et al. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 33, p. 34643–34654, 2004.

VISVADER, Jane E.; STINGL, John. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: Current status and perspectives. **Genes and Development**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1143–1158, 2014.

WALLACE, D. C. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, [s. l.], v. 70, p. 363–374, 2005.

WANG, J. et al. Cancer-derived immunoglobulin G promotes tumor cell growth and proliferation through inducing production of reactive oxygen species. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 4, n. 12, 2013.

WEINBERG, Frank; RAMNATH, Nithya; NAGRATH, Deepak. Reactive oxygen



species in the tumor Microenvironment: An overview. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 1191, p. 1–20, 2019.

WEITZMAN, Sigmund A.; GORDON, Leo I. Inflammation and cancer: Role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. **Blood**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 655–663, 1990.

WOO, Yu Mi et al. Inhibition of aerobic glycolysis represses Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  axis and restores tamoxifen sensitivity in antiestrogen-resistant breast cancer cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1–18, 2015.

XIA, Chang et al. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. **Cancer Research**, [s. l.], v. 67, n. 22, p. 10823–10830, 2007.

YAMAURA, Maki et al. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. **Cancer Research**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 2647–2654, 2009.

YAN, Huan; GUO, Bi Ying; ZHANG, Shu. Cancer-associated fibroblasts attenuate Cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells by promoting STAT3 signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 470, n. 4, p. 947–954, 2016.

YANG, Qi; HOU, Peng. Targeting PFKFB3 in the Endothelium for Cancer Therapy. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 197–200, 2017.

YANG, Wenyong et al. Redox regulation of cancer metastasis: Molecular signaling and therapeutic opportunities. **Drug Development Research**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 331–341, 2014.

YIP, C. H. et al. Factors affecting estrogen receptor status in a multiracial Asian country: An analysis of 3557 cases. **Breast**, [s. l.], v. 20, n. SUPPL. 2, p. S60–S64, 2011.

ZHOU, Xiaoxu et al. Signaling in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced increase in cell proliferation in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 339, n. 1, p. 218–227, 2011.