

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Patologia

Felipe Henrique de Souza Silva

**A EXPRESSÃO DE SOX3 MODULA AS VIAS DE APOPTOSE E TRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA
HUMANO**

Belo Horizonte
2022

Felipe Henrique de Souza Silva

**A EXPRESSÃO DE SOX3 MODULA AS VIAS DE APOPTOSE E TRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA
HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

Coorientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Belo Horizonte
2022

SI586e Silva, Felipe Henrique de Souza.
A expressão de SOX3 modula as vias de Apoptose e Transição Epitélio-Mesênquima em Carcinoma Ductal Invasivo de mama humano [manuscrito]. / Felipe Henrique de Souza Silva. - - Belo Horizonte: 2022. 148f.: il.

Orientador (a): Helen Lima Del Puerto.
Coorientador (a): Ênio Ferreira.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama. 2. Fatores de Transcrição. 3. Fatores de Transcrição SOXB1. 4. Apoptose. 5. Dissertação Acadêmica. I. Del Puerto, Helen Lima. II. Ferreira, Ênio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 870



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“A Expressão de SOX3 Modula as Vias de Apoptose e Transição Epitélio-mesênquima em Carcinoma Ductal Invasivo de Mama Humano”

FELIPE HENRIQUE DE SOUZA SILVA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Fabiana Alves - Instituto Metodista Izabela Hendrix

Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto - UFG/GO

Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes - ICB/UFMG

Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz - ICB/UFMG

Prof. Dr. Enio Ferreira - ICB/UFMG - COORIENTADOR

Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto - ICB/UFMG – ORIENTADORA

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2022, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Usuário Externo**, em 01/04/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Alves, Usuária Externa**, em 01/04/2022, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 03/04/2022, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?



[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **1330014** e o código CRC **9028F7EA**.

Referência: Processo nº 23072.210724/2022-35

SEI nº 1330014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 442 DE FELIPE HENRIQUE DE SOUZA SILVA

Realizou-se, no dia 24 de fevereiro de 2022, às 14 horas, por videoconferência, plataforma online, a defesa de Tese, intitulada “**A Expressão de SOX3 Modula as Vias de Apoptose e Transição Epitélio-mesênquima em Carcinoma Ductal Invasivo de Mama Humano**”, apresentada por **Felipe Henrique de Souza Silva**, número de registro **2017721969**, graduado no curso de **Ciências Biológicas**, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Fabiana Alves** - Instituto Metodista Izabela Hendrix; **Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto** – UFG/GO; **Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes** – ICB/UFMG; **Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz** – ICB/UFMG; **Prof. Dr. Enio Ferreira** - COORIENTADOR – ICB/UFMG; **Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto** – ICB/UFMG – ORIENTADORA.

A Comissão considerou a Tese:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2022.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2022, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Usuário Externo**, em 01/04/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Alves, Usuária Externa**, em 01/04/2022, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 03/04/2022, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1330009** e o código CRC **58F64554**.

Referência: Processo nº 23072.210724/2022-35

SEI nº 1330009



Este trabalho foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular (LCC), em colaboração com o Laboratório de Patologia Comparada (LPC), no Departamento de Patologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Dedico este trabalho aos amores da minha vida, Simone e Fernanda.

Aos cientistas brasileiros que, apesar de todas as dificuldades, buscam promover melhorias que impactam na vida do nosso povo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda bondade! Por ser uma força diária, me fazendo transpassar por todas as dificuldades e enxergar o meu alvo! Pela Sua graça, finalizo esta etapa e grande sonho!

A minha amada esposa, Simone! Venci mais uma etapa ao seu lado. Tudo que conquisto tem mérito seu, pois caminhamos juntos. Muito obrigado por todo seu esforço, por acreditar no meu sonho e viver ele juntamente comigo. Te amo!

A minha filha, Fernanda, que chegou no meio dessa trajetória, trazendo uma alegria inacreditável! Sou renovado a cada simples fala de “O papai chegou!” Te amo filha!

Aos meus pais, Alex e Diva, por nunca duvidarem da minha capacidade. Desde criança almejava sonhos altos, com objetivos audaciosos, mas em nenhum momento fui desencorajado. Chegar onde cheguei também é mérito de vocês! Amo vocês!

A minha irmã, Lorryne, por viver o momento ao meu lado! Muito obrigado pela sua presença. Te amo!

A minha orientadora, Helen, exemplo de professora, educadora, cientista. Muito obrigado por ter acreditado no meu potencial, dando credibilidade ao meu trabalho e concedido a honra de ser seu primeiro aluno de doutorado. Sou marcado pela sua trajetória e tudo que eu vir a conquistar será, também, mérito seu!

Ao meu coorientador, Enio, muito obrigado pelo ótimo professor e orientador. Sua forma de orientar e ensinar é diferenciada, aprendi muito com seu exemplo. Podemos sofrer, mas que seja rindo e com leveza!

Agradeço a todos do Laboratório do Comportamento Celular (LCC). Laboratório que ajudei a fundar, organizar, faxinar, pintar, inventariar.... Fazer parte da história desse laboratório marcou minha trajetória e levo para minha vida. Laboratório com perfil familiar, que tudo girava em torno de ciência e muita comida (hahahahahah). Muito obrigado a todos os alunos que estiveram comigo durante esta jornada!

Um agradecimento mais que especial ao melhor grupo de amigos cientistas, aos meus “amadinhos”, Bárbara, Bruna, Camila, Emerson e Thais! Agradeço a Deus pela vida de vocês, tudo foi mais leve ao lado de vocês. Amigos que ganhei durante essa batalha, estando todos no mesmo barco e entendendo as lutas e humilhações (hahahaha)! Sei que vou sentir falta do convívio diário, de marmitar com vocês, dos lanches programados e não programados, e claro dos doces! Mas ao mesmo tempo sei que vão permanecer, nossa amizade é forte, e fizemos juramentos de confidencialidade!! Quem descumprir não será convidado para a “Festa Food”! Muito obrigado amigos! Amo vocês!

A minha vó, Maria, mais uma vitória conquistada a base de suas orações! Obrigado vó por todo suporte, por se fazer presente nesse momento e se alegrar com minhas conquistas! Te amo!

Ao meu avô, Severino (in memoriam), que sempre enxergou o melhor de mim. Infelizmente vó o senhor não presenciou minhas vitórias acadêmicas, mas sempre serei grato pelos seus ensinamentos.

A minha vó, Sônia (in memoriam), enquanto esteve presente, foi com excelência, sempre vibrou com minhas conquistas. Hoje poderia dizer “Meu neto é doutor”! Sinto muito por não presenciar vó! Mas cheguei lá!

A toda minha família, Fontoura e Silva. Aos meus tios, tias, primos e primas, todos vocês merecem reconhecimento, parte do que sou como pessoa, devo a vocês. Muito obrigado!

Aos meus tios, Delmo e Dinéia, que sempre foram exemplos em minha vida. Se importando com essa trajetória, que também vivenciam. Muito obrigado pelo apoio de vocês!

A minha sogra, Beth, que esteve presente em todas as etapas, sempre dando suporte quando necessário. Alcanço este sonho com sua ajuda e apoio! Muito obrigado!

Aos meus amigos, Thalles e Hadassa, que sempre estiveram presentes, mesmo estando ausentes fisicamente. Essa amizade que foi interestadual, intermunicipal, mas sempre foi forte! Nossos encontros mostram que realmente o tempo passa, nós mudamos, mas amizade é amizade! Amo vocês e a família linda que construíram!

Aos meus amigos, Grazi e Fabrício, agradeço a Deus pela vida de vocês. Pela amizade fiel que construímos, por estarem em momentos importantes da minha vida e da minha família. Por se fazerem presentes nas necessidades, todos os conselhos, jantares, almoços, dias regados a comida e muita conversa! Amo vocês!

A todos da Igreja Batista Ministério Moriá, por todas as orações, e cuidado comigo e com minha família!

Agradeço a todos os professores que já passaram por minha vida! Desde o ensino básico, graduação, mestrado e doutorado. Acredito na educação como instrumento de transformação! Muito obrigado por toda dedicação!

Em especial, agradeço a todos os professores, coordenadores, e secretárias do programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, por todo conhecimento, estrutura e suporte nos momentos necessários.

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais, por todo suporte acadêmico, estrutura física e espaços de convivência. Por proporcionar essa experiência de conhecimento, formação e desenvolvimento pessoal.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, assim como as agências de fomento FAPEMIG e CNPq, pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

“Quem se arrisca a andar por ares nunca antes respirados ou pensar fora da curva tem grandes chances de encontrar pedras no caminho. No entanto, ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônias nesse processo. Não há céu sem tempestade. Risos e lágrimas, sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas ideias.”

Augusto Cury, 2014

RESUMO

O câncer de mama é uma das doenças que mais matam mulheres em todo o mundo. Por ser considerado uma doença complexa e com comportamento dinâmico, é necessário a busca de novos marcadores tumorais e de alvos terapêuticos. As proteínas que atuam como fatores de transcrição tem sido alvo de estudo nas neoplasias pelo seu importante papel na transcrição de genes que codificam proteínas oncogênicas ou supressoras tumorais. Dentre os fatores de transcrição importantes no destino da diferenciação celular e do processo de desenvolvimento dos órgãos e tecidos, as proteínas da família SOX tem se destacado como alvo no estudo das neoplasias, dentre elas a proteína SOX2 e SOX14, membros do mesmo subgrupo da proteína SOX3, ainda pouco estudada. Com o objetivo de estudar o papel da proteína SOX3 na regulação da apoptose e da transição epitélio-mesênquima (TEM) em neoplasias mamárias, a linhagem celular MDA-MB-231, proveniente de carcinoma ductal invasivo de mama, foi selecionada como modelo experimental por não expressar a proteína SOX3, e apresentar um fenótipo mais agressivo (Triplo-negativo). Portanto, para cumprir o objetivo do presente trabalho, a região que codifica a proteína SOX3 humana foi subclonada no vetor de expressão pEF1/Myc-His usando uma sequência SOX3 amplificada a partir de DNA genômico humano. As células MDA-MB-231 foram cultivadas e transfectadas com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3, e como controle foram utilizadas células sem tratamento e células transfectadas com vetor vazio pEF1/Myc-His. Após 24 horas da transfecção, foi avaliado a citotoxicidade por teste de viabilidade-MTT, a porcentagem de células em apoptose por citometria de fluxo usando o protocolo de Anexina V-FITC/PI, e a expressão dos genes envolvidos na apoptose e na TEM por qPCR: *SOX3*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX* e *BCL2*, *ECAD*, *NCAD*, *SNAIL*, *ZEB1* e *ZEB2*. Os resultados indicaram uma redução de 55% da viabilidade das células transfectadas com pEF1/Myc-His/SOX3, em relação aos seus controles, corroborando com os resultados da porcentagem de apoptose por citometria de fluxo nas células transfectadas com pEF1/Myc-His/SOX3 (52%) quando comparados ao controle não transfectado (10%) e ao vetor vazio (13%). Os resultados da qPCR indicaram maior expressão gênica de *CASP3* (3,26 vezes), *CASP8* (2,24 vezes), *CASP9* (18,54 vezes), *BAX* (4,11 vezes) e, menor expressão gênica de *BCL2* (0,40 vezes) em comparação com o controle não transfectado. Já a avaliação dos genes relacionados a TEM demonstraram menor expressão de mRNA de *NCAD* (0,06 vezes), *SNAIL* (0,18 vezes), *ZEB1* (0,15 vezes), *ZEB2* (0,11 vezes) e uma maior expressão de *ECAD* (27 vezes). Deste modo, os resultados do presente estudo suportam a hipótese de que *SOX3* é um fator de transcrição com envolvimento na regulação dos genes pró-apoptóticos e do fenótipo epitelial, com possível ação supressora de tumor, e a perda da sua expressão é um indicativo de resistência a apoptose e de favorecimento da TEM. Futuros estudos funcionais, assim como a investigação da expressão dessa proteína em tecidos de tumor de mama, correlacionados as características clínicas e de prognóstico tumoral, devem ser realizados para melhor elucidar o papel dessa proteína no câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Fatores de Transcrição. SOX3. Apoptose. MDA-MB-231

ABSTRACT

Breast cancer is one of the diseases that kill most women worldwide. It is considered a complex disease with dynamic behavior, it is necessary to search for new tumor markers and therapeutic targets. Proteins that act as transcription factors have been studied in neoplasms due to their important role in the transcription of genes that encode oncogenic proteins or tumor suppressors. Among the transcription factors important in the cell fate, differentiation, and organ and tissues development, the SOX family proteins have been highlighted as a target in the study of cancer, among them SOX2 and SOX14, members of the same subgroup of the SOX3 protein, still little studied. To study the role of the SOX3 protein in the regulation of apoptosis in the epithelium-mesenchymal transition (EMT) in mammary neoplasms, the cell line MDA-MB-213, from invasive ductal breast carcinoma, was selected as an experimental model because it does not express the protein SOX3, and show a more aggressive phenotype (Triple-negative). Therefore, to fulfill this objective, the region encoding the human SOX3 protein was subcloned into the pEF1/Myc-His expression vector using a SOX3 sequence amplified from human genomic DNA. MDA-MB-231 cells were cultured and transfected with the pEF1/Myc-His/SOX3 vector, and untreated cells and cells transfected with empty pEF1/Myc-His vector were used as controls. After 24 hours of transfection, cytotoxicity was evaluated by viability test-MTT, the percentage of cells undergoing apoptosis was determined by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI protocol, and qPCR was performed to evaluate gene expression of apoptotic and epithelial-mesenchymal pathways: *SOX3*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *BCL2*, *ECAD*, *NCAD*, *SNAIL*, *ZEB1* and *ZEB2*. Results indicated a reduction of 55% in cells transfected with pEF1/Myc-His/SOX3 viability, in relation to their controls, corroborating the results of the percentage of apoptosis by flow cytometry in cells transfected with pEF1/Myc-His/SOX3 (52%) when compared to the untransfected control (10%) and the empty vector control (13%). Real-time PCR results for apoptosis-related genes demonstrated upregulation of mRNA expression of *CASP3* (3.26-fold), *CASP8* (2.24-fold), *CASP9* (18.54-fold) *BAX* (4.11-fold), and downregulation of *BCL2* mRNA expression (0.40-fold) compared to the untransfected control. The evaluation of genes related to the epithelium-mesenchymal transition showed downregulation of *NCAD* (0.06-fold), *SNAIL* (0.18-fold), *ZEB1* (0.15-fold), *ZEB2* (0.11-fold), mRNA expression, and upregulation of *ECAD* mRNA expression (27-fold). Thus, the present study results support the hypothesis that *SOX3* is a transcription factor involved in the regulation of pro-apoptotic genes and epithelial phenotype maintenance, with a possible tumor suppressor action. So, the loss of its expression indicates resistance to apoptosis and favoring EMT. Future functional studies and the investigation of the expression of this protein in breast tumor tissues, correlated with clinical characteristics and tumor prognosis, should be performed to better elucidate the role of this protein in breast cancer.

Keywords: Breast Cancer. Transcription Factors. SOX3. Apoptosis. MDA-MB-231

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais características no favorecimento e estabelecimento tumoral.....	27
Figura 2: Vias moleculares na indução da morte por apoptose.....	29
Figura 3: Estimativa mundial da incidência dos diferentes tipos de câncer para o ano de 2020.	30
Figura 4: Representação espacial das taxas de mortalidade por câncer de mama, por 100 mil mulheres no ano de 2019.	31
Figura 5: Origem dos carcinomas mamários.....	33
Figura 6: Subtipos de câncer de mama em relação ao perfil de expressão molecular	36
Figura 7: Transição epitélio-mesênquima (TEM) e transição mesênquima-epitélio (TME) durante a progressão do tumor de mama.	38
Figura 8: Envolvimento da SOX em diferentes tumores. As setas indicam a regulação.	40
Figura 9: Vetor de expressão pEF1/Myc-His utilizado para clonagem de SOX3.	46
Figura 10: Alterações morfológicas na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor de GFP na presença e ausência de SFB/Antibiótico e em diferentes concentrações de Lipofectamine 2000.	59
Figura 11: Avaliação da eficiência da transfecção com vetor de GFP na linhagem tumoral MDA-MB-231 na presença e ausência de SFB/Antibiótico e em diferentes concentrações de Lipofectamine 2000.	60
Figura 12: Contagem de células marcadas após a transfecção com vetor de GFP na linhagem tumoral MDA-MB-231 na presença e ausência de SFB/Antibiótico e em diferentes concentrações de Lipofectamine 2000.	61
Figura 13: Expressão de SOX3 na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3.	62
Figura 14: Expressão de CASP3 e CASP8 na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3.....	63
Figura 15: Expressão de Bax e Bcl-2 na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3.....	64
Figura 16: Expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem tumoral MCF- 7.	65

Figura 17: Ausência de expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor vazio pEF1/Myc-His/SOX3.	66
Figura 18: Expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3.	67
Figura 19: Alterações morfológicas na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His..	69
Figura 20: Avaliação do efeito citotóxico na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.	70
Figura 21: Dot-plot representativo de cada condição na avaliação da morte celular apoptótica na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.	71
Figura 22: Taxa de apoptose na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3.	73
Figura 23: Avaliação da expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.	75
Figura 24: Avaliação da expressão de genes relacionados a transição epitélio-mesênquima na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His..	77
Figura 25: Avaliação por imunohistoquímica da expressão de SOX3 e pró-Caspase-3 em amostras de carcinoma ductal invasivo de mama humano.	79
Figura 26: Esquema da expressão de genes apoptóticos em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor de expressão pEF1/Myc-His/SOX3.	82
Figura 27: Esquema da expressão de genes da transição epitélio-mesênquima em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor de expressão pEF1/Myc-His/SOX3.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fatores de risco na incidência de câncer de mama em mulheres.	32
Tabela 2: Grupos da família SOX	39
Tabela 3: Primer para clonagem e condições de anelamento para SOX3. Fonte do DNA genômico para amplificação do gene SOX3: Thermo: MHS6278-202857278 – California – EUA.	46
Tabela 4: Grupos experimentais na padronização da transfecção com GFP.....	47
Tabela 5: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.	51
Tabela 6: Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas na imunohistoquímica.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
ATCC	Do inglês “American Type Culture Collection”
ATM	Gene mutado na ataxia telangectasia
ATR	Cinase relacionada à ATM
BAX	Do inglês “BCL-2 associated protein X”
Bcl-2	Do inglês “B-cell lymphoma 2”
BSA	Proteína Albumina de Soro Bovino
CDH1	Caderina 1
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CHK1	Checkpoint quinase 1
CHK2	Checkpoint quinase 2
CO ₂	Gás Carbônico
DAPI	Dicloreto de diaminofenilindol (4'-6-diamino-2-fenilindol)
DMEM	Do inglês “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Enzima Desoxirribonuclease
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA
ECAD	Gene E-caderina
RE	Receptor de Estrogênio
RE α	Receptor alfa de Estrogênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Do inglês “Green fluorescent protein”
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico
HMG-box	Grupo de alta mobilidade
RH	Receptores Hormonais
IARC	Do inglês “International Agency for Research on Cancer”

INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki-67	Marcador de proliferação
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma ductal invasivo de mama
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma ductal invasivo de mama
MDM2	Proteína homóloga ao gene 2 double minute camundongo
Mg	Miligrama
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio]
ng	Nanograma
NCAD	Gene N-caderina
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Persulfato de Amônio
PBS	Tampão Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Iodeto de Propídeo
RP	Receptor de Progesterona
p53	Proteína 53
RT-qPCR quantitativa	Transcrição reversa com reação em cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Enzima Ribonuclease
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição reversa com reação em cadeia da Polimerase
S26	Subunidade da proteína ribossomal
SFB	Soro Fetal Bovino
SNAIL	Do inglês “Family Transcriptional Repressor”
SOX	SRY (sex determining region Y)-box
Sry	Fator de determinação testicular
TBE	Tampão TRIS/Borato/EDTA
TEM	Transição epitélio-mesênquima

TME	Transição mesênquima-epitélio
TEMED	Agente polimerizante (NNN'N'-tetra metil etileno diamina)
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ZEB1	Do inglês "Zinc-Finger E-box Binding 1"
ZEB2	Do inglês "Zinc-Finger E-box Binding 2"

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Câncer	25
2.2 Câncer de mama – Etiologia e Epidemiologia.....	27
2.2.1 Subtipos de Câncer de Mama	32
2.2.2 Transição epitélio-mesênquima no Câncer de Mama.....	36
2.3 Família SOX	39
2.3.1 SOX3	41
2.3.2 SOX no câncer de mama	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E METÓDOS	45
4.1 Linhagens Celulares.....	45
4.2 Cultivo Celular.....	45
4.3 Vetor de expressão de SOX3	45
4.4 Plaqueamento das células MDA-MB-231	47
4.5 Padronização da reação de transfecção das células MDA-MB-231 com Lipofectamine 2000 com vetor GFP.....	47
4.6 Transfecção das células MDA-MB-231 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	48
4.7 Avaliação da citotoxicidade do protocolo de transfecção nas células MDA-MB-231 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	49
4.8 Extração de RNA total da linhagem celular MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	49

4.9	Transcrição reversa e PCR convencional	50
4.10	Eletroforese após a RT-PCR	52
4.11	PCR em tempo real	52
4.12	Imunofluorescência para SOX3 em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	53
4.13	Avaliação da morte celular por apoptose na linhagem MDA-MB-231 transfectada com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	54
4.14	Aspectos éticos	55
4.15	Delineamento do estudo	55
4.16	Seleção das amostras	55
4.17	Imunohistoquímica.....	56
4.18	Análise estatística.....	57
5.	RESULTADOS	58
5.1	Transfecção das células MDA-MB-231 com vetor PGL3-GFP utilizando Lipofectamine 2000.....	58
5.2	Avaliação da expressão gênica de <i>SOX3</i> , <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3	61
5.3	Imunofluorescência para SOX3 em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	64
5.4	Avaliação da citotoxicidade e morte celular apoptótica na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.....	68
5.5	Avaliação por PCR em tempo real a expressão de <i>SOX3</i> , <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>CASP9</i> , <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.....	74
5.6	Avaliação por PCR em tempo real a expressão de genes relacionados a transição epitélio-mesênquima, <i>ECAD</i> , <i>NCAD</i> , <i>SNAIL</i> , <i>ZEB1</i> , <i>ZEB2</i> na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His	76
5.7	Avaliação da expressão e imunolocalização de SOX3 e pró-Caspase-3 em amostras de carcinoma ductal invasivo humano.....	78

6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO I	100
ANEXO II	133

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia feminina mais comum no Brasil, sendo um importante problema de saúde pública. Segundo estimativas do INCA é previsto cerca de 66 mil novos casos de câncer de mama por ano, para o triênio 2020-2022. Este dado reforça um comportamento de incidência mundial, tornando o câncer de mama um grande alvo no desenvolvimento de novos estudos.

Os tumores mamários possuem uma alta diversidade histológica e molecular, sendo o carcinoma ductal invasivo o tipo histológico mais comum, com cerca de 75% de todos os casos. Em relação aos fatores moleculares, destaca-se os tumores classificados como triplo negativos, que representa aproximadamente 20% de todos os tumores da mama e é caracterizado pela falta de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, como também HER2.

Outro importante fator no estabelecimento da resistência dos tumores triplo negativos, é a transição epitélio-mesênquima, mecanismo onde as células epiteliais adquirem o perfil mesenquimal, favorecendo a perda de adesão, migração, invasão e resistência a morte celular. Este mecanismo só possível devido a modulação de importantes fatores de transcrição, principalmente *E-Caderina*, *N-Caderina*, *SNAIL*, *ZEB1* e *ZEB2*. Portanto a investigação de fatores de transcrição que possam atuar como supressores tumorais, regulando importantes mecanismos de resistência, como controle de proliferação, ciclo celular, morte apoptótica, torna-se relevante.

A família SOX representa mais de 20 genes relacionados a vários processos do desenvolvimento saudável do organismo humano, incluindo diferenciação celular, diferenciação sexual, organogênese, como também um papel na tumorigênese. Muitos membros da família SOX podem atuar como genes supressores de tumor, oncogenes ou ambos, estando a função condicionada ao ambiente celular. Dentro deste grupo, temos o gene SOX3.

A proteína SOX3 é um fator de que desempenha papel fundamental em diferentes processos da neogênese, desenvolvimento da hipófise, da região crânio facial e na diferenciação celular testicular. Diversos trabalhos têm relatado a expressão e função de SOX3 em diferentes tumores, sendo que o mesmo demonstra um padrão diferenciado de função em cada tipo tumoral. No câncer de mama o papel de SOX3 ainda é pouco explorado, quando comparado a

outros membros da família SOX, mostrando uma necessidade no entendimento da sua expressão e participação na regulação de importantes mecanismos de indução de morte

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O corpo humano é formado por trilhões de células, e durante a vida humana, estas células precisam se dividir, renovar, serem destinadas a morte, em um processo natural de reciclagem celular. Os seres vivos multicelulares, possuem a sua proliferação celular controlada, liberando estímulos para proliferação somente diante a necessidade de divisão. Todo esse processo é altamente controlado pelo “ciclo celular”, onde vai ocorrer eventos de duplicação do material genético e dos componentes celular, formando novas células.

O ciclo celular é um processo biológico passível de erros, e a principal forma de identificar os erros é através dos pontos de checagem ou do inglês “Checkpoint”. Nestes pontos de checagem importantes proteínas sensoras, como: ATM (Gene mutado na ataxia telangectasia) /ATR (cinase relacionada à ATM) e DNA-PK (proteína quinase dependente de DNA), reconhecem os erros de duplicação genética e transmitem informações para proteínas efetoras como: CHK1 (Checkpoint quinase 1), CHK2 (Checkpoint quinase 2), MDM2 (Proteína homóloga ao gene 2 double minute camundongo) e p53 (Proteína 53). As proteínas efetoras, por sua vez, irão gerar respostas ao dano celular encontrado, sendo as principais: parada do ciclo celular, reparo ou a indução a morte celular programada (PHAN; CROUCHER, 2020; STOLAROVA *et al.*, 2020).

A desregulação do ciclo celular e o escape de células mutadas, que não respondem aos sinais de parada e reparo dos pontos de checagem, favorecem a ocorrência de um crescimento celular descontrolado, tornando estas células potencialmente tumorais. Após o estabelecimento e proliferação destas células, forma-se o que é conhecido como câncer (PHAN; CROUCHER, 2020).

Câncer é o termo utilizado para denominar um grupo extenso de doenças com importante impacto na mortalidade mundial, sendo determinante na diminuição da expectativa de vida da população. No ano de 2020 a Organização Mundial de Saúde (OMS), através da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC) publicou seu estudo sobre incidência de neoplasias em escala mundial, o GLOBOCAN 2020.

De acordo com o trabalho era previsto cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer, levando em consideração todos os tipos de tumores incidentes em ambos os sexos e todas as idades. Dentro desta previsão, estimou-se cerca de 10 milhões de mortes em todo o mundo. Outro importante dado é em relação a extrapolação de casos no futuro, onde determinaram que no ano de 2040 a incidência será de 28,4 milhões de novos casos, representando um aumento expressivo de 47% em relação ao ano de 2020 (SUNG *et al.*, 2021).

As causas do câncer estão relacionadas a diferentes fatores de risco, sendo eles por comportamentos individuais, como tabagismo, alcoolismo, dieta e exposição à radiação ionizante, ou fatores chamados de intrínsecos como mutações genéticas, hereditariedade e condições imunes. Ambos os grupos de fatores podem agir de forma individual, ou conjunta, favorecendo o aparecimento de algum tumor (HULVAT, 2020).

O sucesso das células tumorais e seu estabelecimento, está relacionado a um conjunto de alterações que são essenciais para seu desenvolvimento. Hanahan & Weinberg, 2000, publicaram os primeiros passos no entendimento de importantes alterações que estão diretamente relacionadas ao sucesso do tumor, como a sinalização para proliferação, aumento da resistência a morte celular, potencial replicativo ilimitado, favorecimento da angiogênese, promoção da invasão e metástase, entre outros fatores. Após alguns anos estes sinais foram revisados e acrescidos alguns importantes fatores, principalmente mecanismos que atuam na modificação do microambiente tumoral, sinalizando para as células adjacentes, contribuindo para o crescimento do tumor (Figura 1) (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN; WEINBERG; 2000)

Figura 1: Principais características no favorecimento e estabelecimento tumoral



Fonte: Adaptado de (HANAHAN, 2022)

2.2 Apoptose

A apoptose é uma morte celular programada, altamente regulada e conservada evolutivamente. Desempenha importantes funções em processos fisiológicos, mantendo a homeostase celular, controlando processos de proliferação celular e indução de morte (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; VOSS; STRASSER, 2020).

O processo de morte celular apoptótica é caracterizado por um processo silencioso, onde ocorrem alterações morfológicas e não se desencadeia processos inflamatórios. Microscopicamente inicia-se um processo de perda de volume celular e condensação citoplasmática, picnose nuclear, formação de projeções membranares (blebs) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos por membrana nuclear, liberando os chamados, corpos apoptóticos (NEVES; BRINDLE, 2014).

A ativação da morte apoptótica é regulada por um complexo mecanismo bioquímico, onde ocorre a modulação de moléculas, principalmente da família das caspases, juntamente com a família de proteínas Bcl-2. As principais vias de ativação da apoptose são chamadas

de via intrínseca (via mitocondrial) e a via extrínseca (via de receptores de morte) (KACZANOWSKI, 2016).

A via extrínseca, também conhecida como via de receptor de morte, é uma das vias apoptóticas, onde o estímulo parte de um importante grupo de receptores, como o Fas (FasL – Ligante) e o TNFR-1 (Receptor do fator de necrose tumoral 1), que se ligam a receptores membranares, recrutando moléculas como pró-caspase-8 e consequente ativação de Caspase-8, para iniciar a via apoptótica através principalmente da ativação de Caspase-3 (D'ARCY, 2019; NEVES; BRINDLE, 2014) (Figura 2).

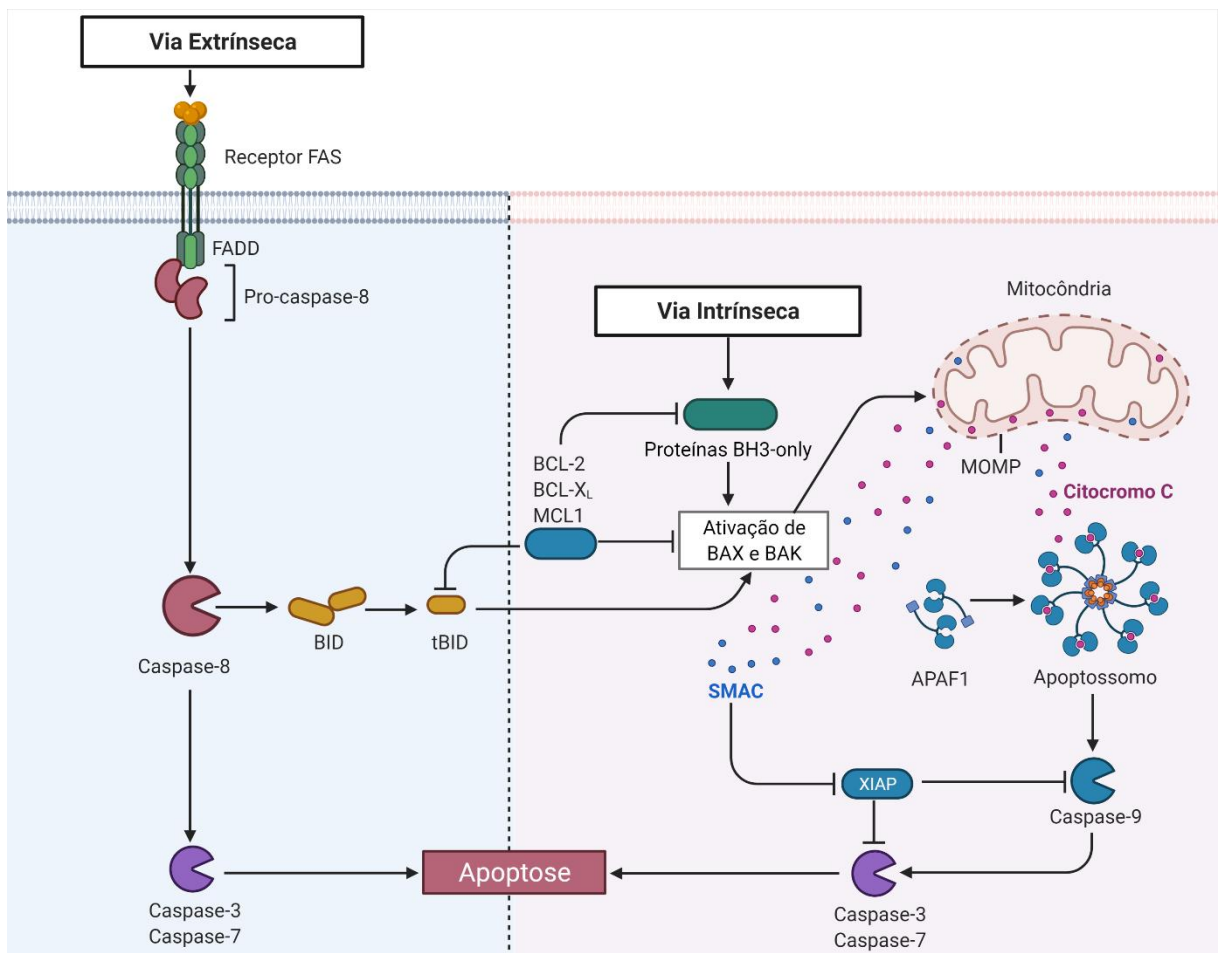
Em relação a via intrínseca ou via mitocondrial, sabe-se que a ativação é mediante a estímulos mitocondriais. Estes estímulos podem ser através de danos celulares por radiação ionizante, toxinas, ausência de oxigênio, desbalanço de radicais livres e infecções virais, como também estímulos hormonais e de fatores de crescimento. Estes estímulos externos principalmente ligados ao DNA, favorecem a um desequilíbrio, favorecendo a perda da integridade da membrana externa mitocondrial, formando poros que favorecem a liberação do citocromo C, que ao ser liberado se une ao APAF-1 (fator de ativação 1 da protease apoptótica) e ao CARD (Domínio de Recrutamento de Caspases), formando o apoptossomo. O apoptossomo por sua vez irá ativar caspases iniciadoras, principalmente a Caspase-9 (D'ARCY, 2019; GREEN; LLAMBI, 2015; NEVES; BRINDLE, 2014) (Figura 2).

Como citado anteriormente, ambas as vias apoptóticas são dependentes da ativação de moléculas ligadas a duas importantes famílias, as caspases e a família Bcl-2. A família de proteínas Bcl-2 encontra-se em um estado fisiológico de equilíbrio, mantendo a homeostase tecidual. Essa homeostase é mantida controlando a quantidade de proteínas, pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Mcl-1) (WARREN; WONG-BROWN; BOWDEN, 2019). Dentro da indução de apoptose a família Bcl-2 tem papel primordial na permeabilidade da membrana mitocondrial. A liberação do citocromo C na via intrínseca é regulada positivamente com a presença de BAX, representante pró-apoptótico, e em consequência regulado negativamente pela presença da proteína Bcl-2 (anti-apoptótico) (VOSS; STRASSER, 2020). Além do controle de permeabilidade da membrana mitocondrial, a família Bcl-2 também esta envolvida na ativação de caspases.

As caspases (proteases aspárticas de cisteína), estão envolvidas na manutenção da homeostase, através da regulação da apoptose, controlando a iniciação e execução da morte

celular por apoptose. Dentro da cascata de sinalização de indução de morte, encontra-se membros inativos, conhecidos como pró-caspase e após a transmissão de sinais intracelulares de ativação, as pró-caspases ativam as caspases, tornando-as funcionais. As caspases são classificadas como caspases iniciadoras (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12) e caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020). Após a ativação, as caspases iniciadoras induzem a ativação das caspases efetoras, promovendo o seguimento da via de indução de morte. Além da ativação direta de caspases, ocorre a sinalização de ativação de moléculas. Todo esse processo de cascata de caspases é irreversível, sendo finalizado somente no momento que a célula chega à morte (MORANA; WOOD; GREGORY, 2022).

Figura 2: Vias moleculares na indução da morte por apoptose.

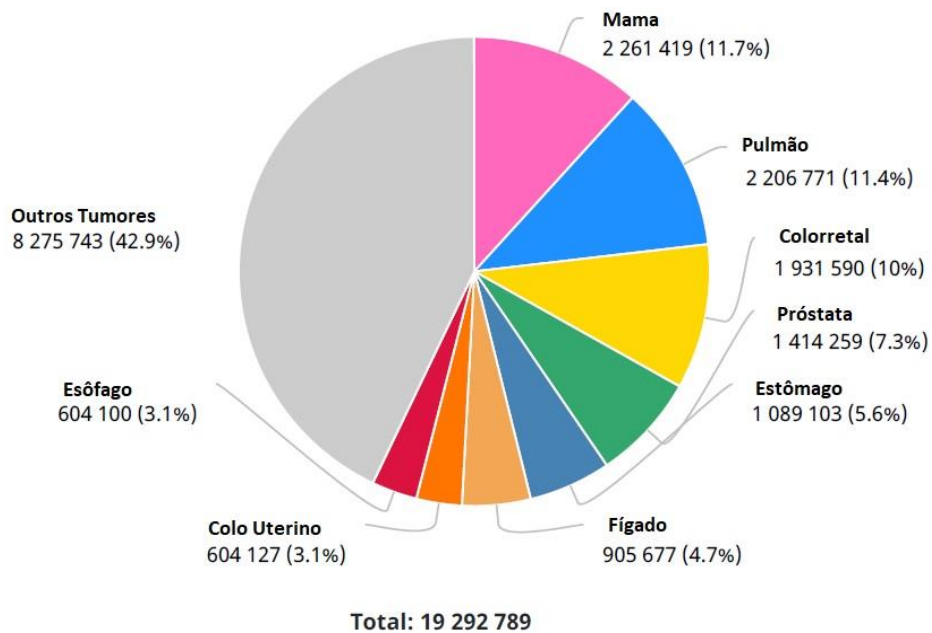


Fonte: Autoria do grupo de pesquisa – BioRender

2.3 Câncer de mama – Etiologia e Epidemiologia

O câncer de mama é uma compilação de diferentes neoplasias que afetam as glândulas mamárias. Dentro dos casos previstos para 2020, a pesquisa definiu que 11,7% (2,3 milhões) seriam de novos casos de câncer de mama. Essa taxa de incidência coloca o câncer de mama na posição de neoplasia com maior incidência na população mundial, dividindo essa posição, juntamente com câncer de pulmão (Figura 3). Além da alta taxa de incidência, o câncer de mama foi previsto como a neoplasia mais fatal em mulheres, sendo responsável por cerca de 685 mil óbitos em 2020 (SUNG *et al.*, 2021).

Figura 3: Estimativa mundial da incidência dos diferentes tipos de câncer para o ano de 2020.



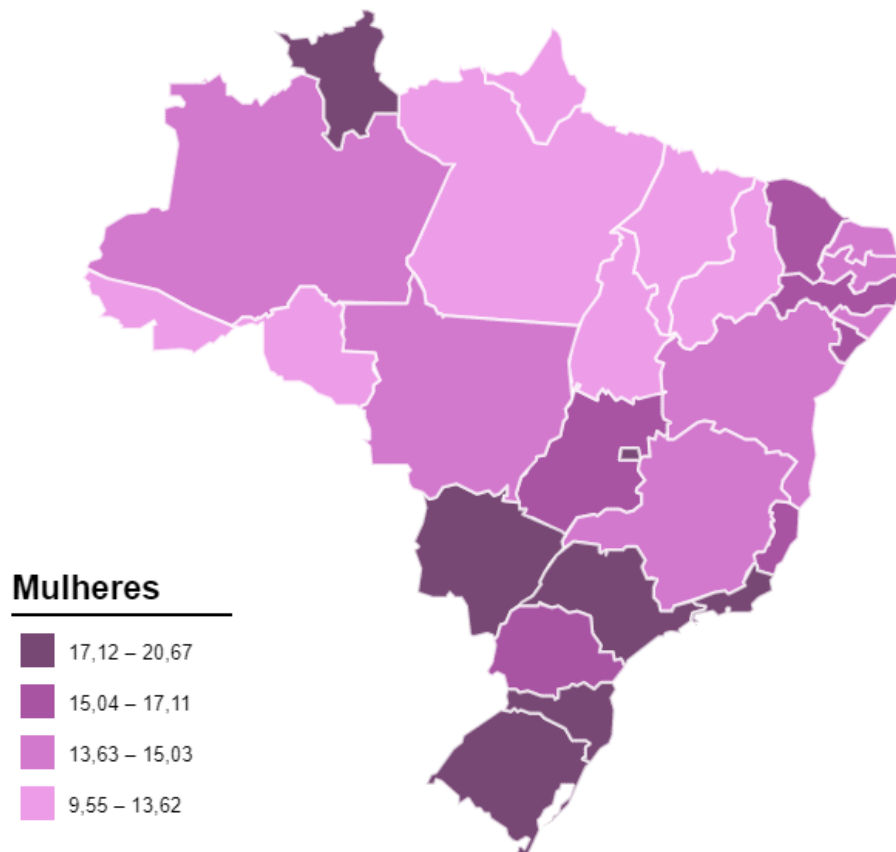
Fonte: Adaptado de SUNG *et al.*, 2021

No Brasil o câncer de mama é um relevante problema de saúde pública, correspondendo a grande parte dos novos casos de neoplasias que acometem mulheres a cada ano. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o triênio 2020-2022 é previsto a incidência de 66.280 casos/ano, representando 29,7% dos tumores ocorrentes nas mulheres (INCA, 2020). Esse dado reforça o comportamento e tendência mundial do câncer de

mama, colocando-o como mais incidente na população feminina e o de maior taxa de mortalidade (SUNG *et al.*, 2021).

No ano de 2017 segundo o INCA, ocorreram 16.724 óbitos de mulheres acometidas com câncer de mama (INCA, 2019). A alta taxa de mortalidade por câncer de mama é uma realidade de todas as regiões do Brasil. Sendo as maiores taxas de óbitos nas regiões Sudeste (16,14) e Sul (15,08) a cada 100 mil habitantes (Figura 4).

Figura 4: Representação espacial das taxas de mortalidade por câncer de mama, por 100 mil mulheres no ano de 2019.



Fonte: INCA, 2021

Como toda doença, o câncer de mama é cercado por fatores que favorecem a sua incidência. Alguns fatores que aumentam a incidência do câncer de mama, estão relacionados além do comportamento individual. Como por exemplo, o fato de ser mulher, aumenta em cerca de 100 vezes as chances de se desenvolver câncer de mama, quando comparado a um homem (FENG, Yixiao *et al.*, 2018).

Como as mulheres são o principal grupo de risco, a busca na determinação de fatores etiológicos dentro da população feminina, tornou-se uma área de estudo consolidada. A ligação do comportamento individual, fatores hormonais, reprodutivos, genéticos e hereditários, tem sido levado em consideração para avaliar o aumento da incidência e o impacto do câncer de mama nas mulheres (FENG, Yixiao *et al.*, 2018; LOIBL *et al.*, 2021).

Os principais fatores podem ser divididos conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Principais fatores de risco na incidência de câncer de mama em mulheres.

Fatores de risco relacionados a incidência de câncer de mama em mulheres		
Comportamentais e Ambientais	Reprodução e Hormonal	Genéticos e Hereditários
Idade	Primeira menstruação antes dos 12 anos	Histórico familiar de câncer de ovário
Obesidade e sobrepeso	Não ter tido filhos	Histórico familiar de câncer de mama principalmente antes dos 50 anos
Sedentarismo	Primeira gravidez após os 30 anos	Histórico familiar de câncer de mama em homens
Consumo de bebidas alcoólicas	Não ter amamentado	Alterações genéticas, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2
Alimentação	Menopausa após os 55 anos	
Exposição à radiação ionizante	Uso de contraceptivos hormonais Reposição hormonal pós menopausa	

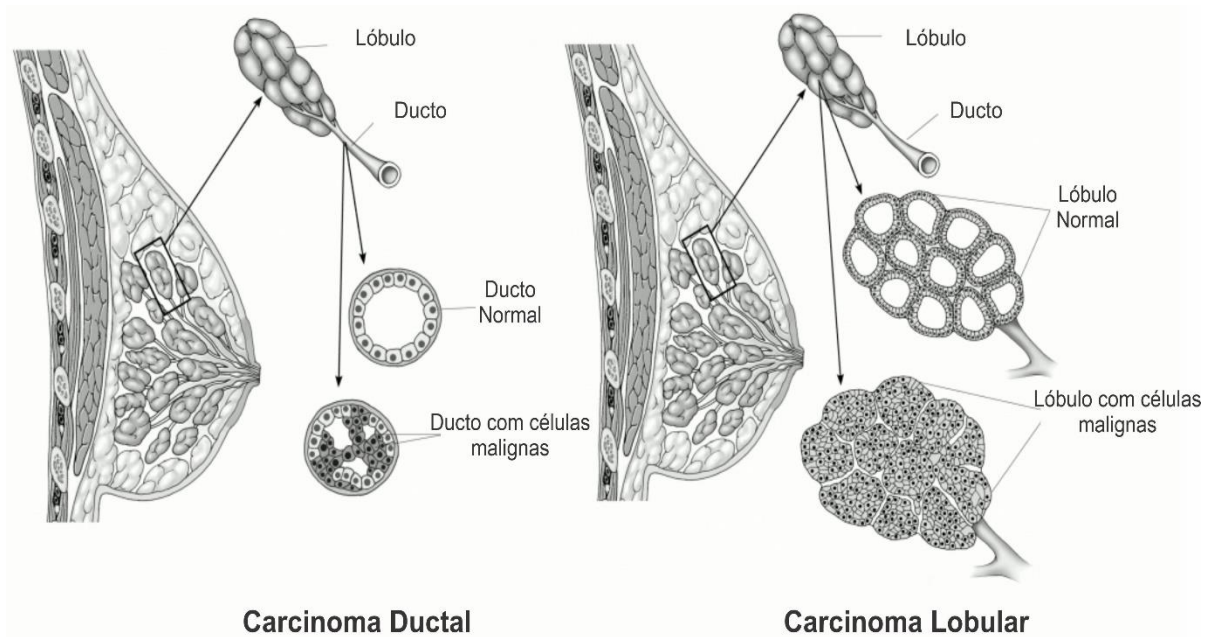
2.3.1 Subtipos de Câncer de Mama

A classificação dos tumores mamários pode ser feita em relação a duas categorias, a classificação histológica e a molecular. Em relação a classificação histológica, os tumores mamários são denominados carcinomas e possuem dois tipos, o carcinoma ductal, originado nos ductos mamários e o carcinoma lobular, que são originados nos lóbulos mamários (Figura 5). Ambos os carcinomas podem ser classificados como *in situ*, quando as células malignas

ficam delimitadas dentro dos ductos ou lóbulos, não invadindo o tecido adiposo adjacente e o tecido conjuntivo, já os carcinomas denominados invasivos ou infiltrantes, as células já ultrapassaram a delimitação, rompendo a barreira dos ductos e lóbulos, invadindo os tecidos mamários circundantes, tornando estes carcinomas mais agressivos e resistentes (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016; TARIGHATI; KEIVAN; MAHANI, 2022)

O carcinoma ductal invasivo é o tipo histológico de câncer de mama mais comum, representando cerca de 75% dos pacientes, seguido pelo carcinoma lobular invasivo com 5-10% dos pacientes, e os carcinomas ductal/lobulares e outras histologias mais raras representam o restante dos pacientes (FENG, Yixiao *et al.*, 2018; THOMAS *et al.*, 2019)

Figura 5: Origem dos carcinomas mamários



Fonte: Adaptado de “American Cancer Society” - <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>

Além da classificação em relação a origem histológica do tumor, o câncer de mama também é classificado com base na expressão ou ausência da expressão de receptores hormonais específicos, como progesterona e estrogênio. A presença destes receptores possui relação com a estimulação do crescimento tumoral. Já foram identificados dois alvos moleculares que atuam na patogênese do câncer de mama (DAI *et al.*, 2016).

O primeiro, é o receptor alfa de estrogênio (RE α), é um receptor hormonal esteroide, como também, fator de transcrição, e quando ativado pelo estrogênio, ativa as vias de crescimento oncogênicas, favorecendo o crescimento das células tumorais da mama. Outro receptor já identificado é o receptor de progesterona (RP), sendo sua expressão também utilizada como um marcador da sinalização de RE α (EL HACHEM; GOMBOS; AWADA, 2019; JOSHI; PRESS, 2017). Os tumores que apresentam positividade a receptores de estrogênio (RE), são denominados RE-positivos e os tumores com receptores de progesterona (RP), são conhecidos como RP-positivos, sendo então categorizados como tumores hormônios positivos (RH+) (BARZAMAN *et al.*, 2020). O segundo principal alvo molecular no câncer de mama é o fator de crescimento epidérmico 2 (HER2). O HER2 é um receptor transmembranar tirosina quinase, representante da família de receptores de fator de crescimento epidérmico (EL HACHEM; GOMBOS; AWADA, 2019).

Desta forma com base na presença destes alvos moleculares, os tumores de mama são subdivididos em quatro grupos: Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo-negativo (Figura 6). A classificação destes subtipos é realizada com base na caracterização imunohistoquímica dos tumores quanto a presença dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona, e do receptor de fator de crescimento epidermal HER2 (KWA; MAKRIS; ESTEVA, 2017).

Os subtipos luminais receberam esta denominação devido a semelhança das células tumorais com as células de mama normal, que ficam diretamente em contato com o lúmen dos ductos mamários. O subtipo Luminal A, representa cerca de 40% dos casos de câncer de mama. É um subtipo de baixo grau, com crescimento celular lento, este subtipo é caracterizado pela expressão de receptores hormonais de estrogênio e progesterona, porém negativos para expressão de receptores de HER2. Outro fator importante é a baixa expressão do marcador de proliferação celular, Ki-67. O subtipo Luminal B representa cerca de 20% dos casos, e apresenta a expressão dos receptores hormonais e a expressão HER2 e altos níveis de expressão de Ki-67. Os canceres Luminais B, possuem um padrão de crescimento mais rápido em relação ao Luminal A, levando a um comportamento um pouco mais agressivo (DAI *et al.*, 2016; FENG, Yixiao *et al.*, 2018).

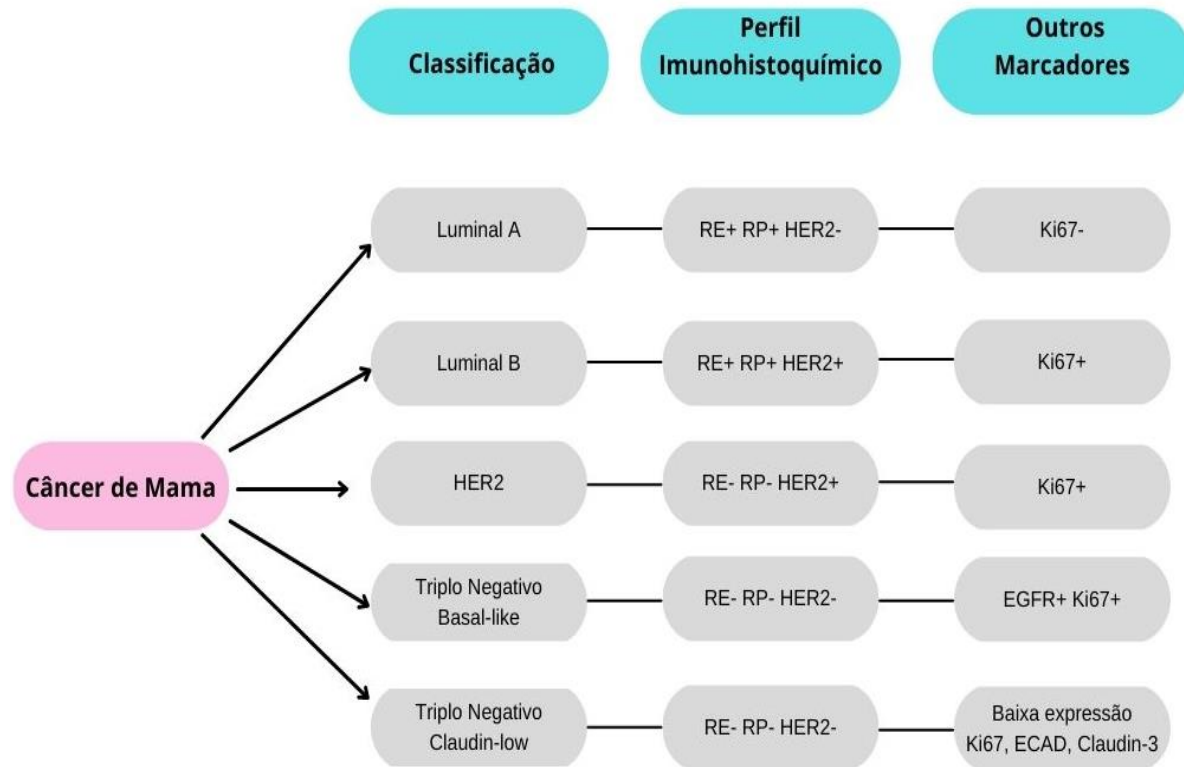
O subtipo HER-2 é caracterizado pela superexpressão da oncoproteína HER2, com negatividade para os receptores hormonais. Este receptor é amplificado ou superexpresso em aproximadamente 20% dos cânceres de mama e sua superexpressão direciona as células tumorais a intensos ciclos de crescimento e divisão, como também auxilia no escape contra

sinalizações para morte celular, sendo assim HER2 está associado a um fenótipo mais agressivo e um mau prognóstico na ausência de terapia sistêmica (OH; BANG, 2020).

O quarto subtipo molecular é denominado triplo negativo, representa aproximadamente 20% de todos os tumores da mama e é caracterizado pela falta de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, como também HER2. Os tumores triplos negativos são morfológicamente caracterizados pelo alto grau histológico, com elevado índice mitótico e presença de áreas necróticas (EL HACHEM; GOMBOS; AWADA, 2019). Estudos nos últimos anos chegaram à conclusão que os tumores triplo negativos possuem uma heterogeneidade, e essa diversidade está relacionada a expressão gênica de importantes moléculas. Entre os subtipos de câncer de mama triplo negativo, dois subtipos se destacam, sendo o primeiro o *basal-like*, que possui uma expressão de marcadores de células epiteliais, como, laminina, integrina- β 4, queratina-5 e queratina-17, tendo sua incidência em cerca de 80%. O outro subtipo é o *claudin-low*, é caracterizado pela baixa ou ausente expressão de marcadores de diferenciação, combinado com uma alta expressão de marcadores que atuam na transição epitélio-mesênquima (TEM) (ANDERS *et al.*, 2016; DASS *et al.*, 2021; LIANG, Weili *et al.*, 2018; WON; SPRUCK, 2020).

Todas estas características tornam os tumores triplo negativos mais agressivos, associados a menor sobrevida e alto risco de recidiva nos primeiros 3 a 5 anos após o diagnóstico (DENKERT *et al.*, 2017).

Figura 6: Subtipos de câncer de mama em relação ao perfil de expressão molecular



O câncer de mama é considerado uma doença complexa e com comportamento dinâmico, e que possui uma alta diversidade morfológica e biológica. Nos últimos anos o diagnóstico e os tratamentos para o câncer de mama, estão sendo aprimorados, devido a diversos estudos que estão ocorrendo por todo o mundo. Porém a dificuldade de acesso aos métodos diagnósticos, como mamografias e ultrassonografias, levam a deficiência na detecção precoce do tumor, resultando no aumento de pacientes com tumores em estágios mais avançados (FERLAY, 2018).

2.3.2 Transição epitélio-mesênquima no Câncer de Mama

A mudança de células com perfil epitelial para o fenótipo mesenquimal, foi primeiramente denominada como “transformação epitelial-mesenquimal (HAY, 1995). Após alguns anos e estudos na área, devido as células possuírem uma plasticidade e dinamicidade, o termo

“transformação” foi substituído por “transição”, para ressaltar a capacidade do mecanismo ser reversível (KALLURI; NEILSON, 2003).

A transição epitélio-mesênquima (TEM) pode ocorrer fisiologicamente ou a estímulos patológicos, principalmente como um fator importante no desenvolvimento tumoral (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Este processo de transição celular, basicamente ocorre quando uma célula epitelial que interage com outras células de mesmo perfil, sofre alterações bioquímicas, genéticas e epigenéticas, induzindo esta célula a assumir um perfil mesenquimal (HODOROGEA *et al.*, 2019).

Os mecanismos envolvidos na TEM está relacionada a diferentes fatores de sinalização que são responsáveis por desencadear a estimulação deste evento, sendo eles a expressão de fatores de transcrição, microRNAs, reguladores genéticos e epigenéticos. Todos esses fatores promovem mudanças genotípicas e fenotípicas significativas, em nível celular, favorecendo processos de perda de adesão, migração, invasão e resistência à morte por apoptose (FORONI *et al.*, 2012; KARAMANOU *et al.*, 2020).

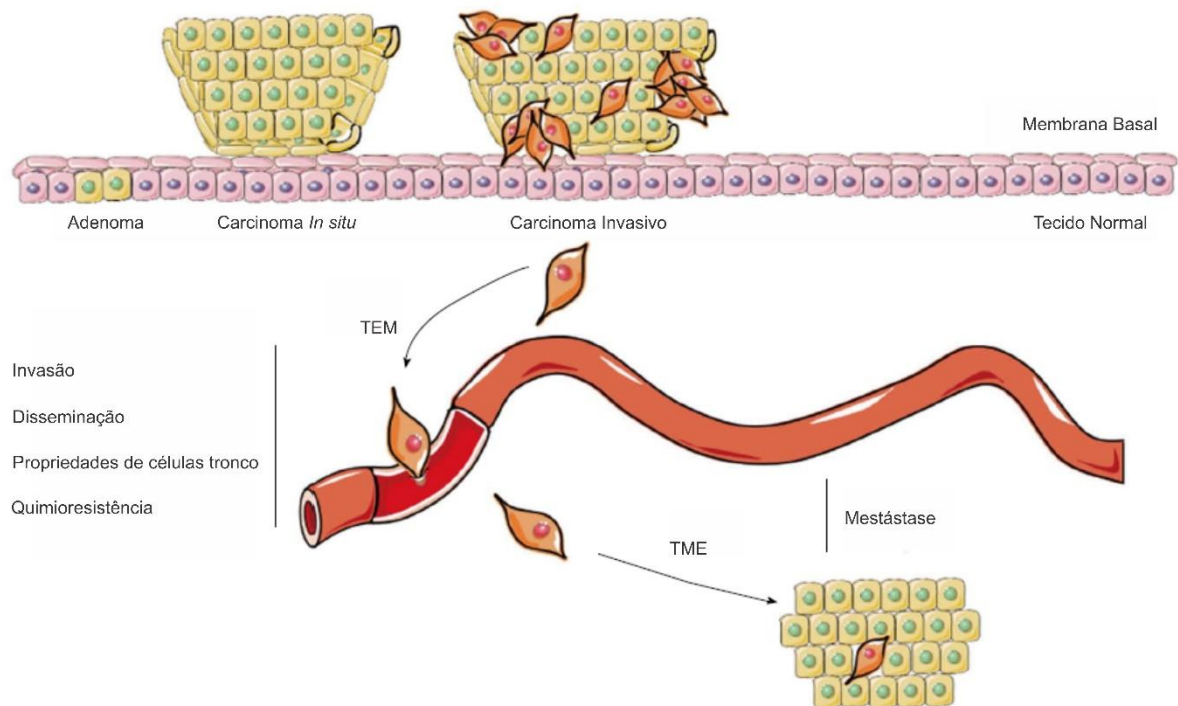
Para que seja possível a ocorrência da TEM, alterações cruciais devem ocorrer, principalmente ligadas a adesão celular, sendo assim à medida que as células epiteliais passam pela TEM, alguns marcadores importantes na regulação da adesão, migração e invasão, sofrem uma redução da expressão. O mais importante marcador da TEM é a redução ou perda da expressão de E-Caderina e a superexpressão de marcadores mesenquimais como N-Caderina (DIEPENBRUCK; CHRISTOFORI, 2016).

Além das caderinas, é descrito na literatura que diferentes fatores de transcrição possuem como foco a inibição da expressão de genes que atuam na estimulação epitelial e favorecem a expressão de genes que irão atuar na estimulação do perfil mesenquimal. Como principais exemplos, destacam-se o *Snail* (SNAI1) e os *Zinc-Finger E-box Binding* (ZEB1 e ZEB2), ambos atuando diretamente, ligando-se nas regiões promotoras de CDH1 (E-caderina) e reduzindo a expressão do mesmo (DRASIN; ROBIN; FORD, 2011; HAJRA; CHEN; FEARON, 2002; LIANG, Weili *et al.*, 2018).

Em algumas situações a TEM é reversível, observa-se a transição mesenquimal-epitelial (TME). Esse mecanismo é uma forma dos sítios metastáticos assumirem novamente o perfil epitelial. As células que sofreram a transição são reprogramadas, favorecendo o desenvolvimento de metástases e a sobrevivência dessas células que migraram (LIMA *et al.*, 2016).

A TEM no câncer de mama é um mecanismo essencial na aquisição de capacidade invasiva e metastática, com as células adquirindo a capacidade de se mover livremente, ultrapassando a matriz extracelular circundante, invadindo tecidos adjacentes e estabelecendo sítios secundários (Figura 7) (LIMA *et al.*, 2016). Compreender o papel e a importância da TEM no câncer de mama tem sido o foco de estudo de muitos grupos de pesquisas, e sendo assim, os fatores de transcrição estão entre os mediadores importantes que regulam e induzem o fenômeno de TEM.

Figura 7: Transição epitélio-mesênquima (TEM) e transição mesênquima-epitélio (TME) durante a progressão do tumor de mama.



Fonte: Adaptado de (MOYRET-LALLE; RUIZ; PUISIEUX, 2014).

Portanto, torna-se importante a investigação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes que codificam proteínas oncogênicas ou supressoras tumorais. Principalmente aqueles que atuam na diferenciação celular, controle do ciclo celular, reparo do DNA, controle da proliferação, morte celular, assim como no processo de TEM, pois pode-se prever melhor resposta terapêutica e prognóstica. Dentre esses genes e proteínas que regulam esses processos, as proteínas da família SOX apresentam grande relevância científica (BAGCI; KURTGÖZ, 2015).

2.4 Família SOX

Na década de 90 foi descoberto em humanos e camundongos, o gene *Sry* (*sex determining region Y*), tornando-se conhecido por seu papel na determinação testicular. A proteína SRY possui um domínio de ligação ao DNA denominado HMG-box (*high mobility group*) e estudos dos domínios de ligação do *Sry*, levaram a descoberta da família SOX. Nos mamíferos esta família é altamente conservada evolutivamente e é representada por mais de 20 genes, sendo estes classificados em oito grupos distintos, SoxA a SoxH (Tabela 2) (GRIMM *et al.*, 2019; SHE; YANG, 2015).

Tabela 2: Grupos da família SOX

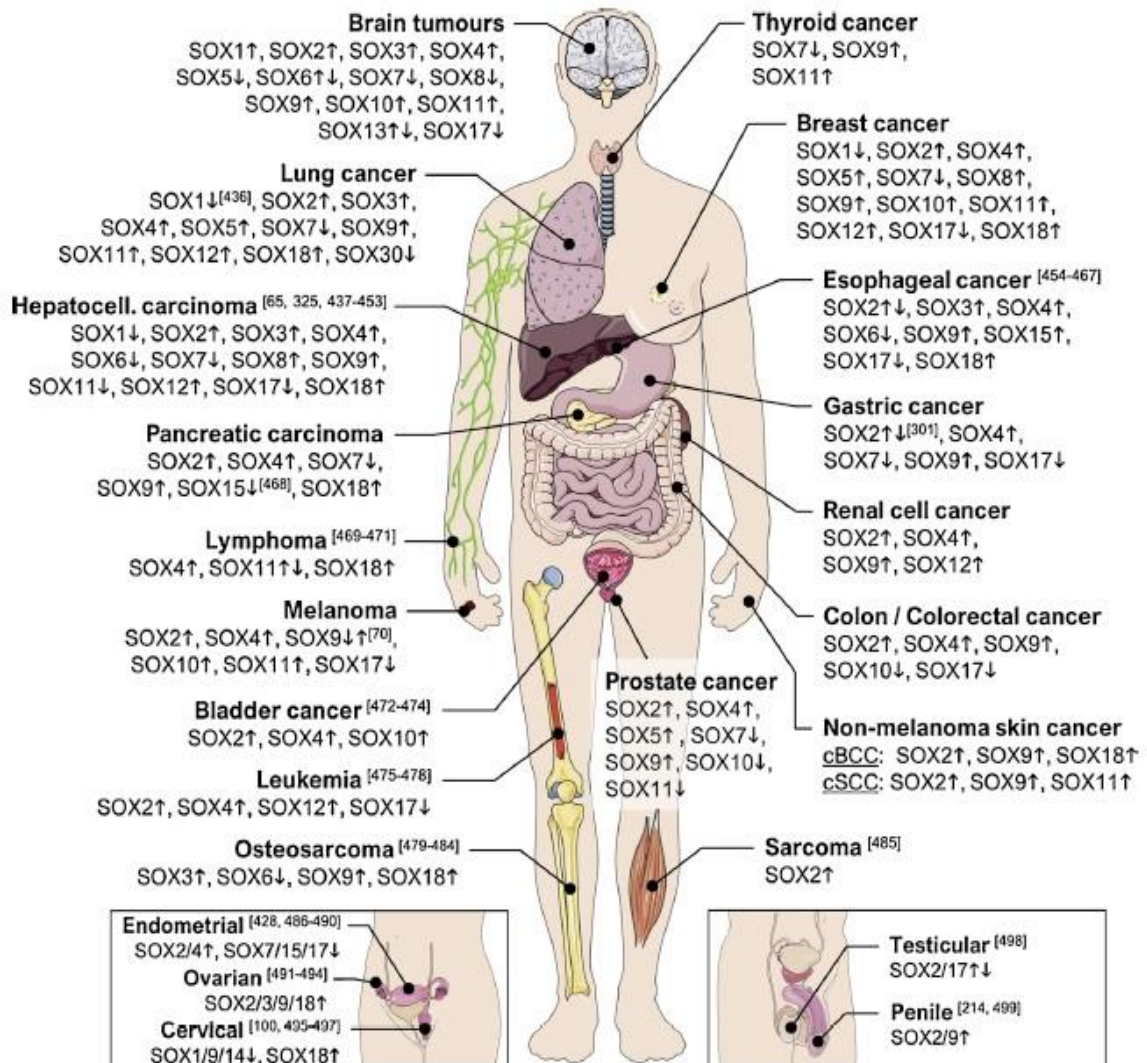
Grupo	Subgrupo	Membros
SoxA		Sry
SoxB	SoxB1	SOX1, SOX2 e SOX3
	SoxB2	SOX14 e SOX21
SoxC		SOX4, SOX11 e SOX12
SoxD		SOX5, SOX6 e SOX13
SoxE		SOX8, SOX9 e SOX10
SoxF		SOX7, SOX17 e SOX18
SoxG		SOX15
SoxH		SOX30

Os fatores de transcrição SOX são fundamentais para vários processos do desenvolvimento fisiológico do organismo humano, incluindo diferenciação celular, diferenciação sexual, organogênese, como também um papel na regeneração muscular (SHE; YANG, 2015). Consequentemente muitos membros da família SOX podem atuar na tumorigênese como genes supressores de tumor, oncogenes ou ambos, estando a função condicionada ao ambiente celular. Os genes da família SOX podem ser ativados ou inativados através de uma variedade de mecanismos genéticos e epigenéticos, incluindo alterações no número de cópias do DNA, alterações de metilação do DNA e expressão aberrante de miRNA (CASTILLO; SANCHEZ-CESPEDES, 2012; THU *et al.*, 2014)

Em organismos saudáveis a expressão dos genes SOX são altamente regulados, porém nos tumores os genes SOX são frequentemente desregulados (THU *et al.*, 2014). Os diferentes membros da família, possuem mecanismos específicos de ação, levando a uma heterogeneidade

de atividade, estando relacionado ao tipo de tumor em que está associado (Figura 8) (GRIMM *et al.*, 2019). Portanto, assim como muitos outros fatores reguladores do desenvolvimento, o funcionamento inadequado dos genes SOX tem sido associado a vários distúrbios clínicos, assim como no câncer (DONG; WILHELM; KOOPMAN, 2004).

Figura 8: Envolvimento da SOX em diferentes tumores. As setas indicam a regulação.



Fonte: GRIMM *et al.*, 2020

O envolvimento dos genes da família SOX em tumores malignos, tem sido amplamente estudado, mostrando o comportamento destes genes em diferentes tipos de tumores. Dentre os membros da família SOX, a SOX10 tem sido amplamente estudada em melanomas, sendo comprovada a sua superexpressão em células melanocíticas, levando a um perfil de células mais proliferativas, migratórias e resistentes a apoptose. Com estas características SOX10 é definido

como um oncogene neste grupo de tumores (ROSENBAUM *et al.*, 2021; TANG; CAO, 2021). Por outro lado, as proteínas SOX4, SOX2 e SOX9 demonstraram ter efeito supressor de tumor em melanomas, assim como em câncer gástrico, participando do processo de indução de apoptose e inibindo o crescimento celular (OTSUBO *et al.*, 2008; PASSERON *et al.*, 2009; VERVOORT; VAN BOXTEL; COFFER, 2013).

Outro importante membro da família SOX já descrito, é o SOX4, onde sua atividade é descrita como oncogênica em leucemias, câncer colorretal, pulmão e mama, atuando como supressor da apoptose, promoção de metástase, e manutenção de células iniciadoras de câncer, demonstrando a natureza específica do envolvimento das proteínas SOX na carcinogênese dependendo do tipo de câncer e da linhagem tumoral (CASTILLO; SANCHEZ-CESPEDES, 2012; VERVOORT; VAN BOXTEL; COFFER, 2013).

SOX2 é o fator de transcrição mais investigado, dentro da família SOX. Ele faz parte do grupo SoxB, que é dividido nos subgrupos SoxB1 e SoxB2, sendo o grupo SoxB1 composto por proteínas ativadoras da transcrição, enquanto o grupo SoxB2 é composto por inibidores de transcrição. O fator SOX2 faz parte do subgrupo SoxB1, juntamente com SOX1 e SOX3, compartilhando um alto grau de similaridade de sequência entre eles (GRIMM *et al.*, 2020). SOX2 desempenha um papel essencial na regulação das células-tronco durante a embriogênese, bem como durante a regeneração de tecidos adultos (CASTILLO; SANCHEZ-CESPEDES, 2012; NOVAK *et al.*, 2020). Por outro lado, a superexpressão de SOX2 está associada a diferentes tipos de câncer, como câncer de mama, próstata, pulmão, ovário e cólon, desempenhando em todos os tipos de tumores, um papel no favorecimento da proliferação celular, migração, invasão e metastatização, bem como na resistência a morte por apoptose (CHAUDHARY *et al.*, 2019; NOVAK *et al.*, 2020).

2.4.1 SOX3

A proteína SOX3 é um fator de transcrição caracterizado pelo domínio de ligação HMG-box, altamente conservado em eucariotos, e desempenha papel fundamental em diferentes processos da neogênese, desenvolvimento da hipófise, da região crânio facial e na diferenciação celular testicular (GUBBAY *et al.*, 1990; RIZZOTI *et al.*, 2004). SOX3 está juntamente com SOX2 e SOX1 no subgrupo SoxB2, sendo um inibidor de transcrição. Por compartilham alto grau de similaridade de sequência, tanto dentro quanto fora da caixa HMG, é esperado que os

membros do grupo SoxB1 tenham atividades biológicas parecidas, porém sabe-se que o comportamento destes diferentes fatores são distintos em relação ao tipo de tumor avaliado (GRIMM *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos têm relatado a expressão e função de SOX3 em diferentes tumores, sendo que o mesmo demonstra um padrão diferenciado de função em relação ao tipo tumoral. Em estudo realizado por YAN, *et al.*, 2016, mostrou que SOX3 se comportou como oncogene em tumores ovarianos, sendo que sua superexpressão promoveu proliferação, migração e facilitou a invasão, como também diminuiu a morte celular por apoptose (YAN, Qin *et al.*, 2016). A alta expressão de SOX3 em carcinomas hepatocelular, foi relacionada com o estágio avançado do tumor e baixa diferenciação, sendo então sua expressão um fator de determinante para o mau prognóstico dos pacientes (FENG, Yun *et al.*, 2017). Outro importante estudo observou a elevada expressão de SOX3 em glioblastomas, quando comparado com tecido nervoso normal. Esta superexpressão aumenta a proliferação, viabilidade celular, migração e invasão. Concluindo então que SOX3 pode promover o comportamento maligno de tumores cerebrais (VICENTIC *et al.*, 2018). Estudo recente realizado por SHEN *et al.*, 2020, demonstrou que SOX3 é altamente expresso em câncer gástrico, sendo essa expressão relacionada a um tumor com perfil mais proliferativo, migratório e invasivo, com maiores chances de metastatização. Onde foi concluído no trabalho SOX3 como um possível candidato a um novo marcador prognóstico dentro do carcinoma gástrico.

No câncer de mama o papel de SOX3 ainda é pouco explorado, quando comparado a outros membros da família SOX. Sendo o seu papel incerto neste importante grupo de tumores.

2.4.2 SOX no câncer de mama

Nos cânceres de mama já foi descrito a expressão de diferentes membros da família SOX. A expressão de SOX1 foi definida como um supressor tumoral em diferentes tumores de mama, como também em linhagens celulares, sendo que sua superexpressão promoveu a redução da proliferação celular, invasão e induziu apoptose (OLIEMULLER *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2016). Já a expressão de SOX2 representa um tumor com alta malignidade, com maior potencial invasivo, promovendo a proliferação, angiogênese e consequentemente a metastatização.

Enquanto a sua regulação negativa resultou em uma menor taxa de proliferação, inibindo o crescimento tumoral (DAS *et al.*, 2017a; LIANG, Shanshan *et al.*, 2013).

SOX4 foi descrito como expresso em células normais do tecido mamário, porém já foi observado que alguns subtipos de câncer de mama possui a superexpressão de SOX4, e esta expressão atua diretamente na indução de fatores que atuam na transição epitélio-mesênquima (MEHTA; KHANNA; GATZA, 2019; TIWARI *et al.*, 2013).

A expressão de SOX8, SOX9 e SOX10 já foram definidas no câncer de mama, sendo ambos expressos no subtipo triplo negativo. Estudos definiram a partir de análises de bioinformática que a expressão de SOX8 pode reduzir significativamente a sobrevivência dos pacientes (YAN, Chen *et al.*, 2018). Já SOX9, apresenta-se superexpresso no câncer de mama, contribuindo para a indução de proliferação e progressão tumoral, estando sua expressão relacionada com a resistência do tumor e conseqüentemente um mau prognóstico (LEI *et al.*, 2016). SOX10 encontra-se expresso em diversos carcinomas invasivos, controlando o crescimento e invasão (CIMINO-MATHEWS *et al.*, 2013).

Semelhante, SOX2 é descrita como um importante oncogene nos tumores mamários, sendo superexpressa em tecidos mamários e linhagens celulares já estudadas. Essa superexpressão está diretamente relacionada a um perfil mais proliferativo dos tumores, bem como, o favorecimento da migração, invasão e aumento da adesão em sítios metastáticos (LIU, Kuancan *et al.*, 2017; LIU, Peng *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2020). Segundo XIAO *et al.*, 2020, além de todos os fatores de resistência já citados, SOX2 demonstrou uma importante associação com o favorecimento de metástases cerebrais, favorecendo a permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Em estudos realizados por Herve Acloque em 2011, foi observado em linhagens celulares de mama, que a expressão de SOX3 promove a inibição da transição epitélio-mesênquima e prejudica a mobilidade e invasão celular, sugerindo que SOX3 pode atuar como um supressor tumoral (ACLOQUE; OCANA; *et al.*, 2011).

Neste mesmo estudo foi demonstrado que a proteína SOX3 não é expressa em células MDA-MB-231, sendo assim o presente trabalho justifica-se pela importância de investigar se a proteína SOX3 participa na regulação da apoptose em células MDA-MB-231, e se a perda da sua expressão nessa linhagem celular é um evento importante para promoção e progressão tumoral, relacionando a proteína SOX3 como uma proteína supressora desse tipo de tumor de mama.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é investigar a participação da proteína SOX3 na regulação da apoptose e na transição epitélio-mesênquima em carcinoma ductal invasivo de mama humano.

3.2 Objetivos específicos

1. Cultivar células MDA-MB-231 e padronizar protocolo de transfecção utilizando o reagente Lipofectamine e o vetor pGL3-GFP.
2. Transfecção com vetor de expressão para a proteína SOX3 (pEF1/Myc-His/SOX3) e vetor vazio (pEF1/Myc-His). Confirmar a expressão gênica de SOX3 por RT-PCR e imunofluorescência.
3. Avaliar após 24 horas da transfecção, a citotoxicidade do protocolo utilizando MTT e a porcentagem de células em apoptose por citometria de fluxo (Anexina V-FITC/PI).
4. Avaliar a expressão gênica de *SOX3*, e genes relacionados a apoptose: *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* e *BAX*, *BCL2*, *GAPDH* e *S26*, em todos os grupos após a transfecção, por RT-qPCR.
5. Avaliar a expressão gênica de SOX3, e genes relacionados a transição epitélio-mesênquima: *ECAD*, *NCAD*, *SNAIL*, *ZEB1*, *ZEB2* e *GAPDH*, em todos os grupos após a transfecção, por RT-qPCR.
6. Avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína SOX3 e Caspase-3 em amostras parafinizadas de carcinomas ductais invasivos de mama humano provenientes do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

4. MATERIAIS E METÓDOS

4.1 Linhagens Celulares

Foram utilizadas duas linhagens tumorais de mama: MDA-MB-231 (Carcinoma ductal invasivo de mama humano) (ATCC[®] HTB-26TM), modelo ideal para o estudo por não expressar a proteína SOX3 (ACLOQUE; OCAÑA; *et al.*, 2011). Possui morfologia mesenquimal e maior potencial invasivo, sendo um modelo celular triplo-negativo, subtipo *claudin-low*. A linhagem celular MCF-7 (ATCC[®] HTB-22TM), possui morfologia epitelial, com potencial menos invasivo, sendo um modelo tumoral Luminal A. Foi utilizada como controle positivo na expressão de SOX3.

4.2 Cultivo Celular

As linhagens celulares, eram mantidas congeladas em nitrogênio líquido até o momento da utilização. O descongelamento foi realizado por processo rápido, imediatamente após a retirada da vial da criopreservação. Foram utilizadas células em passagens pré-determinadas entre 12-14 passagens. Após o descongelamento as células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) e 1 % de penicilina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A). As células foram mantidas em estufa de atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a temperatura de 37°C. A troca do meio de cultura, era realizada a cada 24 horas de incubação e para a utilização nos experimentos as células estavam em fase de crescimento logarítmica com 70-80 % de confluência.

4.3 Vetor de expressão de SOX3

O vetor de expressão da proteína SOX3 em sistema de mamíferos foi produzido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Akron - EUA, e foram gentilmente doados pela professora Dra. Amy Milsted. A amostra de DNA utilizada para amplificação do gene SOX3 foi adquirida da empresa Thermo, com o número de catálogo: MHS6278-

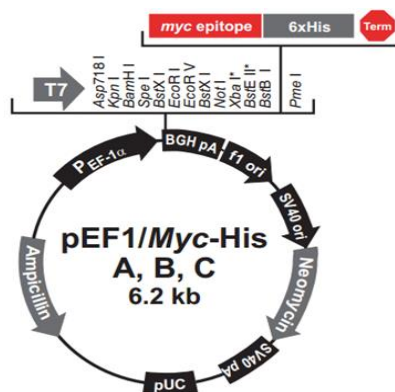
202857278 (California – EUA), e os primers para sua amplificação, a temperatura de melting utilizada na reação de PCR e as enzimas de digestão utilizadas para a digestão do fragmento estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Primer para clonagem e condições de anelamento para SOX3. Fonte do DNA genômico para amplificação do gene SOX3: Thermo: MHS6278-202857278 – California – EUA.

SOX gene	Sequência dos primers	T(A) °C	Enzimas de restrição para clonagem	pEF-1 vector frame
SOX3				
Right Primer	AAAGAATTCTCCGATGTGGGTCAGCGGCA	59.8	BamHI e EcoRI	A
SOX3				
Left Primer	ATAGGATCCGGAATGCGACCTGTTTCGAGAGA	59.8	BamHI e EcoRI	A

O vetor utilizado para ligação, transformação bacteriana e posterior purificação para a transfecção celular foi o pEF1/Myc-His (Figura 9), e o gene foi clonado no vetor utilizando-se a janela de leitura A (Tabela 3).

Figura 9: Vetor de expressão pEF1/Myc-His utilizado para clonagem de SOX3.



Fonte: Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V92120#/V92120>

4.4 Plaqueamento das células MDA-MB-231

Após as células atingirem uma confluência de 70-80%, o meio foi retirado, e a monocamada de células lavada com PBS 1X estéril. Em seguida as células foram tratadas com 2 mL de tripsina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e incubadas por 2 minutos em estufa a 37°C, para soltar a monocamada de células aderidas a placa. Após a tripsinização, foi adicionado 5mL de meio contendo SFB para inativar a ação da tripsina. Em seguida as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura e retirada uma alíquota para a contagem utilizando a Câmara de Neubauer. Após a contagem das células, foram semeadas 3×10^4 células em placas de 24 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), 7×10^4 células por poço em placas de 12 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) ou 1×10^5 células por poço em placas de 6 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Após o plaqueamento as células foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas, até atingirem uma confluência de 70%.

4.5 Padronização da reação de transfecção das células MDA-MB-231 com Lipofectamine 2000 com vetor GFP

Para padronização do protocolo de transfecção foi utilizado vetor de expressão de GFP (Green fluorescent protein) pGL3-GFP. As células foram semeadas em placas de 24 poços e após 24 horas do plaqueamento, e com uma confluência de 70 %, as células foram divididas em 6 grupos distintos, variando a concentração de Lipofectamine® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a presença ou ausência de SFB e antibiótico após tempo de incubação (Tabela 4):

Tabela 4: Grupos experimentais na padronização da transfecção com GFP.

Grupo	Nome	Lipofectamine	SFB	Antibiótico
1	Controle	-	0%	0%
2	Controle	-	5%	1%
3	GFP	1,5 µl	0%	0%
4	GFP	1,5 µl	5%	1%
5	GFP	2,5 µl	0%	0%
6	GFP	2,5 µl	5%	1%

Para a transfecção, primeiramente foi preparado um mix contendo 500 ng de GFP em meio DMEM sem SFB/Antibiótico e 1 μL de Reagent plus®, este complexo foi incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após os 10 minutos foi adicionado o volume de Lipofectamine® (1,5 μL ou 2,5 μL), e novamente incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, para formação do complexo DNA/Lipofectamine®. Após esse tempo, o meio foi removido das placas, e a monocamada de células foi lavada com PBS 1X estéril, e após essa lavagem foi adicionado o mix de transfecção em cada poço correspondente, completando o volume do poço de 500 μL com meio DMEM sem SFB. Após 4 horas de incubação, foi retirado o DMEM/MIX das células e foi adicionado nos poços dos grupos sem SFB, 500 μL de DMEM sem SFB e sem antibiótico e nos grupos com SFB, foi adicionado 500 μL de DMEM com 5% de SFB e 1% de antibiótico. A placa retornou para a estufa e ficou incubada por 24 horas.

4.6 Transfecção das células MDA-MB-231 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Após 24 horas do plaqueamento, e com uma confluência de 70 % as células foram divididas em três grupos distintos: grupo controle, transfectadas com pEF1/Myc-His/SOX3 e transfectadas com vetor vazio pEF1/Myc-His. Para a transfecção, primeiramente foi preparado um mix contendo, 500 ng de DNA em meio DMEM sem SFB/Antibiótico e 1 μL de Reagent plus®, este complexo foi incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após os 10 minutos foi adicionado 2,5 μL Lipofectamine®, e novamente o mix foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, para formação do complexo DNA/Lipofectamine®. Após esse tempo, o meio foi removido das placas, e a monocamada de células foi lavada com PBS 1X estéril, e após essa lavagem foi adicionado o mix de transfecção em cada poço, completando o volume do poço de 500 μL com meio DMEM sem SFB. Após 4 horas de incubação, foi retirado o DMEM/MIX das células e foi adicionado em cada poço, 500 μL de DMEM com 5 % de SFB e 1% de antibiótico. As células foram incubadas por 24 horas, e após esse período avaliada a confluência, e as células foram utilizadas em protocolos de citometria de fluxo e extração de RNA total.

4.7 Avaliação da citotoxicidade do protocolo de transfecção nas células MDA-MB-231 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Descrito primeiramente por Mosmann, o ensaio colorimétrico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio] conhecido como MTT tem como função determinar a viabilidade celular. O ensaio está relacionado à capacidade de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias e citoplasma de células viáveis, em reduzir o anel de tetrazólio, formando cristais de formazan de coloração azul. O acúmulo destes cristais em células metabolicamente viáveis é medido através de leitura em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) na densidade de 8×10^3 células por poço e incubadas por 24 horas para aderência. Após a avaliação de confluência as células foram submetidas ao protocolo de transfecção descrito no item 4.6.

Após o período de 24 horas da transfecção, utilizando uma bomba de vácuo foi retirado o sobrenadante da placa e adicionada solução de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração 0,25 mg/mL. A placa foi novamente por cerca de 4 horas, ao abrigo da luz. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 200µL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo - BR) em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da placa foi feita em um espectrofotômetro a 570nm.

4.8 Extração de RNA total da linhagem celular MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Após 24 horas do protocolo de transfecção em placa de 6 poços, o sobrenadante foi retirado e centrifugado e adicionado em cada poço 1 mL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após a ação do Trizol, a solução foi retirada dos poços e colocadas nos respectivos tubos contendo o pellet obtido da centrifugação do sobrenadante. A extração de RNA total foi de acordo com o protocolo do fabricante, sem modificações. Ao final da extração de RNA o pellet foi ressuscitado em 50 µL de água estéril livre de DNase e RNase, e foi quantificado utilizando Nanodrop (NanoDrop Lite - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). Uma alíquota do RNA total (1µg) extraído foi tratado com DNase I

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, sem modificações, e em seguida requantificado no Nanodrop (NanoDrop Lite - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

4.9 Transcrição reversa e PCR convencional

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), utilizando *random hexamers*, e seguindo as recomendações do fabricante do kit. As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR convencional utilizando-se Kit AmpliTaq DNA polimerase em um volume de 25 μ L, seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador modelo MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA) nos seguintes ciclos: Estágio 1: Desnaturação Inicial: 1 ciclo de 94°C/1 min. Estágio 2: Desnaturação, Anelamento e Extensão: 40 ciclos de 94°C/15 seg., 57°C/15 seg., 72°C/15 seg. Estágio 3: Extensão Final: 1 ciclo de 92°C/5 min. Os primers utilizados nas reações encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.

Primer	Sequência de Nucleotídeos	Tamanho do Fragmento	Número de Acesso do GenBank
S26			
Foward	5'- TGTGCTCCCAAGCTGTATGTGAAG -3'	75	NM_001029.3
Reverse	5'- CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA -3'		
GAPDH			
Foward	5'- TGGGTGTGAACCATGAGAAG -3'	125	NM_001289746.1
Reverse	5'- GAGTCCTCCACGATACCAAAG -3'		
SOX3Hs			
Foward	5'- GTTGGGACGCCTTGTTTA -3'	126	NM_005634.2
Reverse	5'- TCGCTGCTCCTGACTTAT -3'		
Casp3Hs			
Foward	5'- GTAGATGGTTTGAGCCTGAG -3'	106	NM_032991.2
Reverse	5'- CCAGTGCATGGAGAAATG -3'		
Casp8Hs			
Foward	5'- GGAAGCAAGAACCCATCAAG -3'	92	NM_001080124.2
Reverse	5'- CTCAGGAAGGACAGATTGC -3'		
Casp9Hs			
Foward	5'- GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT -3'	129	NM_001229.5
Reverse	5'- CAACGTACCAGGAGCCACTCTT -3'		
BAXHs			
Foward	5'- TCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGC -3'	80	NM_138765.3
Reverse	5'- TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT -3'		
Bcl-2Hs			
Foward	5'- ATTTCTGCATCTCATGCCAAGGG -3'	90	NM_000657
Reverse	5'- TGTGCTTTGCATTCTGGACGAGG -3'		
ECADHs			
Foward	5'- CCCTTACAGCAGAACTAAC -3'	108	NM_001317185.1
Reverse	5'- CACCTCTAAGCCATCTTTG -3'		
NCADHs			
Foward	5'- GGACCGAGAATCACCAAATG -3'	94	NM_001308176.1
Reverse	5'- CGTTCCTGTTCCACTCATAG -3'		
ZEB1Hs			
Foward	5'- GGGAGGATGACAGAAAGGAA -3'	100	NM_001323654.1
Reverse	5'- GCATCTGACTCGCATTTCATC -3'		
ZEB2Hs			
Foward	5'- CCATCTGATCCGCTCTTATC -3'	125	NM_001171653.1
Reverse	5'- CCTGTGTCCACTACATTGTC -3'		
SNAILHs			
Foward	5'- GCAGGACTCTAATCCAGAGTTTACC -3'	127	NM_005985.4
Reverse	5'- GACAGAGTCCCAGATGAGCATT -3'		

4.10 Eletroforese após a RT-PCR

Os produtos da RT-PCR convencional foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel foi preparado a 8% no seguinte protocolo, nessa ordem: 7,9 mL de água MilliQ, 3 mL de tampão TBE 5X, 4 mL de solução estoque de acrilamida 30%, 110 μ L de persulfato de amônio 10% (PA) e 10 μ L de TEMED. Anteriormente a corrida, foi adicionado em cada amostra 4 μ L de tampão de corrida GLB. No gel foi pipetado 2 μ L de marcador 100 pb DNA ladder e 4 μ L de cada amostra misturado com GLB. Após pipetado o marcador e as amostras, a corrida ocorreu em equipamento de eletroforese em tampão TBE 1X por cerca de 50 minutos a 110 volts. Ao finalizar a corrida o gel foi fixado por 10 minutos em solução de etanol (10%), ácido acético (0,5%) e 89,5 mL de água MilliQ. A solução fixadora foi reservada e em seguida foi realizada a impregnação em nitrato de prata (0,1%) por 5 minutos ao abrigo da luz. Após o nitrato de prata o gel foi lavado com água MilliQ e foi adicionada solução reveladora contendo: 3 g de hidróxido de sódio (3,6%), 300 μ L formol (0,3%) em um volume final de 100 mL de água MilliQ. O gel foi colocado na presença de luz incandescente por cerca de 10 minutos. Após o aparecimento das bandas, foi retirado a solução reveladora, lavado o excesso com água destilada e o gel foi armazenado em solução fixadora e em seguida fotografado.

4.11 PCR em tempo real

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR em tempo real realizada no equipamento de sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Delaware, EUA), utilizando-se o Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), em duplicata, no volume final de reação de 20 μ L. Em cada poço foram pipetadas as amostras de cDNA, e adicionado posteriormente o volume do mix contendo 5 μ L do Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit, 0,5 μ L de cada primer (senso e antissenso) (Tabela 4) (0,5 pmol/cada) e o volume final completado com água, livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies,

Carlsbad, CA, EUA) e em seguida a leitura foi realizada em equipamento de PCR em tempo real. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem, foi realizada a curva de melting a 60 °C por um minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

4.12 Imunofluorescência para SOX3 em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Antes de realizar o plaqueamento das células, as lamínulas de 13 mm passaram por um processo de lavagem e esterilização. As lamínulas foram colocadas em solução de água com sabão neutro e deixadas de molho *overnight*. Após o molho as mesmas foram enxaguadas em água corrente, retirando todo o sabão e possíveis sujeiras. Foi preparado uma solução contendo 50% de álcool etílico e 50% de éter e novamente as lamínulas foram deixadas de molho *overnight*. No dia seguinte as lamínulas foram secas uma por uma, utilizando lenço de papel macio. Ao serem secas as lamínulas foram colocadas em uma placa de petri com o fundo forrado com papel manteiga. A esterilização das lamínulas foi realizada em micro-ondas na potência 30W, durante 3 minutos com a tampa da placa aberta e novamente por 3 minutos com a tampa da placa fechada.

As lamínulas estéreis foram colocadas nos poços da placa de 24 poços, dentro da capela de fluxo. Em seguida as células foram semeadas sobre as lamínulas, desta forma as células aderiram e cresceram na superfície das lamínulas. Após 24 horas de incubação, as células passaram pelo protocolo de transfecção descrito no item 4.6.

Após 24 horas da transfecção, foi iniciado o protocolo de imunofluorescência. Foi retirado o meio dos poços e eles foram lavados com PBS. As células foram fixadas em solução de formalina a 4% em PBS e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação com a formalina os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida as células foram permeabilizadas com solução de triton 0,1% em PBS, e incubadas em temperatura ambiente por 3 minutos e lavadas novamente por 3 vezes com PBS. Após a permeabilização, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de BSA a 2% em PBS e incubados por 30 minutos, e ao término do bloqueio os poços foram lavados 3 vezes com PBS por 5 minutos. O

anticorpo primário SOX3 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), foi diluído em PBS/BSA 2% na concentração de 5 µg/mL. As lamínulas foram retiradas da placa e colocadas em contato com 30 µL do anticorpo e incubadas por 3 horas em câmara úmida. Após o tempo de incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram colocadas novamente nos poços e foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos. As lamínulas foram novamente retiradas dos poços e foram incubadas por 1 hora com 30 µL do anticorpo secundário Donkey anti-Goat Alexa Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído em PBS/BSA 2% na concentração de 8 µg/mL. Após o tempo de incubação as lamínulas foram colocadas na placa e lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos. Em seguida as lamínulas foram incubadas por 1 minuto em 30 µL de solução de DAPI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído em PBS na concentração de 1 µg/mL. Novamente as lamínulas foram colocadas na placa e lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos. Após o último processo de lavagem as células foram montadas em lâmina utilizando Hydromount (National Diagnostics, Geórgia, EUA) e foram observadas em microscópio de fluorescência. Os processos de incubação com o anticorpo e com o DAPI foram realizados protegendo as lamínulas da luz.

4.13 Avaliação da morte celular por apoptose na linhagem MDA-MB-231 transfectada com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

O ensaio foi realizado após 24 horas de transfecção. O sobrenadante dos poços de cada condição, foram coletados e as células aderidas foram tripsinizadas e coletadas, formando um pool de células por condição. Após as coletas, as células foram centrifugadas e o *pellet* formado, foi ressuspensionado em PBS e foram novamente centrifugadas. Após a última centrifugação, as células foram contadas e após a contagem, 250.000 células foram ressuspensionadas em tampão de ligação 1X e transferidas para um tubo de citometria. No tubo de citometria com as células, foi adicionado 1,5 µL de PI (BD pharmingen, EUA) e 1,5 µL de Anexina V-FITC (BD pharmingen, EUA). Após a marcação as células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Terminado o tempo de incubação foi adicionado 150 µL de tampão de ligação 1X e as amostras foram levadas para análise em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA), utilizando o programa FACSDiva (BD Biosciences, EUA). A análise dos dados adquiridos foi realizada utilizando o programa FlowJo versão v.10 (Tree Star, EUA) e a porcentagem de células agrupadas em cada estágio: Q1 =

Células necróticas ou mortas (Anexina V-FITC -, PI +), Q2 = Células em apoptose tardia (Anexina V-FITC +, PI +), Q3 = Células em apoptose inicial (Anexina V-FITC +, PI -) e Q4 = Células Viáveis (Anexina V-FITC -, PI -).

4.14 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e aprovado sob o parecer 3.723.300, CAAE 20636419.2.0000.0021.

4.15 Delineamento do estudo

A população do estudo foi composta por mulheres cadastradas no Ambulatório de Mastologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, diagnosticadas com Neoplasia Maligna da Mama e submetidas a tratamento cirúrgico conforme protocolo já instituído pelo Serviço de Mastologia da referida instituição hospitalar, no período de janeiro de 2014 a março de 2019. Consistindo assim de um Estudo de Coorte Retrospectivo.

4.16 Seleção das amostras

A população do estudo foi composta por amostras teciduais já parafinadas de carcinoma mamário invasivo – carcinoma ductal invasivo sem outra especificação, baseada na nova classificação da OMS (LAKHANI et al., 2012), obtidos pelo exame histopatológico da peça cirúrgica e confirmado pela imuno-histoquímica, as amostras foram obtidas do arquivo do Serviço de Patologia do HUMAP.

Foram excluídos do estudo amostras de carcinoma mamário invasivo dos subtipos especiais, as amostras obtidas por punção com agulha grossa, amostras teciduais de mulheres com idade inferior a 30 anos e amostras teciduais masculinas. Também foram excluídos do estudo aqueles em que o consentimento informado não pode ser obtido.

4.17 Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica, 27 amostras de carcinoma ductal invasivo humano (CDI) foram cortadas a 4 µm, montadas em lâminas gelatinizadas, e foram submetidas a bateria de álcool etílico com concentrações graduadas para a hidratação do tecido. A coloração imunohistoquímica foi realizada de acordo com o método de reação da peroxidase, usando um anticorpo secundário polimerizado ou um método de identificação avidina-biotina-peroxidase (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, Reino Unido ou Kit ABC - Vector Laboratories, San Francisco Bay Área, CA, EUA). Para recuperação de antígeno, as lâminas foram incubadas por 20 min em *Target Retrieval Solution Citrate* pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) em autoclave a 134°C ou 20 min em banho-maria a 98°C e resfriado à temperatura ambiente. Para bloquear as peroxidases endógenas, as lâminas foram incubadas três vezes por 5 minutos cada em uma solução de H₂O₂ a 10% em álcool metílico. Para bloquear as proteínas endógenas, as lâminas foram incubadas por 15 minutos com *Protein Block Solution* (Protein Block Serum-Free Ready-to-use; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, EUA) ou uma hora com 8% de leite em pó (Molico®, Nestlé), diluído em água destilada. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina. A Tabela 6, lista os fabricantes, clones, diluições, blocos de proteína e informações de anticorpos secundários para os anticorpos usados. A etapa de incubação do anticorpo primário foi omitida para o controle negativo e substituída pela incubação com o diluente de anticorpo (Diluente de Anticorpo com Componentes Redutores de Fundo; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, EUA). A análise de SOX3 e pró-caspase-3 foi realizada através da identificação de coloração citoplasmática e nuclear. Todas as análises foram realizadas por microscopia de luz com aumento de 400X. As imagens foram capturadas usando uma câmera Olympus BX_40 (Olympus Company, Shinjuku, Tóquio, Japão) e software de imagem Spot Basic para microscopia (Spot Imaging, Diagnostic Instruments, Inc.). As imagens foram analisadas usando ImageJ (SciJava), e as células positivas foram contadas manualmente usando o plug-in de contador de células ImageJ. A contagem foi realizada por um único observador de 500 células espalhadas nas amostras com o auxílio de uma grade. Após a contagem, foi realizada a média de marcação, sendo considerados positivos os casos com várias células marcadas acima da média.

Tabela 6: Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas na imunohistoquímica.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica	Bloqueio de Proteína	Anticorpo Secundário
Pro-Caspase-3	Neomarkers	RB-1197-P	1:400	Citrato + Banho Maria	8% Leite em pó	Novolink Anti-Goat -
SOX3	Invitrogen	Polyclonal	1:50	Citrato + Autoclave	Dako	IgG

4.18 Análise estatística

Os dados da expressão gênica foram normalizados com o gene S26 ou GAPDH por meio do método ΔCt (Ct do gene alvo – Ct do gene normalizador), e a expressão gênica relativa avaliada através do *fold change* com os dados de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados obtidos são apresentados como média \pm desvio padrão, utilizando o teste de análise de variância One-Way ANOVA e para avaliar a diferença entre os grupos foi utilizado o pós-teste de Tukey. Os dados estatísticos foram analisados no GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). O critério de significância estatística foi $P < 0,05$.

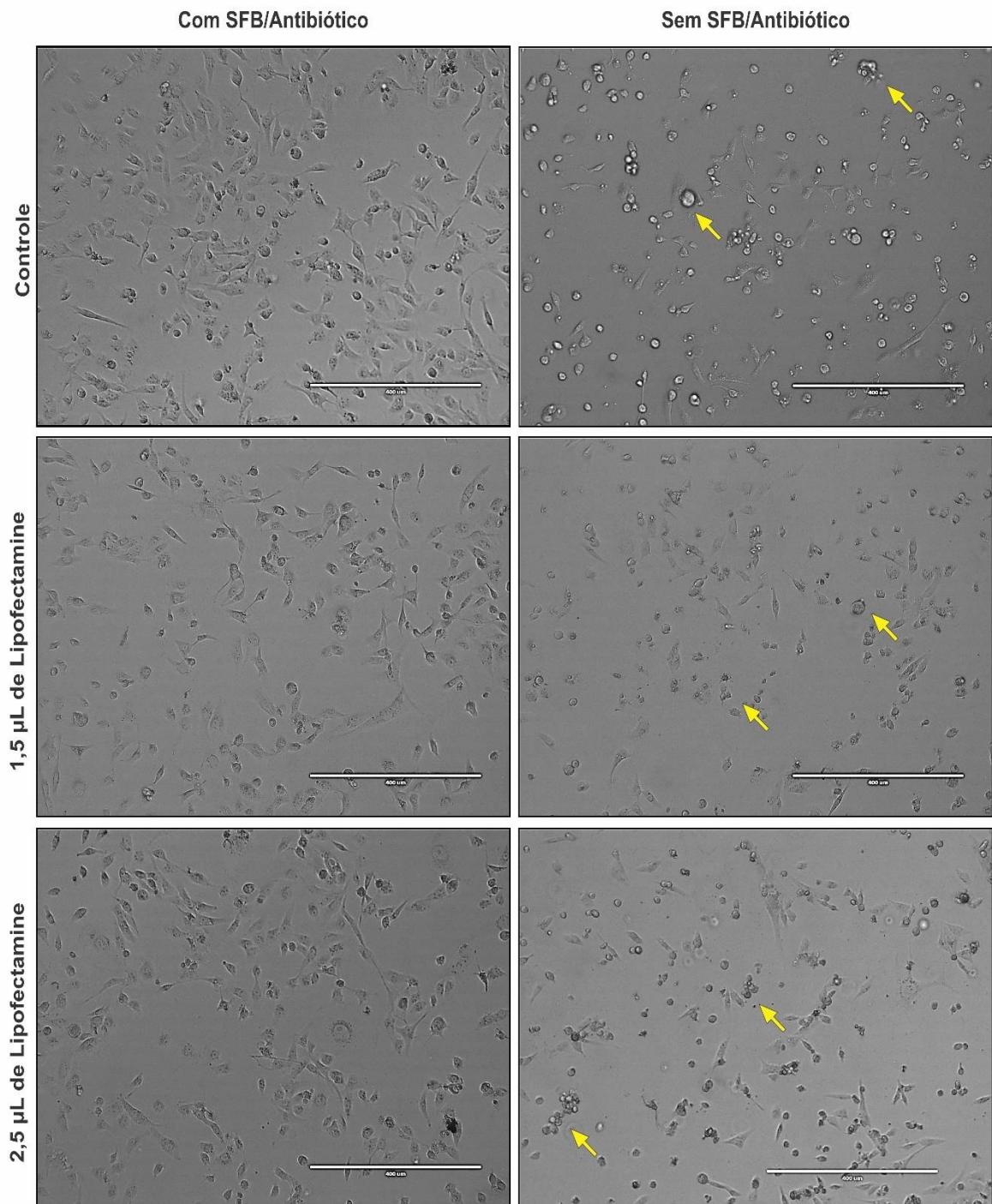
5. RESULTADOS

5.1 Transfecção das células MDA-MB-231 com vetor PGL3-GFP utilizando Lipofectamine 2000

Após 24 horas da transfecção com o vetor de GFP, as células foram avaliadas utilizando microscópio de fluorescência invertido. Ao analisar a morfologia das células, observou-se que os poços que receberam meio de cultura suplementado com SFB e antibiótico após 4 horas de incubação com o mix da transfecção, apresentaram células com morfologia característica, aderidas a placa e com confluência esperada de cerca de 80%. As células dos poços que não receberam a suplementação, apresentam morfologia alterada, com redução do número de células e volume celular, como também irregularidades na membrana e arredondamento das células (Figura 10 - Setas amarelas), característica esta responsável pela perda de adesão das células e possível indução de morte.

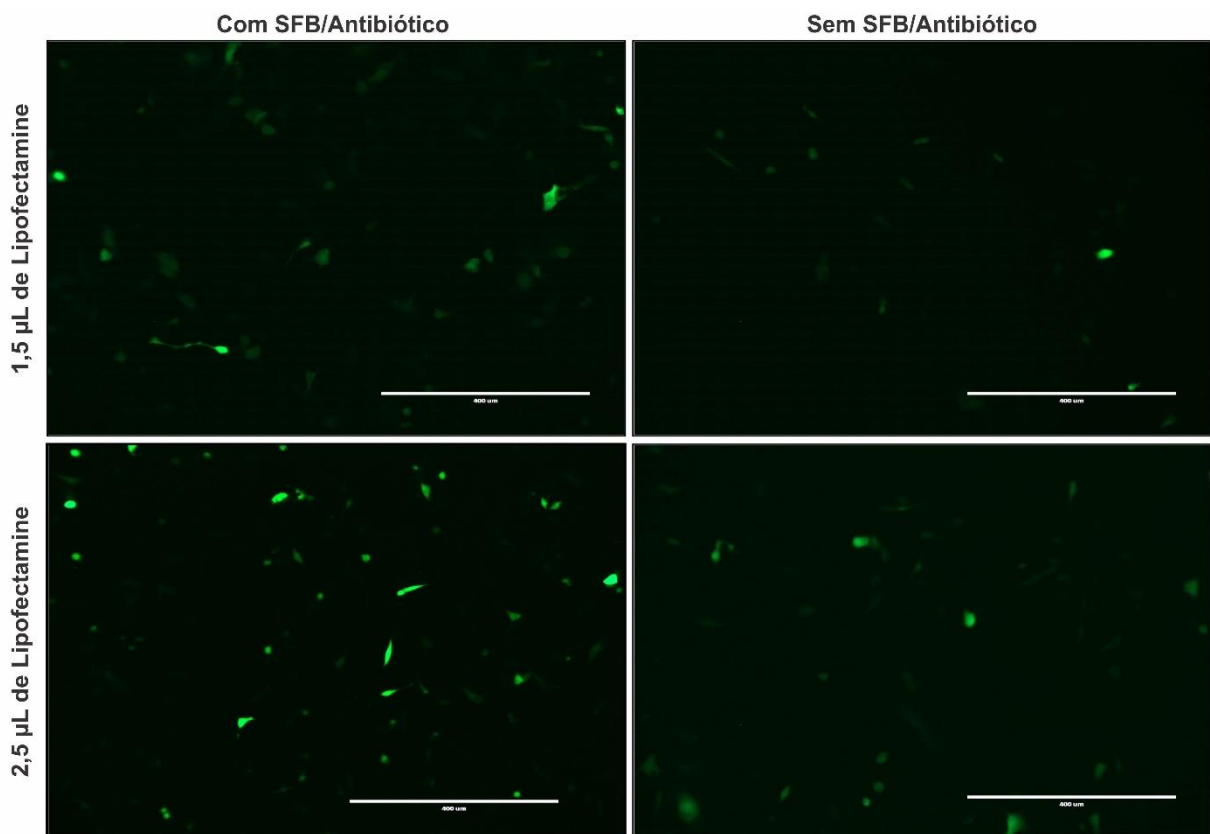
Quando avaliado a diferença morfológica em relação as diferentes concentrações do reagente Lipofectamine, observou-se visualmente, em relação ao controle uma pequena diminuição do número de células em ambas as concentrações. Mostrando que a suplementação foi essencial para manter a qualidade das células, fator este que favorece no aumento da eficiência da transfecção.

Figura 10: Alterações morfológicas na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor de GFP na presença e ausência de SFB/Antibiótico e em diferentes concentrações de Lipofectamine 2000. As fotomicrografias mostram alterações morfológicas após 24 horas da transfecção nos poços que não receberam a suplementação de SFB e antibiótico. Observa-se redução do número de células e do volume celular, possíveis irregularidades na membrana e arredondamento celular (Setas amarelas). As imagens foram adquiridas com o auxílio de microscópio de fluorescência invertido digital EVOS[®] no aumento de 100x.



Na Figura 11 encontra-se as imagens realizadas após 24 horas da transfecção com GFP. O teste foi realizado utilizando duas concentrações de lipofectamine, como também a presença ou ausência de suplementação com SFB e antibiótico, após 4 horas de incubação com os reagentes de transfecção. Ao analisar as imagens observa-se que em ambas as concentrações de lipofectamine ocorreu a transfecção do GFP, sendo que em ambas as concentrações apresenta células fluorescentes em verde.

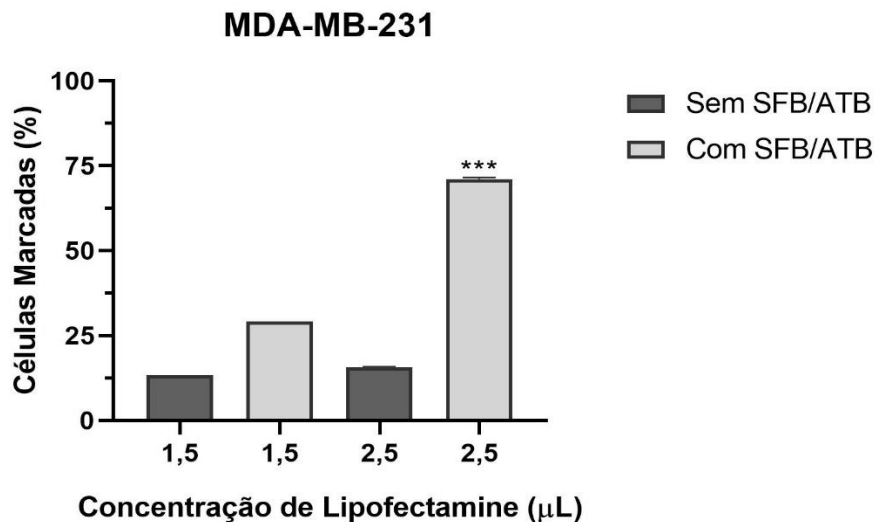
Figura 11: Avaliação da eficiência da transfecção com vetor de GFP na linhagem tumoral MDA-MB-231 na presença e ausência de SFB/Antibiótico e em diferentes concentrações de Lipofectamine 2000. As fotomicrografias mostram que a eficiência da transfecção está relacionada com a suplementação de SFB e antibiótico, e uma maior concentração de lipofectamine. As imagens foram adquiridas com o auxílio de microscópio de fluorescência invertido digital EVOS® no aumento de 100x.



As células fluorescentes foram contadas em todas as condições experimentais e dentre elas a concentração de 2,5 µL de lipofectamine mostrou-se mais eficiente, em relação a concentração de 1,5 µL de lipofectamine (Figura 12). Outro fator importante no aumento da eficiência da transfecção foi a suplementação com SFB e antibiótico. As células que foram transfectadas com 2,5 µL de lipofectamine e receberam a suplementação após as 4 horas,

tiveram taxa de transfecção de 71% das células, sendo essa taxa significativa ($p > 0,0001$) em relação as outras condições, mesmo em relação a concentração de 2,5 μL lipofectamine sem a suplementação, que demonstrou somente 16% de marcação. Esses dados demonstram que a suplementação atuou diretamente no sucesso da transfecção, podendo esse resultado estar relacionado a viabilidade das células.

Figura 12: Contagem de células marcadas após a transfecção com vetor de GFP na linhagem tumoral MDA-MB-231 na presença e ausência de SFB/Antibiótico e em diferentes concentrações de Lipofectamine 2000. As fotomicrografias foram contadas utilizando o software ImageJ. A contagem mostrou que a eficiência da transfecção está relacionada com a suplementação de SFB e antibiótico, e uma maior concentração de lipofectamine. *** $p > 0,0001$ em relação ao grupo 2,5 μL de lipofectamine sem SFB/ATB.



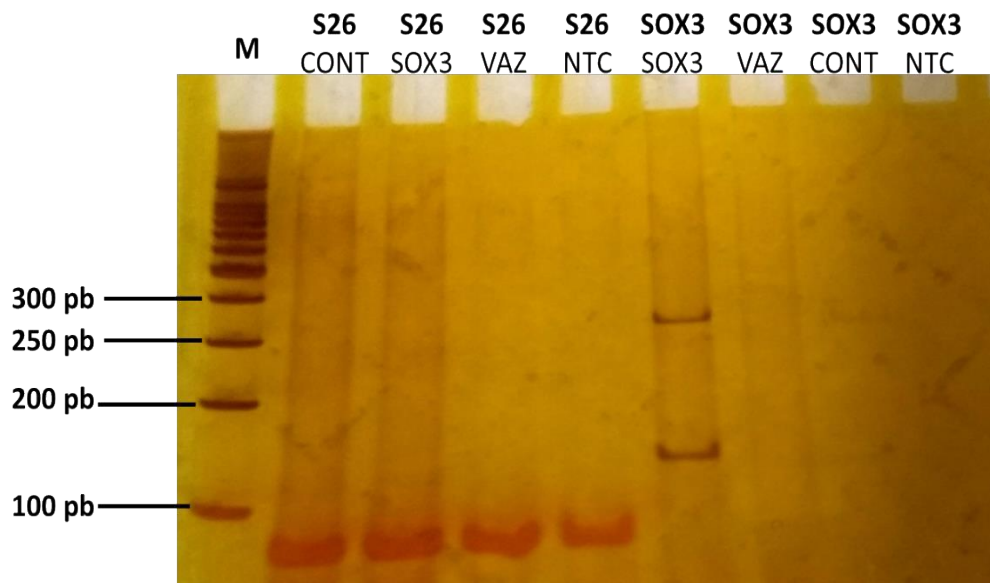
5.2 Avaliação da expressão gênica de *SOX3*, *CASP3*, *CASP8*, *BAX* e *BCL2* na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3

Após a reação da RT-PCR as amostras foram pipetadas em gel de poliacrilamida 8% e após a corrida o gel foi corado com nitrato de prata. Como normalizador foi escolhido a proteína ribossomal S26 com 75 pb, por ser um gene constitutivo e não apresentar variação de expressão em condições diferentes. Desta maneira na análise do gel observa-se que as todas as amostras foram positivas para S26, mostrando a integridade das amostras após os processos de extração e RT-PCR.

Na avaliação de expressão de *SOX3*, o resultado encontrado no gel confirma a expressão de *SOX3* na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3,

sendo que apresentou banda específica para SOX3 com 126 pb. Já nas amostras controle e vetor vazio não se observa a banda de SOX3 (Figura 13).

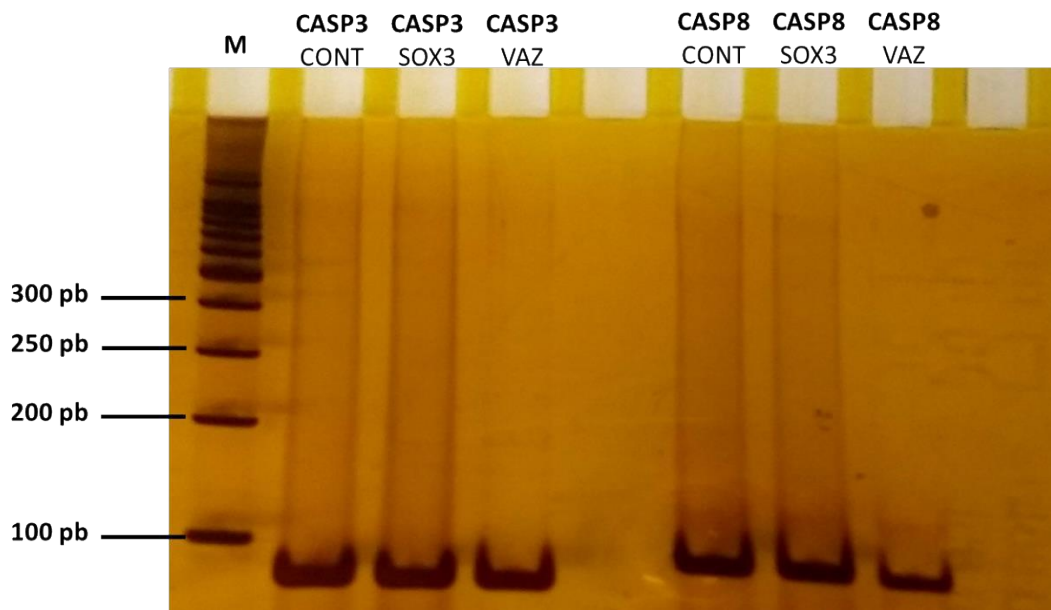
Figura 13: Expressão de SOX3 na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3. Gel de poliacrilamida mostrando resultado da PCR convencional após transfecção com vetor de SOX3. 4 μ L do resultado da PCR convencional foi pipetado no gel e visualizado por impregnação com nitrato de prata após eletroforese a 100V/50 minutos.



As amostras também foram avaliadas quanto a expressão de Caspase-3 e Caspase-8. Ambas as moléculas atuam na cascata da apoptose, sendo a Caspase-8 classificada como iniciadora e a Caspase-3 classificada como efetora. Desta maneira avaliar a expressão destas proteínas são importantes para entender o processo de morte que está ocorrendo.

Ao avaliar as amostras pode-se observar que todas as amostras apresentaram expressão de Caspase-3 (83 pb) e Caspase-8 (92 pb). Por serem proteínas endógenas a expressão basal era esperada (Figura 14). Sendo assim necessário a quantificação da expressão por PCR em tempo real.

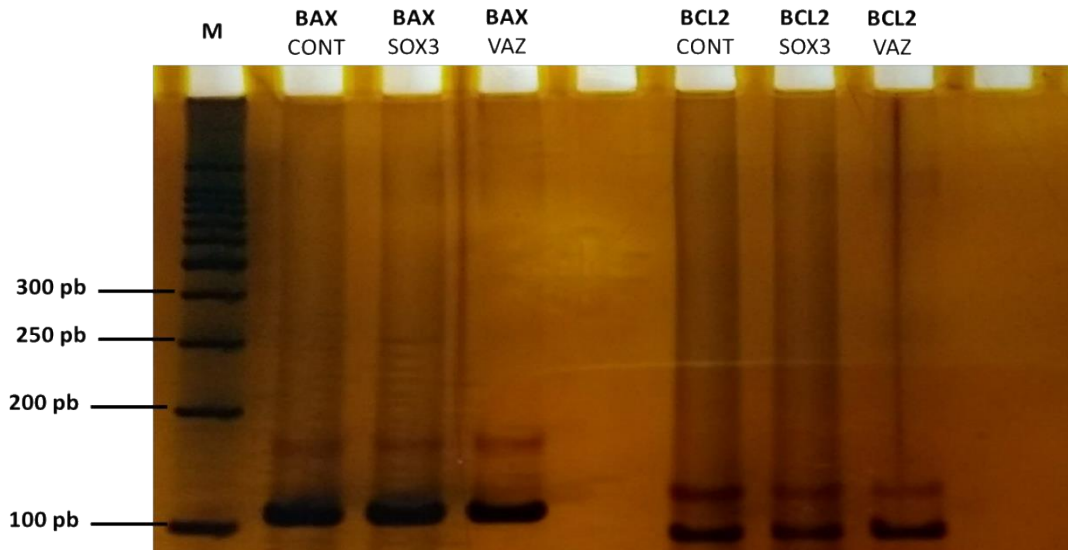
Figura 14: Expressão de *CASP3* e *CASP8* na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3. Gel de poliacrilamida mostrando resultado da PCR convencional após transfecção com vetor de SOX3. 4 μ L do resultado da PCR convencional foi pipetado no gel e visualizado por impregnação com nitrato de prata após eletroforese a 100V/50 minutos.



As amostras também foram avaliadas quanto a expressão de Bax e Bcl-2. A família de proteínas Bcl-2 desempenham um papel importante na regulação da apoptose em condições fisiológicas, como também em condições patológicas, sendo assim estas proteínas podem ser consideradas anti-apoptóticas como é o caso da Bcl-2 ou pró-apoptóticas como a Bax.

Ao avaliar as amostras pode-se observar que todas as amostras apresentaram expressão de Bax (80 pb) e Bcl-2 (90 pb). Por serem proteínas endógenas a expressão basal era esperada (Figura 15). Sendo assim necessário a quantificação da expressão por PCR em tempo real.

Figura 15: Expressão de Bax e Bcl-2 na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3. Gel de poliacrilamida mostrando resultado da PCR convencional após transfecção com vetor de SOX3. 4 μ L do resultado da PCR convencional foi pipetado no gel e visualizado por impregnação com nitrato de prata após eletroforese a 100V/50 minutos.

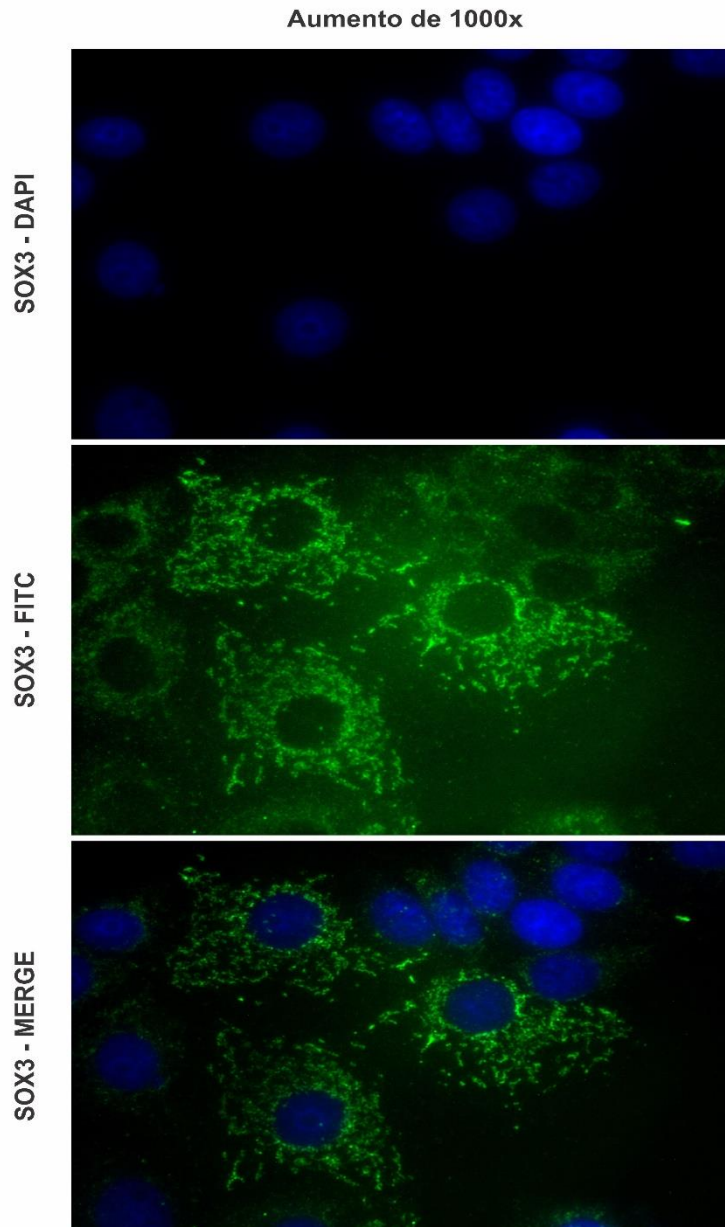


5.3 Imunofluorescência para SOX3 em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Anteriormente a avaliação da expressão de SOX3 na linhagem MDA-MB-231. Foi realizado a imunofluorescência na linhagem celular MCF-7 (Carcinoma ductal invasivo de mama). A linhagem MCF-7 possui expressão selvagem de SOX3, tornando-se um modelo ideal para avaliar a atividade do anticorpo para SOX3 e padronização do protocolo de marcação.

Após o protocolo de marcação com os anticorpos, observou-se a expressão de SOX3, corroborando com achados da literatura referente a expressão endógena de SOX3 na linhagem MCF-7 (Figura 16). Esperava-se que a marcação fosse nuclear, porém foi observado intensa marcação citoplasmática. Este resultado demonstra um provável erro na translocação da proteína para o núcleo, sendo necessário um estudo mais aprofundado para confirmação.

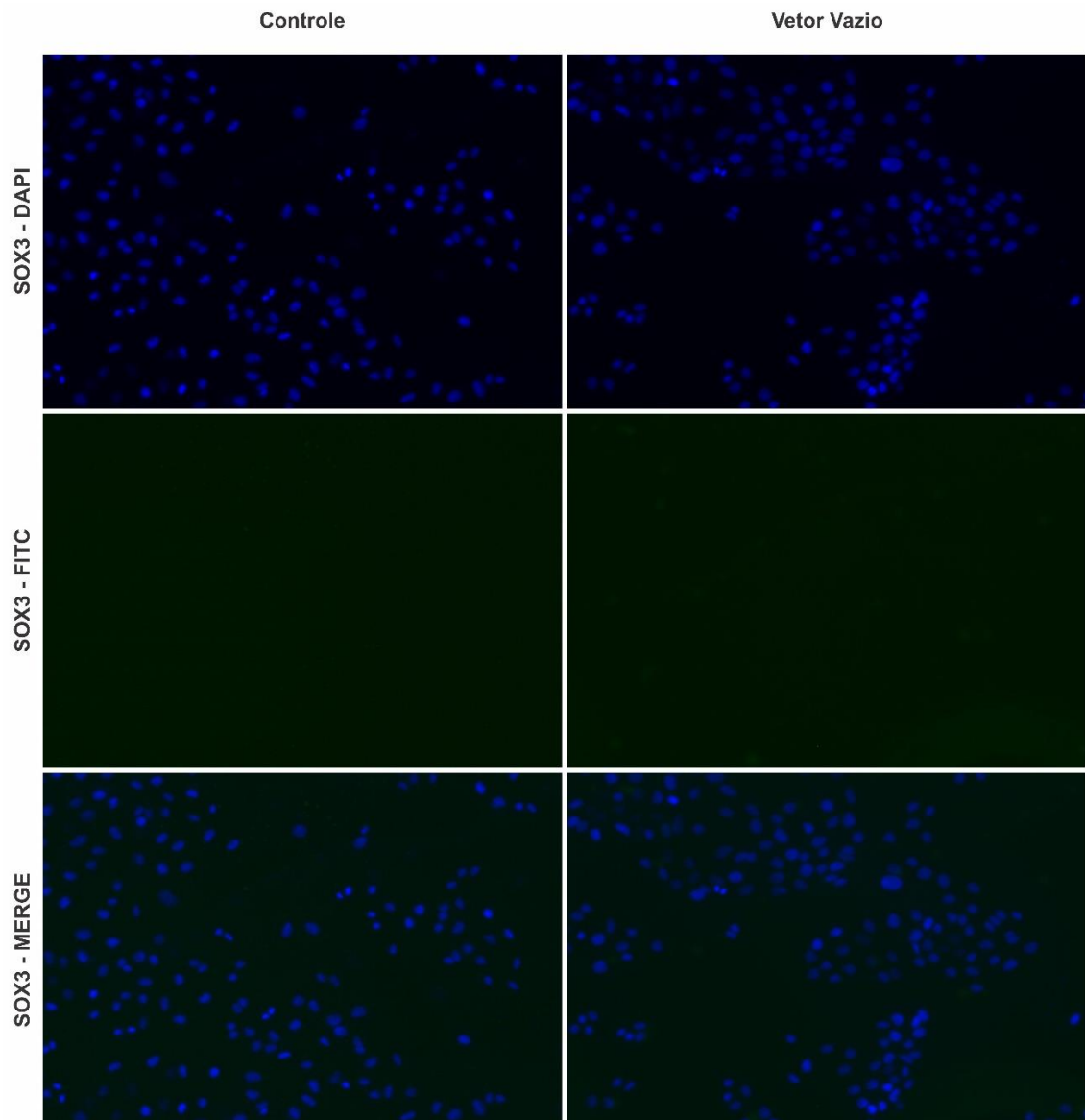
Figura 16: Expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem tumoral MCF-7. Fotomicrografias evidenciando marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasmática para SOX3 (FITC) e a sobreposição das imagens (Merge). As imagens foram adquiridas com o auxílio de microscópio de fluorescência invertido digital Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 1000x.



Após a padronização do protocolo de marcação com os anticorpos na linhagem MCF-7. As células MDA-MB-231 foram submetidas ao protocolo de transfecção com os vetores, pEF1/Myc-His/SOX3 e vazio pEF1/Myc-His, conforme descrito no item 4.6, e após 24 horas da transfecção iniciou-se o protocolo de imunofluorescência.

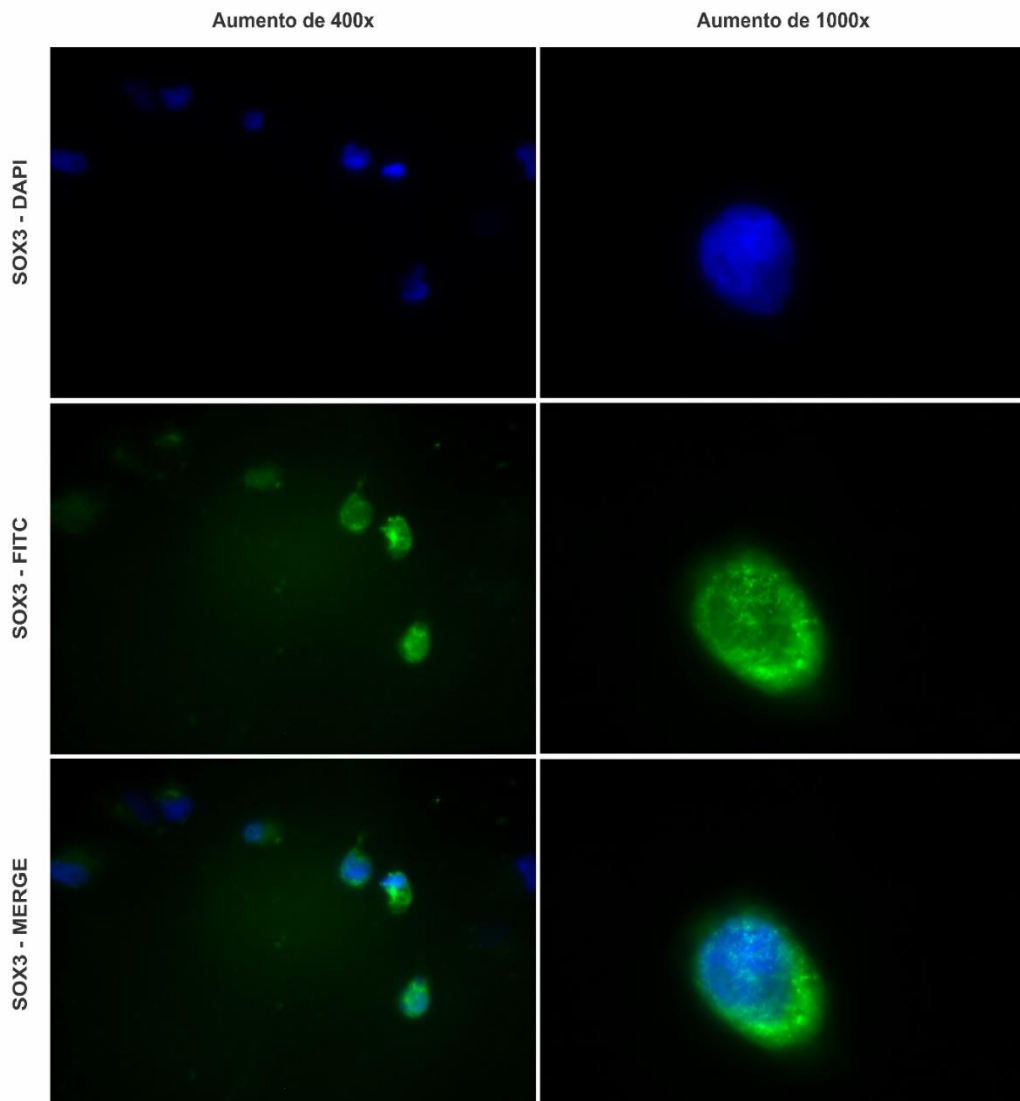
O protocolo foi realizado em todos os grupos experimentais. Como descrito na literatura a linhagem celular MDA-MB-231, não possui expressão endógena de SOX3, sendo assim nos grupos controle e transfectado com vetor vazio pEF1/Myc-His, não houve marcação para a proteína SOX3 (Figura 17), corroborando com os dados da literatura.

Figura 17: Ausência de expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor vazio pEF1/Myc-His/SOX3. Fotomicrografias evidenciando marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), ausência de marcação para SOX3 (FITC) e a sobreposição das imagens (Merge). As imagens foram adquiridas com o auxílio de microscópio de fluorescência invertido digital Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 200x.



Na figura 18 encontra-se as imagens adquiridas após marcação com os anticorpos. Pode-se observar que ocorreu marcação específica para o anticorpo SOX3, mostrando então que o protocolo de transfecção foi eficiente. Outro importante dado a ser ressaltado é em relação a densidade de células. Observa-se uma densidade de células reduzida, sendo uma característica esperada, pois a expressão de SOX3 pode estar relacionada com a indução de morte celular, sendo assim acredita-se que parte das células que foram transfectadas entraram em morte e não chegaram a passar pelo processo de marcação.

Figura 18: Expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3. Fotomicrografias evidenciando marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasmática para SOX3 (FITC) e a sobreposição das imagens (Merge). As imagens foram adquiridas com auxílio de microscópio de fluorescência invertido digital Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x e 1000x.



5.4 Avaliação da citotoxicidade e morte celular apoptótica na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Com base nos resultados da imunofluorescência das células MDA-MB-231 transfectadas com pEF1/Myc-His/SOX3, observou-se uma baixa densidade de células. Este resultado pode estar relacionado com a indução de morte celular devido a expressão de SOX3.

Sendo assim para verificar a indução de morte, como também o tipo de morte celular ocorrido após a transfecção, a linhagem celular MDA-MB-231 foi submetida ao processo de transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His e após 24 horas foram avaliadas as características morfológicas e a busca por possíveis alterações indicativas de morte celular.

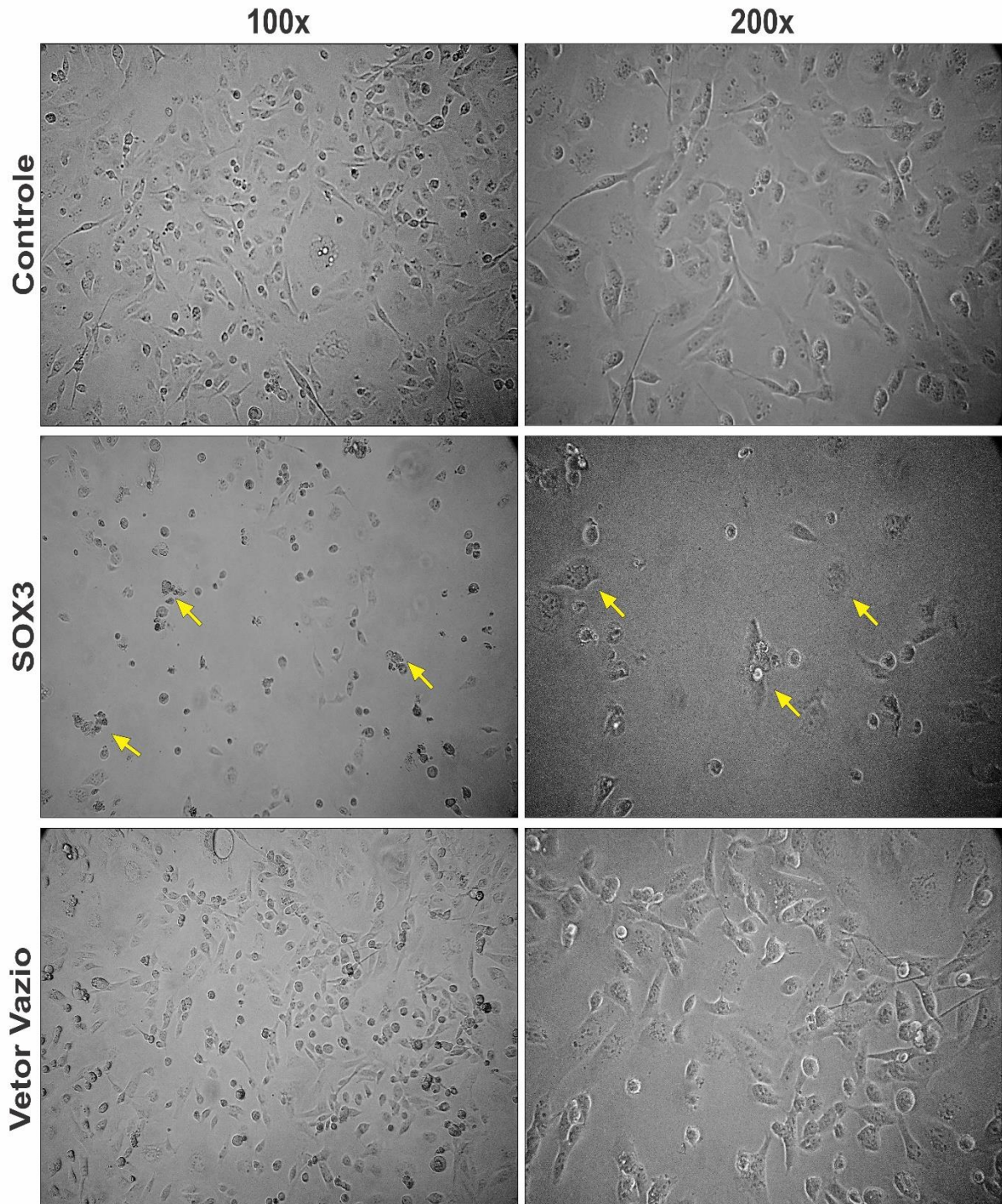
Após a transfecção com vetor de SOX3 as células foram fotografadas em microscópio invertido digital Zeiss Z1 utilizando contraste de fase, no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Observou-se que as células se encontravam em menor densidade e confluência, como também apresentavam alterações morfológicas, como redução do volume celular, arredondamento celular e alterações na membrana, indicadas por setas amarelas na figura 19. Os grupos, controle e vetor vazio pEF1/Myc-His não apresentaram alterações morfológicas, como também não foi observado diminuição na densidade dos poços (Figura 19).

A semelhança entre as células do controle com as células que passaram pela transfecção com o vetor vazio pEF1/Myc-His, indicam que o protocolo de transfecção pode não produzir efeitos citotóxicos, sendo então um indicativo que as alterações morfológicas e a indução de morte celular estão relacionadas estritamente com a expressão de SOX3.

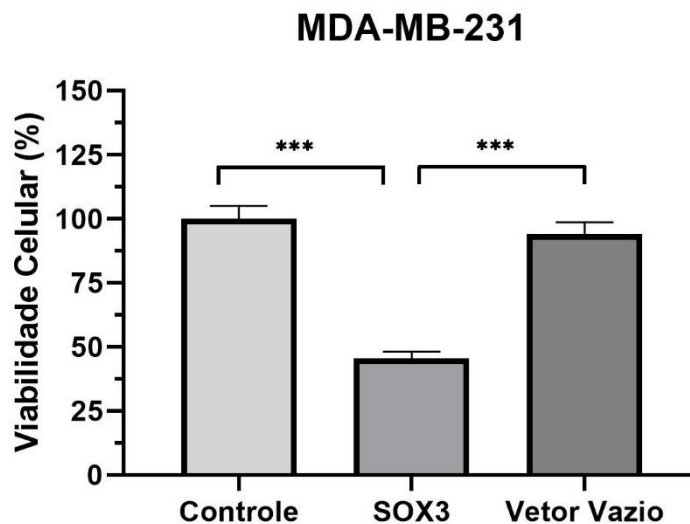
Como forma de confirmar os efeitos encontrados na avaliação morfológica, avaliou-se o possível efeito citotóxico do protocolo de transfecção através da técnica de MTT. Foi avaliado todos os grupos experimentais, controle não transfectado, como também os grupos transfectados com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.

Figura 19: Alterações morfológicas na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His. As fotomicrografias mostram alterações morfológicas após 24 horas da transfecção. No controle observa-se células com características morfológicas características. As células transfectadas apresentaram redução do número de células e do volume celular, irregularidades na membrana e arredondamento celular (Setas amarelas). Na condição vetor vazio as células mantiveram características morfológicas à do controle. As imagens foram adquiridas com o auxílio de microscópio de fluorescência invertido digital Zeiss Z1 no aumento de 100x e 200x.



A avaliação da viabilidade celular após o protocolo de transfecção, demonstrou que o grupo transfectado com o vetor de expressão de SOX3 teve sua viabilidade reduzida em cerca de 55%, indicativo que indução de morte celular, sendo esta taxa significativa estatisticamente em relação aos dois outros grupos controle ($p > 0,0001$). Quando avaliado a viabilidade dos grupos controle e transfectado com vetor vazio, não houve diferença estatística entre os dois grupos, demonstrando então que a redução da viabilidade celular encontrada no grupo transfectado com SOX3, ocorreu devido a expressão de SOX3 (Figura 20).

Figura 20: Avaliação do efeito citotóxico na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His. Citotoxicidade avaliada após 24 horas da transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His. Viabilidade celular medida através do teste MTT. Média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata ($n=3$). *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle e transfectado com vetor vazio.



Ao verificar-se que SOX3 induz uma redução da viabilidade celular, sendo um possível perfil citotóxico, decidiu-se determinar o tipo de morte celular induzida pela expressão de SOX3. Desta forma as células passaram pelo protocolo de transfecção e após 24 horas foi realizado protocolo de marcação para avaliação de morte celular utilizando citômetro de fluxo.

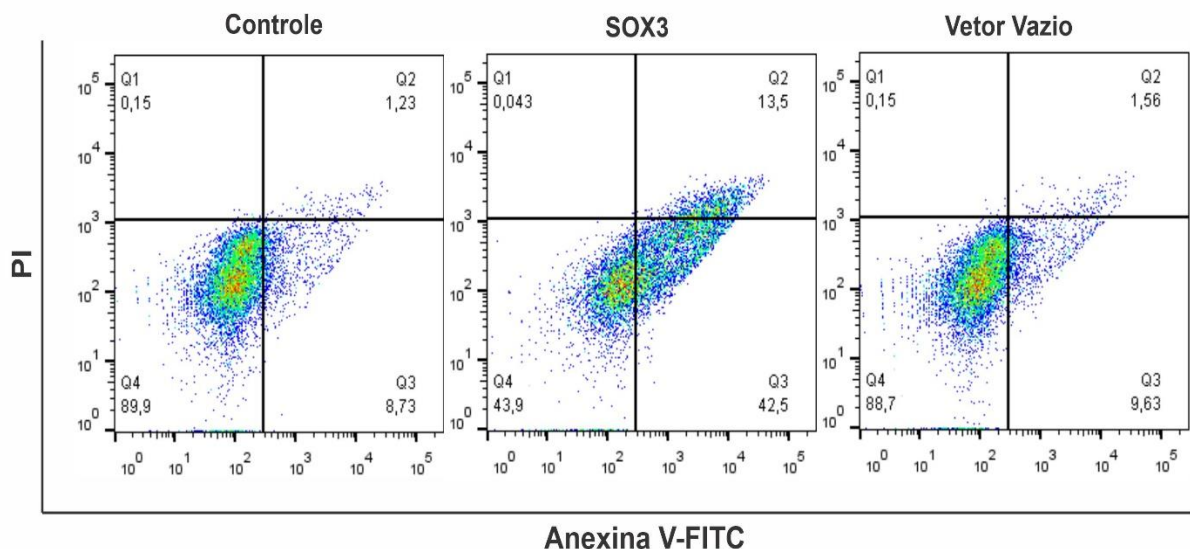
Para verificar a capacidade de indução de morte celular apoptótica após a transfecção com SOX3, foi utilizando kit de dupla marcação com Anexina V-FITC e PI (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit - BD pharmingen, EUA). A avaliação de morte celular utilizando Anexina V, é um método rápido e quantitativo, onde é possível determinar a população que se encontra em morte apoptótica, isso é possível devido a afinidade da sonda de marcação Anexina

V com a fosfatidilserina, um fosfolípido encontrado na face interna da membrana celular e é externalizado durante as fases iniciais da apoptose, onde ocorre o flip membranar. Como a Anexina V pode-se ligar a fosfatidilserina de células rompidas, utiliza-se a dupla marcação com Iodeto de propídeo (PI) que é um marcador nuclear fluorescente, que se intercala com DNA de células que estão com a membrana permeável, marcando então células em morte necrótica (NEVES; BRINDLE, 2014; WALLBERG; TENEV; MEIER, 2016).

A figura 21 apresenta um *Dot-plot* representativo dos resultados da leitura no citômetro de fluxo. Os gráficos apresentam a fluorescência da Anexina V-FITC no eixo X e do PI no eixo Y. No quadrante Q1 encontram-se as células marcadas somente com PI, sendo consideradas células mortas por necrose. No quadrante Q2 encontram-se as células duplo marcadas (Anexina V-FITC e PI), são células que estão em apoptose tardia. O quadrante Q3 determina as células marcadas somente com Anexina V-FITC, ou seja, células em apoptose inicial e por último no quadrante Q4 encontra-se as células duplo negativas e viáveis.

Sendo assim este teste permite avaliar a quantidade de células em estágios iniciais e tardios de apoptose, como também determinar a quantidade de células em possível morte necrótica.

Figura 21: Dot-plot representativo de cada condição na avaliação da morte celular apoptótica na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His. As células foram transfectadas com pEF1/Myc-His/SOX3 e incubadas por 24 horas. Após a incubação as células foram marcadas com PI e Anexina V-FITC, e a marcação e intensidade da fluorescência foi medida utilizando citômetro de fluxo FACSCanto II. **Q1:** Células marcadas com PI. **Q2:** Células marcadas com Anexina V-FITC e PI. **Q3:** Células marcadas com Anexina V-FITC. **Q4:** Células não marcadas.



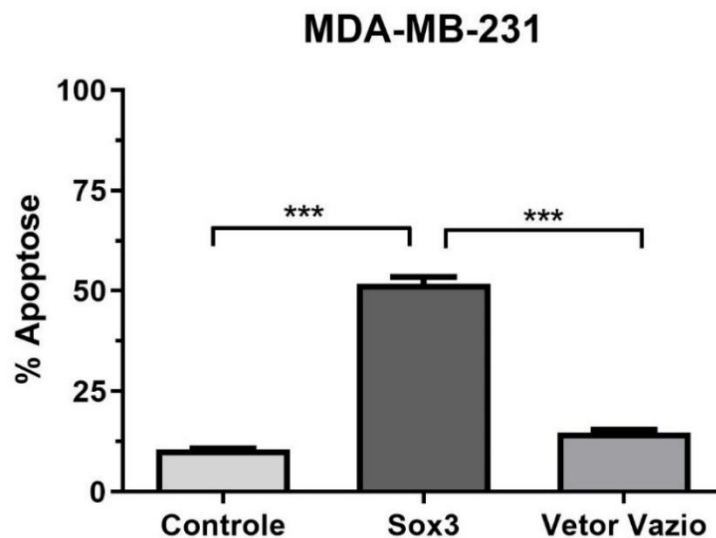
Foram realizados três experimentos independentes, e cada experimento em triplicata. Pode-se observar que o grupo controle apresenta uma taxa de viabilidade celular de 90% e uma taxa de morte celular apoptótica em torno de 10%. Estas taxas são consideradas normais para esta condição.

Na avaliação das células transfectadas com SOX3, observa-se um grande aumento na porcentagem de células positivas para a marcação com Anexina V-FITC, indicando que 42,5% da população encontra-se em apoptose inicial (Q3) e 13,5% da população em apoptose tardia (Q2), devido a dupla marcação (Anexina V-FITC/PI). Já a população de células que passaram pelo processo de transfecção com o vetor vazio, apresentaram taxas de viabilidade celular e morte por apoptose semelhante às do controle, mostrando então que o protocolo de transfecção por si só não é responsável pela morte celular.

Sendo assim, este resultado, corrobora com os dados descritos anteriormente, sendo a presença de baixa densidade celular, alterações morfológicas, como também a diminuição da viabilidade celular, demonstrando um efeito citotóxico (Figura 18 e Figura 19).

Um gráfico de barras foi realizado a partir das triplicatas dos três experimentos independentes. Os valores foram reunidos, desta forma, chegou-se a uma média da taxa de apoptose em cada grupo. Outro fator importante para análise foi a junção dos quadrantes Q3 (apoptose inicial) e Q2 (apoptose tardia) no mesmo grupo, tornando-os somente um grupo. Desta forma foi realizada a avaliação estatística dos resultados. A figura 22 representa a média \pm DP da porcentagem de apoptose encontrada em cada grupo.

Figura 22: Taxa de apoptose na linhagem tumoral MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3. Gráfico representando a soma da porcentagem de células em apoptose inicial e apoptose tardia em cada condição. Média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata (n=3). ***p<0,001 em relação ao grupo controle e transfectado com vetor vazio.



A taxa média de apoptose no grupo controle foi de 10%, no grupo transfectado com SOX3 a média encontrada foi de 52% e no grupo transfectado com vetor vazio foi de 13%. Ao realizar o teste estatístico One-way ANOVA, foi encontrado que o grupo transfectado com SOX3 apresentou diferença estatística quando comparado ao controle apresentando $p < 0,0001$, como também foi diferente do grupo vetor vazio, apresentando também um $p < 0,0001$.

Já a análise do grupo controle com o grupo transfectado com o vetor vazio, não apresentou diferença estatística, mostrando então que o protocolo de transfecção e os reagentes utilizados não são capazes de induzir morte, ou alterar as características celulares, mantendo as características normais das células.

5.5 Avaliação por PCR em tempo real a expressão de *SOX3*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX* e *BCL2* na linhagem MDA-MB-231 após a transfecção com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Após a avaliação por PCR convencional e com a confirmação da expressão dos genes alvos, foi realizada a PCR em tempo real (RT-qPCR) para quantificação relativa do gene *SOX3* e dos genes relacionados a apoptose, como a caspase iniciadoras (Caspase-8 e 9), e a caspase efetora (Caspase-3), assim como a expressão de *BCL2* (anti-apoptótico) e *BAX* (pró-apoptótico) (Figura 23).

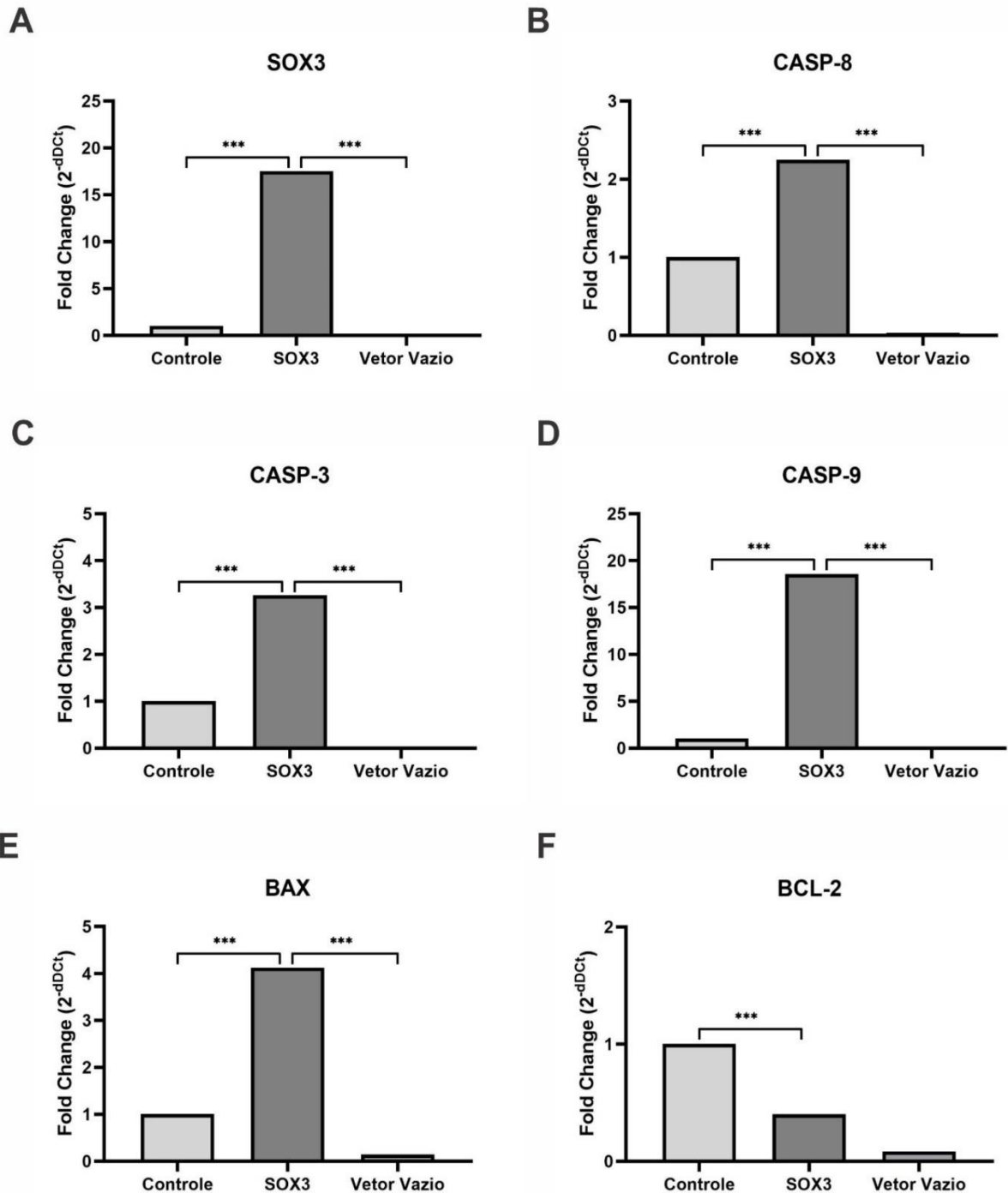
O resultado da RT-qPCR confirmou, que após a transfecção com o vetor de expressão de *SOX3*, as células MDA-MB-231 passaram a expressar o gene alvo. A expressão de *SOX3* (Figura 23 A), foi 17,51 vezes maior do que o observado no grupo controle não transfectado (*Fold change* 1,0), sendo esse aumento da expressão significativo ($p > 0,001$). Após determinada a expressão de *SOX3*, foi então avaliado a expressão dos genes relacionados a apoptose, para verificar a modulação destes genes, em relação a presença ou ausência da expressão de *SOX3*.

A expressão gênica de *CASP8* nas células transfectadas com *SOX3* (Figura 23 B), teve um aumento de 2,24 vezes em relação ao controle não transfectado, sendo essa relação significativa com $p > 0,001$. Outra caspase iniciadora avaliada, foi a *CASP9* (Figura 23 D), onde foi encontrado um aumento significativo da sua expressão, tendo um valor de 18,54 vezes maior em relação ao grupo controle ($p > 0,001$).

Observa-se também o aumento de *CASP3* cerca de 3,26 vezes maior quando comparado ao controle (Figura 23 C). Estes resultados demonstram que após a transfecção e expressão de *SOX3* nas células MDA-MB-231, as vias de apoptose relacionadas às caspases 8, 9 e 3 foram ativadas. Os resultados de expressão gênica corroboram com os resultados da citometria de fluxo (Figura 22), demonstrando que a transfecção das células MDA-MB-231 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 aumentara as taxas de apoptose em comparação com os grupos controle.

Na avaliação da expressão do gene pró-apoptótico *BAX* no grupo transfectado com pEF1/Myc-His/SOX3, observou-se um aumento de 4,11 vezes quando comparado ao controle não transfectado (Figura 23 E). Já ao avaliar o gene anti-apoptótico *BCL2* observa-se uma redução de cerca de 60% na expressão no grupo transfectado com pEF1/Myc-His/SOX3 (Figura 23 F), quando comparado a expressão no grupo controle. Esses resultados indicam uma modulação relacionada a expressão de *SOX3* nos genes reguladores da apoptose.

Figura 23: Avaliação da expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His. **A:** Expressão de *SOX3* (Fold change 17,51). **B:** Expressão de *CASP8* (Fold change 2,24). **C:** Expressão de *CASP3* (Fold change 3,26). **D:** Expressão de *CASP9* (Fold change 18,54). **E:** Expressão de *BAX* (Fold change 4,11). **F:** Expressão de *BCL2* (Fold change 0,40). Os dados foram expressos com os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *** $p > 0,001$ em relação aos grupos controle e vetor vazio.



5.6 Avaliação por PCR em tempo real a expressão de genes relacionados a transição epitélio-mesênquima, *ECAD*, *NCAD*, *SNAIL*, *ZEB1*, *ZEB2* na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

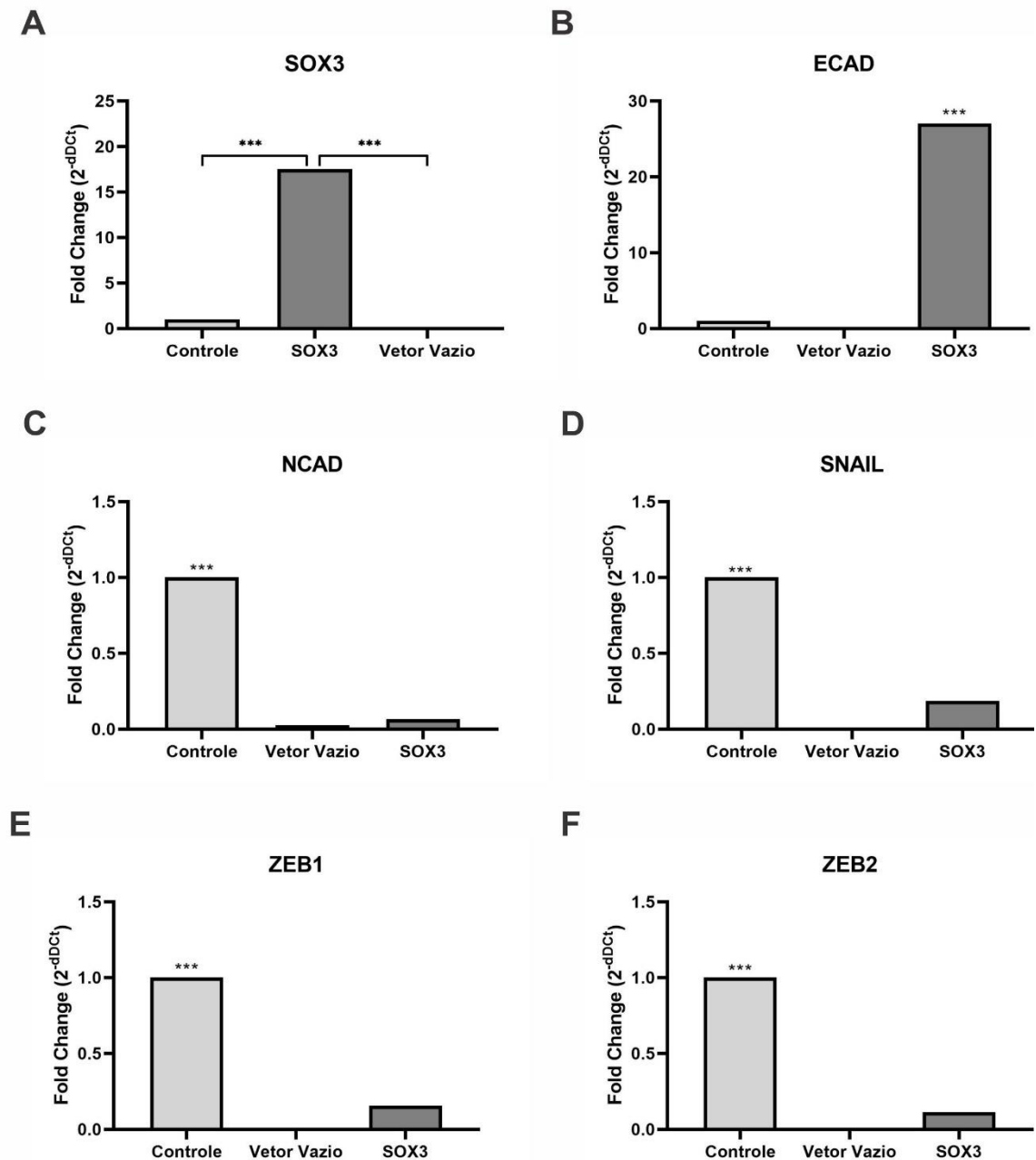
Como demonstrado no tópico anterior, a expressão de *SOX3* foi determinada por RT-qPCR, mostrando a funcionalidade da transfecção com o vetor de expressão. A avaliação de genes relacionados a TEM ocorreu devido a necessidade de entender quais as modulações que a expressão de *SOX3* promoveria em uma linhagem sabidamente definida como triplo negativa, com características de resistência a morte celular, potencial invasivo e metastático.

Ao avaliar a expressão de E-caderina após a transfecção com *SOX3* (Figura 24 B), observou-se um aumento de cerca de 27 vezes em relação ao grupo que não foi transfectado, com significância estatística ($p > 0,001$). O aumento da expressão de *ECAD* demonstra uma tendência na redução da capacidade migratória e invasiva das células, sendo que esta molécula atua na manutenção do perfil epitelial e promoção da adesão.

Foi avaliado as moléculas relacionadas ao perfil mesenquimal, avaliou-se a expressão de N-caderina, onde observou-se uma redução da expressão de cerca de 94% nas células que foram transfectadas com *SOX3* (Figura 24 C), quando comparadas com as células do grupo controle ($p > 0,001$). Além da avaliação de moléculas relacionadas a adesão celular, como as caderinas, avaliou-se também a expressão gênica de importantes fatores de transcrição, que são conhecidos pelo seus papeis na TEM.

A expressão do fator de transcrição *SNAIL* (Figura 24 D), teve uma redução significativa no grupo que expressa *SOX3*, sendo uma redução de 82% em relação ao grupo controle ($p > 0,001$). O mesmo perfil foi encontrado na avaliação da expressão dos fatores de transcrição *ZEB1* e *ZEB2*. Observando-se uma diminuição da expressão no grupo positivo para *SOX3*. O fator *ZEB1* (Figura 24 E) teve uma redução de 85% da sua expressão, já o fator de transcrição *ZEB2* (Figura 24 F), teve uma redução de 89% da sua expressão, ambos comparado ao grupo controle não transfectado, tendo um perfil estatístico significativo com $p < 0,001$.

Figura 24: Avaliação da expressão de genes relacionados a transição epitélio-mesênquima na linhagem MDA-MB-231 após transfecção com vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His. A: *SOX3* (Fold change 17,51). B: *ECAD* (Fold change 27,01). C: *NCAD* (Fold change 0,06). D: *SNAIL* (Fold change 0,18). E: *ZEB1* (Fold change 0,15). F: *ZEB2* (Fold change 0,11). Os dados foram expressos com os valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. ***p>0,001 em relação ao grupo transfectado com SOX3.



5.7 Avaliação da expressão e imunolocalização de SOX3 e pró-Caspase-3 em amostras de carcinoma ductal invasivo humano

A expressão de SOX3 foi avaliada em 27 amostras parafinadas de casos de carcinoma ductal invasivo humano (CDI). Os casos passaram pelo protocolo de imunohistoquímica e após a marcação, foram analisados em microscópio para avaliar a positividade.

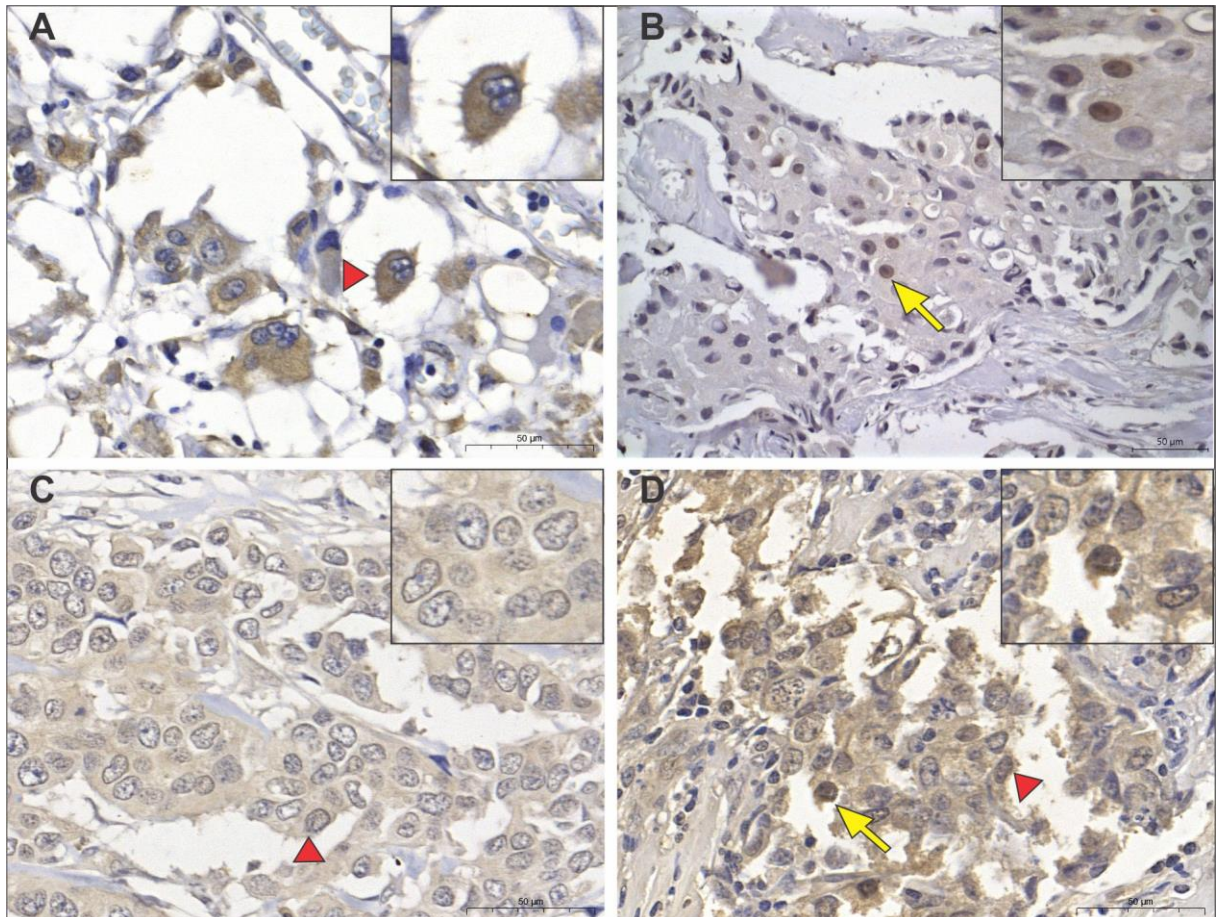
Na análise dos casos revelou-se que 52% eram positivos para expressão de SOX3 (14 de 27 casos). Dentro dos casos positivos, avaliou-se a imunolocalização, e 72% dos casos apresentam marcação citoplasmática (10/14) e 28% (4/14) com imunolocalização nuclear.

Os casos de CDI positivos para SOX3, foram contados conforme metodologia descrita no item 4.17. Eles apresentaram padrão de marcação difusa, com características granulares e intensidade fraca/moderada, com média de 25% de células coradas (Figura 25 A e B).

A imunohistoquímica para pró-caspase-3 foi avaliada em 14 casos de CDI. Após a marcação e avaliação, definiu-se 50% dos casos como positivos (7/14). As células positivas para pró-Caspase-3 apresentam padrão de coloração difusa e granular, com intensidade fraca/moderada, com média de 50% das células coradas. Em relação a imunolocalização, 4 dos casos positivos, mostraram coloração exclusivamente citoplasmática (Figura 25 C), enquanto os outros 3 casos, apresentaram imunolocalização citoplasmática e nuclear (Figura 25 D).

Na avaliação estatística, utilizando os dados de contagem das células de todos os casos positivos. Foi realizado um pareamento dos casos de SOX3 e pró-caspase-3 para se verificar uma correlação da expressão de ambos os marcadores, porém não foram encontradas evidências de correlação entre SOX3 e pró-Caspase-3. Essa dificuldade de correlação tem como principal razão a necessidade de um número mais significativo de amostras.

Figura 25: Avaliação por imunohistoquímica da expressão de SOX3 e pró-Caspase-3 em amostras de carcinoma ductal invasivo de mama humano. A: Imunomarcacão citoplasmática para SOX3. **B:** Imunomarcacão nuclear para SOX3. **C:** Imunomarcacão citoplasmática para pró-Caspase-3. **D:** Imunomarcacão citoplasmática e nuclear para pró-Caspase-3. Barra de escala = 50 µm. Setas amarelas: Imunomarcacão nuclear. Setas vermelhas: Imunomarcacão citoplasmática. Aumento de 400X com insert de 600X. Imagens adquiridas utilizando câmara Olympus BX_40 acoplada (Olympus, Tokyo, Japão).



6. DISCUSSÃO

A expressão e função de SOX3 já é descrita em diferentes tumores e, portanto, assim como SOX2, a proteína SOX3 faz parte do subgrupo SoxB1, gerando uma expectativa de se observar funções biológicas semelhantes, devido à similaridade. Essa expectativa, foi observada em estudo realizado por YAN, et al., 2016, demonstrando que SOX3 se comportou como oncogene em tumores ovarianos (YAN, Qin *et al.*, 2016), assim como a alta expressão de SOX3 em carcinomas hepatocelular foi relacionada com o estágio avançado do tumor e baixa diferenciação, sendo um fator determinante para o mau prognóstico dos pacientes (FENG, Yun *et al.*, 2017). Outro estudo observou a elevada expressão de SOX3 em glioblastomas, favorecendo o aumentando da proliferação, viabilidade celular, migração e invasão (VICENTIC *et al.*, 2018), por fim, estudo recente realizado por SHEN *et al.*, 2020, demonstrou que SOX3 é altamente expresso em câncer gástrico, sendo essa expressão relacionada a um tumor com perfil mais proliferativo, migratório e invasivo, com maiores chances de metastatização.

Nos cânceres de mama já foi descrito a expressão de diferentes membros da família SOX. A expressão de SOX1 foi definida como um supressor tumoral em diferentes tumores de mama (SONG *et al.*, 2016). Em contrapartida, a expressão de SOX2 está relacionada a tumor com alta malignidade, com maior potencial invasivo, comprometimento linfonodal, promovendo a proliferação, angiogênese e conseqüentemente a metastatização (DAS *et al.*, 2017b; LIANG, Shanshan *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2021). Do mesmo modo, foi observado que alguns subtipos de câncer de mama possuem a superexpressão de SOX4, favorecendo a transição epitélio mesênquima (MEHTA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2012a). Assim como, SOX11 também já foi descrito como facilitador na progressão, regulando a proliferação, migração e invasão (OLIEMULLER *et al.*, 2017).

Portanto, visto que o papel da proteína SOX3 é pouco explorado no câncer de mama, quando comparado a outros membros da família SOX, o presente estudo é o primeiro a dedicar-se a investigar a participação de SOX3 no câncer de mama. A expressão de SOX3 foi avaliada na linhagem tumoral MDA-MB-231, modelo de carcinoma ductal invasivo, classificado como triplo negativo – subtipo *claudin low* (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

A linhagem celular MDA-MB-231 não expressa SOX3 (ACLOQUE; OCANA; *et al.*, 2011) e após a transfecção e confirmação da expressão de SOX3, foi observado a indução de

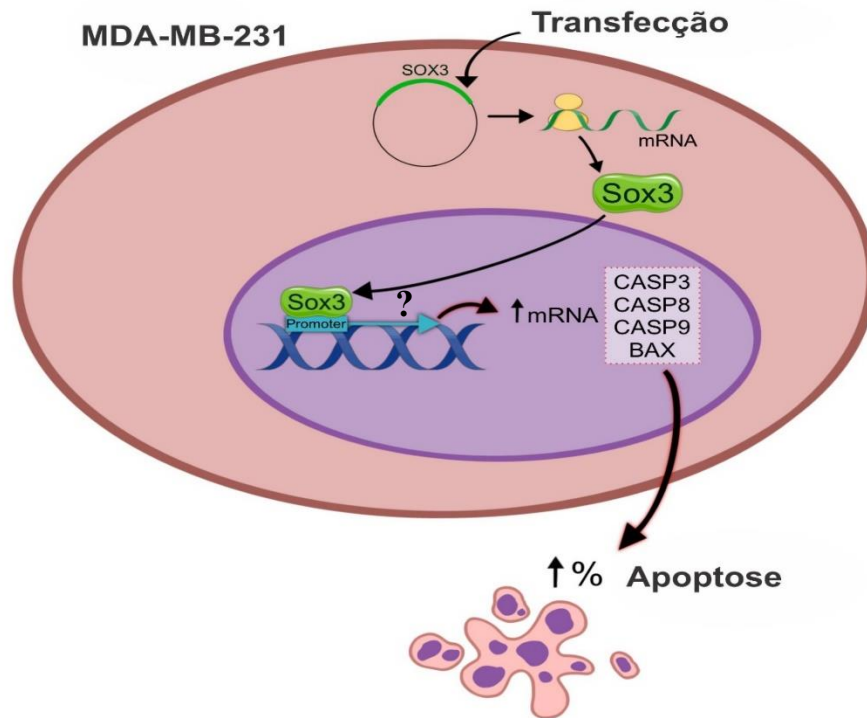
morte celular apoptótica, principalmente pela vias de ativação de caspases e família Bcl-2.

Mediante o resultado exposto e o conhecimento em relação as vias apoptóticas, entende-se que a expressão de *SOX3*, está relacionada com a indução de morte por apoptose e atua na regulação de genes responsáveis pelo controle das vias deste tipo de morte. Como *CASP3* é a principal caspase efetora em ambas as vias, o aumento da expressão das caspases iniciadoras 8 e 9, assim como o aumento da expressão de *BAX*, pode-se inferir que a principal via de indução de morte apoptótica está relacionada com a via intrínseca, onde ocorre a modulação da família Bcl-2, juntamente com a ativação de *CASP9*.

Estudos conduzidos por KHAZAEI *et al.*, 2017, avaliou o efeito de um composto sobre a indução de apoptose em diferentes linhagens tumorais de mama. A linhagem MDA-MB-231 foi uma das linhagens estudadas e os resultados de expressão gênica, demonstraram que a indução de morte por apoptose foi possível através da ativação de *BCL2* e Caspases, sendo independente de p53. Porém depara-se na necessidade de estudos *in silico*, onde pode-se avaliar quais as regiões promotoras estão sendo reguladas pela proteína *SOX3* nas vias apoptóticas.

A figura 26 representa esquematicamente o entendimento da atuação de *SOX3* nas vias apoptóticas.

Figura 26: Esquema da expressão de genes apoptóticos em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor de expressão pEF1/Myc-His/SOX3. A regulação positiva da expressão de mRNA pró-apoptótico *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* e *BAX*, em contraste com a diminuição da expressão de mRNA anti-apoptótico *Bcl-2*, reforça o papel do fator de transcrição *SOX3* na regulação da apoptose na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231.



Fonte: Autoria do grupo de pesquisa – BioRender

A expressão gênica e proteica de *SOX3*, além de reduzir a viabilidade celular e aumentar a expressão de importantes genes relacionados a apoptose, pode-se relacionar no controle das vias da Transição epitélio-mesênquima (TEM).

A TEM é um importante marco na progressão tumoral, onde as células cancerígenas ganham o aumento da capacidade de migração, invasão e metastatização. Entender a regulação das vias de indução da TEM e seus fatores de transcrição, tornou-se fundamental, para compreender os principais mecanismos de resistência de diferentes tipos tumorais. Dentro do câncer de mama, estudos tem demonstrado o papel de membros da família SOX na indução e favorecimento da TEM, como *SOX2*, *SOX9* e *SOX4* (LIU, Peng *et al.*, 2018; MANDALOS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2012b).

SOX9 é definido como um dos fatores de transcrição que desempenham importante papel na TEM, sendo ela superexpressa em grande parte dos tumores de mama, principalmente nos

tumores triplo-negativos, onde regula o crescimento tumoral, liberando sinalização para promoção da migração e invasão e consequentemente favorecendo a metástase (LEI *et al.*, 2016). Ao mesmo tempo que induz sinalização favorecendo a TEM, SOX9 possui papel regulatório na resistência dos tumores a apoptose (MA *et al.*, 2020). A alta expressão de SOX2 é relatada na literatura como importante fator na progressão tumoral de tumores mamários, sendo associada a ativação das vias de TEM e resistência a apoptose (LIU, Kuancan *et al.*, 2017). Estudo realizado por LIU *et al.*, 2018, mostrou que diversas linhagens tumorais de mama, dentre elas, o modelo MDA-MB231, possuíam uma alta expressão de SOX2, sendo a expressão relacionada a capacidade infiltrativa e migratória dos modelos tumorais. Ao ser silenciada a expressão nos modelos, observou-se a redução da capacidade proliferativa e invasiva e aumento da indução de apoptose. Outros estudos tem demonstrado o papel de SOX4 com a capacidade aumento da malignidade dos tumores de mama, atuando na promoção da proliferação, migração e invasão, favorecendo a TEM e diminuindo as taxas de indução apoptótica (HANIEH *et al.*, 2020; PARVANI; SCHIEMANN, 2013; ZHANG *et al.*, 2012b)

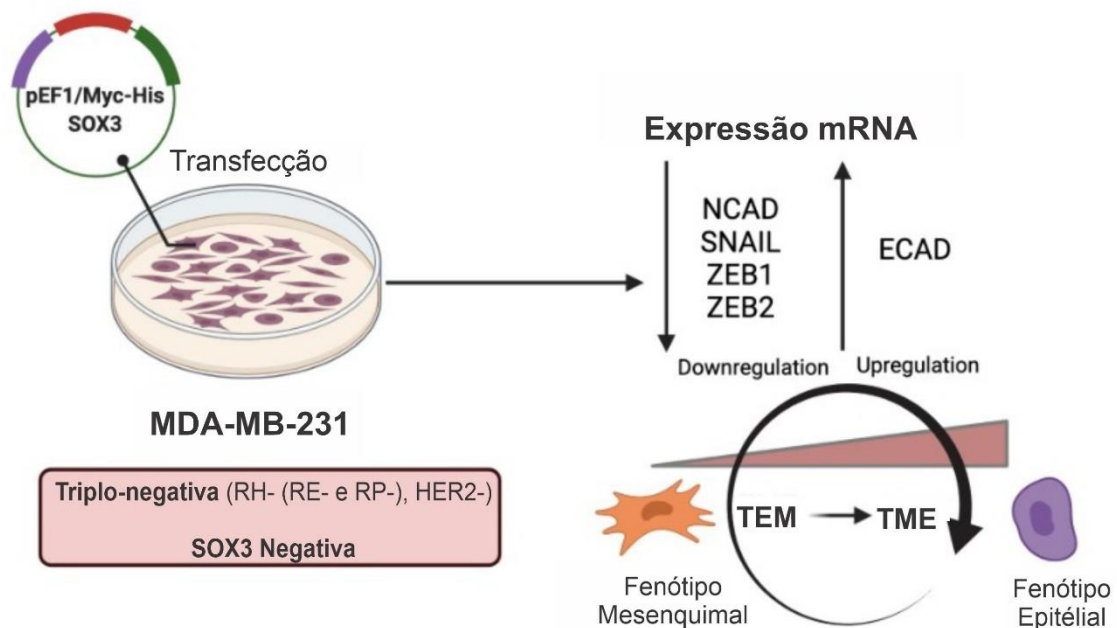
A relação da expressão de *SOX3* e seu papel na indução da TEM, ainda é pouco explorada. Segundo QIU *et al.*, 2017, *SOX3* é superexpresso em osteossarcomas, sendo essa superexpressão capaz de aumentar a expressão de *SNAIL*, através da ligação direta a região promotora deste gene. Esse aumento de *SNAIL*, foi responsável pela promoção de um perfil mais invasivo e metastático, favorecendo então a TEM. No câncer de mama o papel de *SOX3* ainda não é descrito, sendo publicado na literatura um único estudo que indica a relação de elevados níveis de *SOX3* como um fator importante na inibição de TEM, atuando em conjunto com a baixa expressão de *SNAIL* na linhagem celular de câncer de mama, MCF-7 (ACLOQUE; OCAÑA; *et al.*, 2011).

Desta forma, os resultados do presente estudo revelaram que a indução da expressão da proteína *SOX3* na linhagem celular de câncer de mama, triplo-negativa MDA-MB-231 foi capaz de alterar a expressão de importantes genes ligados na indução da TEM.

Segundo HOLLIDAY; SPEIRS, 2011, a linhagem tumoral MDA-MB-231, é classificada como triplo negativa, subtipo *claudin-low*. Uma importante característica deste subtipo é a baixa expressão de E-caderina, favorecendo um perfil de migração, invasão e metastatização. Nos resultados de RT-qPCR, ao avaliar a expressão gênica de *ECAD* após a expressão com *SOX3*, encontrou-se um aumento significativo ($p > 0,001$) de 27 vezes, quando comparado ao controle não transfectado (*Fold change* 1,0) (Figura 23 B). Esse resultado demonstra que a

expressão de *SOX3* foi capaz de alterar as taxas de expressão dos fatores de transcrição relacionados à indução de TEM e, regulando principalmente regulando positivamente a expressão de mRNA de *ECAD*, fator chave no bloqueio da transição, favorecendo a manutenção das células no perfil epitelial, assim como discutido em relação aos fatores relacionados a via apoptótica, mais estudos são necessários para entender o papel de *SOX3* no mecanismo da transição epitélio-mesênquima (Figura 27).

Figura 27: Esquema da expressão de genes da transição epitélio-mesênquima em células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor de expressão pEF1/Myc-His/SOX3. Expressão da proteína *SOX3* no câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231, é seguido por uma indução de baixa expressão de *NCAD*, um importante marcador do fenótipo mesenquimal, e uma superexpressão de *ECAD*, um importante marcador de fenótipo epitelial.



Fonte: Autoria do grupo de pesquisa - BioRender

Pela primeira vez está sendo relatada a expressão da proteína *SOX3* em amostras parafinadas, de tecidos de carcinomas ductais invasivos de mama humano (CDI). Foi investigada a imunorreatividade da proteína *SOX3* em 27 casos de CDI. Após protocolo de imunohistoquímica e avaliação dos casos, foi encontrado um padrão de coloração fraco, com uma localização citoplasmática significativa (Figura 24 A e 24 B), e um escore baixo, com média de 25% de células marcadas. Essa característica, demonstra uma relação da baixa expressão de *SOX3*, com o comportamento de agressividade dos casos, principalmente com fenótipo de resistência à apoptose.

A imunohistoquímica para pró-caspase-3 avaliou-se em 14 casos de CDI, onde os casos apresentaram padrão de marcação, com intensidade fraca/moderada, com média de 50% das células coradas. Em relação a imunolocalização, 4 dos casos positivos, mostraram coloração exclusivamente citoplasmática (Figura 24 C), enquanto os outros 3 casos, apresentaram imunolocalização citoplasmática e nuclear (Figura 24 D). Como forma de busca de uma possível correlação de expressão entre os casos, foi realizado um pareamento dos casos de SOX3 e pró-caspase-3, porém não foram encontradas evidências de correlação entre SOX3 e pró-Caspase-3, sendo os casos positivos para pró-caspase-3 foram negativos para SOX3. Essa dificuldade de correlação tem como principal razão a necessidade de um número mais significativo de amostras, para conseguir-se um N amostral suficiente para se medir fatores de correlação.

Todos os resultados discutidos nesse trabalho, demonstram que após a transfecção com vetor de expressão de SOX3 na linhagem tumoral MDA-MB-231, importantes vias relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesênquima foram reguladas. O papel de SOX3 se mostrou capaz de reduzir a viabilidade das células, com potencial citotóxico, sendo essa redução através da indução de morte celular apoptótica. Além da indução de apoptose, observou-se uma importante redução na expressão de moléculas indutoras da TEM, sendo um fator crucial para diminuir o perfil metastático deste tipo de tumor. Esse papel se mostra contrário aos encontrados em relação ao papel de SOX2 no câncer de mama, mostrando que mesmo ambos fazendo parte do mesmo subgrupo da família SOX, a similaridade de sequência entre eles não é capaz de manter as mesmas atividades biológicas (GRIMM *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2020).

Assim como descrito por (SHEN *et al.*, 2020), onde determinou-se que SOX3 é um potencial candidato como marcador molecular prognóstico em câncer gástrico, os resultados encontrados neste trabalho, indicam que a expressão de SOX3 em tumores de mama triplo negativos, pode ser um fator favorável para a alteração do perfil resistente a apoptose e metastático, onde sua expressão pode ser considerada uma característica de tumores menos resistentes a terapia e com melhor prognóstico, sendo então um possível candidato como biomarcador molecular para câncer de mama.

7. CONCLUSÃO

O trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- A transfecção com o vetor de expressão SOX-3 foi capaz de induzir a expressão gênica e proteica de SOX3.
- A proteína SOX3 reduziu a viabilidade das células e induziu a via de apoptose nas células MDA-MB-231, sendo a indução por provável via intrínseca.
- A expressão de SOX3 foi capaz de modular a expressão de importantes genes relacionados a transição epitélio-mesênquima, mostrando o favorecimento da manutenção do perfil epitelial e redução de genes indutores do perfil mesenquimal.
- A avaliação proteica de SOX3 em carcinomas ductais invasivos por imunohistoquímica, trouxe resultados inéditos. Porém devido ao pequeno número de casos, os resultados não demonstraram correlação.
- A expressão nuclear e citoplasmática de SOX3 em tumores de mama triplo negativos, pode ser um fator favorável para a alteração do perfil resistente a apoptose, e com menor característica metastática, sendo um possível candidato como biomarcador molecular prognóstico para câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACLOQUE, HERVE; OCANA, H. OSCAR; MATHEU, ANDER; RIZZOTI, KARINE; WISE, CLARE; BADGE-LOVELL, ROBIN; NIETO, M, ANGELA. Article Reciprocal Repression between Sox3 and Snail Transcription Factors Defines Embryonic Territories at Gastrulation. **Developmental Cell**, vol. 21, p. 546–558, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.005>.

ACLOQUE, Hervé; OCAÑA, Oscar H.; MATHEU, Ander; RIZZOTI, Karine; WISE, Clare; LOVELL-BADGE, Robin; NIETO, M. Angela. Reciprocal repression between Sox3 and Snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. **Developmental Cell**, vol. 21, no. 3, p. 546–558, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.005>.

ANDERS, Carey K.; ABRAMSON, Vandana; TAN, Tira; DENT, Rebecca. The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, vol. 36, p. 34–42, 2016. https://doi.org/10.14694/edbk_159135.

BAGCI, Ozkan; KURTGÖZ, Serkan. Amplification of cellular oncogenes in solid tumors. **North American Journal of Medical Sciences**, vol. 7, no. 8, p. 341–346, 2015. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.163641>.

BARZAMAN, Khadijeh; KARAMI, Jafar; ZAREI, Zeinab; HOSSEINZADEH, Aysooda; KAZEMI, Mohammad Hossein; MORADI-KALBOLANDI, Shima; SAFARI, Elahe; FARAHMAND, Leila. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, vol. 84, no. February, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 17, no. 7, p. 395–417, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.

CASTILLO, Sandra D; SANCHEZ-CESPEDES, Montse. The SOX family of genes in cancer development : biological relevance and opportunities for therapy. **Expert Opin. Ther. Targets**, vol. 16, p. 903–919, 2012. .

CHAUDHARY, Sameer; ISLAM, Zeyaul; MISHRA, Vijaya; RAWAT, Sakshi; ASHRAF, Ghulam Md.; KOLATKAR, Prasanna R. Sox2: A Regulatory Factor in Tumorigenesis and

Metastasis. **Current Protein & Peptide Science**, vol. 20, no. 6, p. 495–504, 20 May 2019. DOI 10.2174/1389203720666190325102255. Available at: <http://www.eurekaselect.com/170935/article>.

CIMINO-MATHEWS, Ashley; SUBHAWONG, Andrea P.; ELWOOD, Hillary; WARZECHA, Hind Nassar; SHARMA, Rajni; PARK, Ben Ho; TAUBE, Janis M.; ILLEI, Peter B.; ARGANI, Pedram. Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. **Human Pathology**, vol. 44, no. 6, p. 959–965, 2013. DOI 10.1016/j.humpath.2012.09.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2012.09.005>.

D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, vol. 43, no. 6, p. 582–592, 2019. DOI 10.1002/cbin.11137. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>.

DAI, Xiaofeng; XIANG, Liangjian; LI, Ting; BAI, Zhonghu. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. **Journal of Cancer**, vol. 7, no. 10, p. 1281–1294, 2016. <https://doi.org/10.7150/jca.13141>.

DAS, Tuhin; NAIR, Rajesh R.; GREEN, Ryan; PADHEE, Shruti; HOWELL, Mark; BANERJEE, Jit; MOHAPATRA, Shyam S.; MOHAPATRA, Subhra. Actinomycin D down-regulates SOX2 expression and induces death in breast cancer stem cells. **Anticancer Research**, vol. 37, no. 4, p. 1655–1663, 2017a. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11496>.

DAS, Tuhin; NAIR, Rajesh R.; GREEN, Ryan; PADHEE, Shruti; HOWELL, Mark; BANERJEE, Jit; MOHAPATRA, Shyam S.; MOHAPATRA, Subhra. Actinomycin D down-regulates SOX2 expression and induces death in breast cancer stem cells. **Anticancer Research**, vol. 37, no. 4, p. 1655–1663, 2017b. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11496>.

DASS, Sylvia Annabel; TAN, Kim Liu; RAJAN, Rehasri Selva; MOKHTAR, Noor Fatmawati; ADZMI, Elis Rosliza Mohd; RAHMAN, Wan Faiziah Wan Abdul; DIN, Tengku Ahmad Damitri Al Astani Tengku; BALAKRISHNAN, Venugopal. Triple negative breast cancer: A review of present and future diagnostic modalities. **Medicina (Lithuania)**, vol. 57, no. 1, p. 1–18, 2021. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>.

DE OLIVEIRA SANTOS, Marcell. **Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2020. vol. 66, . <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2020v66n1.927>.

DENKERT, Carsten; LIEDTKE, Cornelia; TUTT, Andrew; VON MINCKWITZ, Gunter.

Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. **The Lancet**, vol. 389, no. 10087, p. 2430–2442, 2017. DOI 10.1016/S0140-6736(16)32454-0. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0).

DIEPENBRUCK, Maren; CHRISTOFORI, Gerhard. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 43, p. 7–13, 2016. DOI 10.1016/j.ceb.2016.06.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>.

DONG, C; WILHELM, D; KOOPMAN, P. Sox genes and cancer. vol. 447, p. 442–447, 2004. <https://doi.org/10.1159/000078217>.

DRASIN, David J.; ROBIN, Tyler P.; FORD, Heide L. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: Examining the functional consequences of plasticity. **Breast Cancer Research**, vol. 13, no. 6, 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr3037>.

EL HACHEM, Georges; GOMBOS, Andrea; AWADA, Ahmad. Recent advances in understanding breast cancer and emerging therapies with a focus on luminal and triple-negative breast cancer. **F1000Research**, vol. 8, 2019. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17542.1>.

FENG, Yixiao; SPEZIA, Mia; HUANG, Shifeng; YUAN, Chengfu; ZENG, Zongyue; ZHANG, Linghuan; JI, Xiaojuan; LIU, Wei; HUANG, Bo; LUO, Wenping; LIU, Bo; LEI, Yan; DU, Scott; VUPPALAPATI, Akhila; LUU, Hue H.; HAYDON, Rex C.; HE, Tong Chuan; REN, Guosheng. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, vol. 5, no. 2, p. 77–106, 2018. DOI 10.1016/j.gendis.2018.05.001. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

FENG, Yun; XIAO, Feng; YANG, Ning; ZHU, Nan; FU, Yong; ZHANG, Hai-bin; YANG, Guang-shun. Overexpression of Sox3 is associated with promoted tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Int J Exp Pathol**, vol. 10, no. 7, p. 7873–7881, 2017. .

FERLAY, J. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018 : GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, , p. 1–13, 2018. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.

FORONI, Chiara; BROGGINI, Massimo; GENERALI, Daniele; DAMIA, Giovanna. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treatment Reviews**, vol. 38, no. 6, p. 689–697, 2012. DOI

10.1016/j.ctrv.2011.11.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.001>.

GREEN, Douglas R.; LLAMBI, Fabien. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 7, no. 12, 2015. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>.

GRIMM, Daniela; BAUER, Johann; WISE, Petra; KRÜGER, Marcus; SIMONSEN, Ulf; WEHLAND, Markus; INFANGER, Manfred; CORYDON, Thomas J. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 67, no. March 2019, p. 122–153, 2020. DOI 10.1016/j.semcancer.2019.03.004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.03.004>.

GRIMM, Daniela; BAUER, Johann; WISE, Petra; KRÜGER, Marcus; SIMONSEN, Ulf; WEHLAND, Markus; INFANGER, Manfred; CORYDON, Thomas J. Seminars in Cancer Biology The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, no. March, p. 1–32, 2019. DOI 10.1016/j.semcancer.2019.03.004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.03.004>.

GUBBAY, JOHN; COLLIGNON, JEROME; KOOPMAN, PETER; CAPEL, BLANCHE; ECONOMOU, ANDROULLA; MUNSTERBERG, ANDREA; VIVIAN, NIGEL; GOODFELLOW, PETER; LOVELL-BADGE, ROBIN. Gubbay1990Nature. **Nature**, vol. 346, p. 245–250, 1990. .

HAJRA, Karen M.; CHEN, David Y.S.; FEARON, Eric R. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. **Cancer Research**, vol. 62, no. 6, p. 1613–1618, 2002. .

HANAHAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, vol. 12, no. 1, p. 31–46, 2022. DOI 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35022204>.

HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, vol. 144, no. 5, p. 646–674, 2011. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A; FRANCISCO, San. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. vol. 100, p. 57–70, 2000. .

HANIEH, Hamza; AHMED, Emad A.; VISHNUBALAJI, Radhakrishnan; ALAJEZ, Nehad M. SOX4: Epigenetic regulation and role in tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 67, no. June, p. 91–104, 2020. DOI 10.1016/j.semcancer.2019.06.022. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.022>.

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anatomica**, vol. 154, no. 1, p. 8–20, 1995. <https://doi.org/10.1159/000147748>.

HODOROGEA, Anastasia; CALINESCU, Andreea; ANTOHE, Mihaela; BALABAN, Mihaela; NEDELCU, Roxana Ioana; TURCU, Gabriela; ION, Daniela Adriana; BADARAU, Ioana Anca; POPESCU, Catalin Mihai; POPESCU, Raluca; POPP, Cristiana; CIOPLEA, Mirela; NICHITA, Luciana; HULEA, Ionela; BRINZEA, Alice. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. **Analytical Cellular Pathology**, vol. 2019, no. Figure 1, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3851576>.

HOLLIDAY, Deborah L; SPEIRS, Valerie. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, vol. 13, no. 4, p. 215, 12 Aug. 2011. DOI 10.1186/bcr2889. Available at: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889>.

HULVAT, Melissa C. Cancer Incidence and Trends. **Surgical Clinics of North America**, vol. 100, no. 3, p. 469–481, 2020. DOI 10.1016/j.suc.2020.01.002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.01.002>.

INCA. **A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas**. [S. l.: s. n.], 2019. Available at: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf.

JOSHI, Himanshu; PRESS, Michael F. **Molecular oncology of breast cancer**. Fifth Edit. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. DOI 10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2>.

KACZANOWSKI, Szymon. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. **Physical Biology**, vol. 13, no. 3, 2016. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>.

KALLURI, Raghu; NEILSON, Eric G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 112, no. 12, p. 1776–1784, 2003. <https://doi.org/10.1172/JCI200320530>.

KARAMANOY, Konstantina; FRANCHI, Marco; VYNIOS, Demitrios; BRÉZILLON, Stéphane. Epithelial-to-mesenchymal transition and invadopodia markers in breast cancer: Lumican a key regulator. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 62, no. May, p. 125–133, 2020. DOI 10.1016/j.semcancer.2019.08.003. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.003>.

KERR, J F R; WYLLIE, A H; CURRIE, A R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, vol. 26, no. 4, p. 239–257, Aug. 1972. DOI 10.1038/bjc.1972.33. Available at: <http://www.nature.com/articles/bjc197233>.

KHAZAEI, Somayeh; ABDUL HAMID, Roslida; RAMACHANDRAN, Vasudevan; MOHD ESA, Norhaizan; PANDURANGAN, Ashok Kumar; DANAZADEH, Fatemeh; ISMAIL, Patimah. Cytotoxicity and Proapoptotic Effects of *Allium atroviolaceum* Flower Extract by Modulating Cell Cycle Arrest and Caspase-Dependent and p53 -Independent Pathway in Breast Cancer Cell Lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1468957>.

KWA, Maryann; MAKRIS, Andreas; ESTEVA, Francisco J. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 14, no. 10, p. 595–610, 2017. DOI 10.1038/nrclinonc.2017.74. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.74>.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Fakultas Psikologi Dan Sosial Budaya Universitas Islam Indonesia Yogyakarta. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 15, no. 3, p. 178–196, 2014. DOI 10.1038/nrm3758.Molecular. Available at: [file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/EMT/nihms641027.pdf](file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan%20PhD/EMT/nihms641027.pdf).

LEI, Bo; ZHANG, Youxue; LIU, Tong; LI, Yiwen; PANG, Da. Sox9 upregulation in breast cancer is correlated with. **Int J Exp Pathol**, vol. 9, no. 7, p. 7345–7351, 2016. .

LIANG, Shanshan; FURUHASHI, Masako; NAKANE, Rie; NAKAZAWA, Seitaro; GOUDARZI, Houman; HAMADA, Jun ichi; IIZASA, Hisashi. Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 437, no. 2, p. 205–211, 2013. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.06.038. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.038>.

LIANG, Weili; SONG, Shasha; XU, Yintao; LI, Huiying; LIU, Huantao. Knockdown of ZEB1 suppressed the formation of easculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Molecular Medicine Reports**, vol. 17, no. 5, p. 6711–6716, 2018. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8677>.

LIMA, Joema Felipe; NOFECH-MOZES, Sharon; BAYANI, Jane; BARTLETT, John M.S.

EMT in breast carcinoma—A review. **Journal of Clinical Medicine**, vol. 5, no. 7, p. 1–14, 2016. <https://doi.org/10.3390/jcm5070065>.

LIU, Kuancan; XIE, Fuan; GAO, Anding; ZHANG, Rui; ZHANG, Long; XIAO, Zhangwu; HU, Qiong; HUANG, Weifeng; HUANG, Qiaojia; LIN, Baoshun; ZHU, Jian; WANG, Haikun; QUE, Jianwen; LAN, Xiaopeng. SOX2 regulates multiple malignant processes of breast cancer development through the SOX2/miR-181a-5p, miR-30e-5p/TUSC3 axis. **Molecular Cancer**, vol. 16, no. 1, p. 1–14, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0632-9>.

LIU, Peng; TANG, Hailin; SONG, Cailu; WANG, Jin; CHEN, Bo; HUANG, Xiaojia; PEI, Xiaoqing; LIU, Longzhong. SOX2 promotes cell proliferation and metastasis in triple negative breast cancer. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 9, no. AUG, p. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00942>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, vol. 25, no. 4, p. 402–408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LOIBL, Sibylle; POORTMANS, Philip; MORROW, Monica; DENKERT, Carsten; CURIGLIANO, Giuseppe. Breast cancer. **The Lancet**, vol. 397, no. 10286, p. 1750–1769, 2021. DOI 10.1016/S0140-6736(20)32381-3. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3).

MA, Yanxia; SHEPHERD, Jonathan; ZHAO, Dekuang; BOLLU, Lakshmi Reddy; TAHANEY, William M.; HILL, Jamal; ZHANG, Yun; MAZUMDAR, Abhijit; BROWN, Powel H. SOX9 Is Essential for Triple-Negative Breast Cancer Cell Survival and Metastasis. **Molecular Cancer Research**, vol. 18, no. 12, p. 1825–1838, Dec. 2020. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-19-0311. Available at: <http://mcr.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1541-7786.MCR-19-0311>.

MANDALOS, Nikolaos; RHINN, Muriel; GRANCHI, Zoraide; KARAMPELAS, Ioannis; MITSIADIS, Thimios; ECONOMIDES, Aris N.; DOLLÉ, Pascal; REMBOUTSIKA, Eumorphia. Sox2 acts as a rheostat of epithelial to mesenchymal transition during neural crest development. **Frontiers in Physiology**, vol. 5 AUG, no. September, p. 1–12, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00345>.

MEHTA, Gaurav A.; KHANNA, Pooja; GATZA, Michael L. Emerging Role of SOX Proteins in Breast Cancer Development and Maintenance. **Journal of Mammary Gland Biology and**

Neoplasia, vol. 24, no. 3, p. 213–230, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10911-019-09430-6>.

MEHTA, Gaurav A.; PARKER, Joel S.; SILVA, Grace O.; HOADLEY, Katherine A.; PEROU, Charles M.; GATZA, Michael L. Amplification of SOX4 promotes PI3K/Akt signaling in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, vol. 162, no. 3, p. 439–450, 7 Apr. 2017. DOI 10.1007/s10549-017-4139-2. Available at: <https://www2.tri-kobe.org/nccn/guideline/breast/english/breast.pdf>.

MENG, Yanchun; XU, Qunfang; CHEN, Lin; WANG, Lingfei; HU, Xichun. The function of SOX2 in breast cancer and relevant signaling pathway. **Pathology Research and Practice**, vol. 216, no. 8, p. 153023, 2020. DOI 10.1016/j.prp.2020.153023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153023>.

MORANA, Ornella; WOOD, Will; GREGORY, Christopher D. The Apoptosis Paradox in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 3, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031328>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, no. 1–2, p. 55–63, Dec. 1983. DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>.

MOYRET-LALLE, Caroline; RUIZ, Emmanuelle; PUISIEUX, Alain. Epithelial-mesenchymal transition transcription factors and miRNAs: “Plastic surgeons” of breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, vol. 5, no. 3, p. 311–322, 2014. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.311>.

NEVES, André A.; BRINDLE, Kevin M. Imaging cell death. **Journal of Nuclear Medicine**, vol. 55, no. 1, p. 1–4, 2014. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.114264>.

NOVAK, Daniel; HÜSER, Laura; ELTON, Jonathan J.; UMANSKY, Viktor; ALTEVOGT, Peter; UTIKAL, Jochen. SOX2 in development and cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 67, no. December 2018, p. 74–82, 2020. DOI 10.1016/j.semcancer.2019.08.007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.007>.

OH, Do Youn; BANG, Yung Jue. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 17, no. 1, p. 33–48, 2020. DOI 10.1038/s41571-019-0268-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>.

OLIEMULLER, Erik; KOGATA, Naoko; BLAND, Philip; KRIPLANI, Divya; DALEY,

Frances; HAIDER, Syed; SHAH, Vandna; SAWYER, Elinor J.; HOWARD, Beatrice A. SOX11 promotes invasive growth and ductal carcinoma in situ progression. **Journal of Pathology**, vol. 243, no. 2, p. 193–207, 2017. <https://doi.org/10.1002/path.4939>.

OTSUBO, T; AKIYAMA, Y; YANAGIHARA, K; YUASA, Y. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. **Br J Cancer**, vol. 98, no. 4, p. 824–831, 2008. DOI 10.1038/sj.bjc.6604193. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604193>.

PARVANI, Jenny G.; SCHIEMANN, William P. Sox4, EMT programs, and the metastatic progression of breast cancers: Mastering the masters of EMT. **Breast Cancer Research**, vol. 15, no. 4, p. 14–16, 2013. <https://doi.org/10.1186/bcr3466>.

PASSERON, Thierry; VALENCIA, Julio C; NAMIKI, Takeshi; VIEIRA, Wilfred D; PASSERON, Hélène; MIYAMURA, Yoshinori; HEARING, Vincent J. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 119, no. 4, 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI34015DS1>.

PHAN, Tri Giang; CROUCHER, Peter I. The dormant cancer cell life cycle. **Nature Reviews Cancer**, vol. 20, no. 7, p. 398–411, 2020. DOI 10.1038/s41568-020-0263-0. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>.

POURTEIMOOR, Vida; MOHAMMADI-YEGANEH, Samira; PARYAN, Mahdi. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. **Tumor Biology**, vol. 37, no. 11, p. 14479–14499, 2016. DOI 10.1007/s13277-016-5349-7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5349-7>.

QIU, Manle; CHEN, Daoyun; SHEN, Chaoyong; SHEN, Ji; ZHAO, Huakun; HE, Yaohua. Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, vol. 36, no. 46, p. 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0515-3>.

RIZZOTI, Karine; BRUNELLI, Silvia; CARMIGNAC, Danielle; THOMAS, Paul Q.; ROBINSON, Iain C.; LOVELL-BADGE, Robin. SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. **Nature Genetics**, vol. 36, no. 3, p. 247–255, 2004.

<https://doi.org/10.1038/ng1309>.

RODRIGUES, Raquel C; ALMEIDA, Camila P; OLIVEIRA, Milena C M; FERREIRA, Enio; RIBEIRO, Thais S; BORGES, Isabella T; GOMES, Hipacia W; OLIVEIRA, Cleida A; PUERTO, Helen L Del; MARTINS, Almir S. Overexpression of SOX2 is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Journal of Clinical Images and Medical Case Reports**, vol. 2, no. 3, 2021. <https://doi.org/10.52768/2766-7820/1182>.

ROSENBAUM, Sheera R.; TIAGO, Manoela; CAKSA, Signe; CAPPARELLI, Claudia; PURWIN, Timothy J.; KUMAR, Gaurav; GLASHEEN, McKenna; POMANTE, Danielle; KOTAS, Daniel; CHERVONEVA, Inna; APLIN, Andrew E. SOX10 requirement for melanoma tumor growth is due, in part, to immune-mediated effects. **Cell Reports**, vol. 37, no. 10, p. 110085, 2021. DOI 10.1016/j.celrep.2021.110085. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110085>.

SHE, Zhen Yu; YANG, Wan Xi. SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. **European Journal of Cell Biology**, vol. 94, no. 12, p. 547–563, 2015. DOI 10.1016/j.ejcb.2015.08.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.002>.

SHEN, Jiajia; ZHAI, Jing; WU, Xinqian; XIE, Guiping; SHEN, Lizong. Serum proteome profiling reveals SOX3 as a candidate prognostic marker for gastric cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, vol. 24, no. 12, p. 6750–6761, 2020. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15326>.

SONG, Lingqin; LIU, Di; HE, Jianjun; WANG, Xijing; DAI, Zhijun; ZHAO, Yang; KANG, Huafeng; WANG, Baofeng. SOX1 inhibits breast cancer cell growth and invasion through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Apmis**, vol. 124, no. 7, p. 547–555, 2016. <https://doi.org/10.1111/apm.12543>.

STOLAROVA, Lenka; KLEIBLOVA, Petra; JANATOVA, Marketa; SOUKUPOVA, Jana; ZEMANKOVA, Petra; MACUREK, Libor; KLEIBL, Zdenek. **CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate**. [*S. l.: s. n.*], 2020. vol. 9, . <https://doi.org/10.3390/cells9122675>.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185

Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 71, no. 3, p. 209–249, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

TANG, Youqun; CAO, Yanming. Sox10 knockdown inhibits melanoma cell proliferation via notch signaling pathway. **Cancer Management and Research**, vol. 13, p. 7225–7234, 2021. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S329331>.

TARIGHATI, Elaheh; KEIVAN, Hadi; MAHANI, Hojjat. A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, no. 0123456789, 2022. DOI 10.1007/s10238-021-00781-1. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00781-1>.

THOMAS, Mathew; KELLY, Erinn Downs; ABRAHAM, Jame; KRUSE, Megan. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. **Seminars in Oncology**, vol. 46, no. 2, p. 121–132, 2019. DOI 10.1053/j.seminoncol.2019.03.002. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.03.002>.

THU, Kelsie L; BECKER-SANTOS, Daiana D; RADULOVICH, Nikolina; PIKOR, Larissa A; LAM, Wan L; TSAO, Ming-Sound. SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. **Oncoscience**, vol. 1, no. 5, p. 326–35, 2014. DOI 10.18632/oncoscience.46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594027> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4278306>.

TIWARI, Neha; TIWARI, Vijay K.; WALDMEIER, Lorenz; BALWIERZ, Piotr J.; ARNOLD, Phil; PACHKOV, Mikhail; MEYER-SCHALLER, Nathalie; SCHÜBELER, Dirk; VANNIMWEGEN, Erik; CHRISTOFORI, Gerhard. Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. **Cancer Cell**, vol. 23, no. 6, p. 768–783, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.020>.

VERVOORT, S. J.; VAN BOXTEL, R.; COFFER, P. J. The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: Friend or foe?. **Oncogene**, vol. 32, no. 29, p. 3397–3409, 2013. DOI 10.1038/onc.2012.506. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.506>.

VICENTIC, Jelena Marjanovic; DRAKULIC, Danijela; GARCIA, Idoia; VUKOVIC, Vladanka; ALDAZ, Paula. SOX3 can promote the malignant behavior of glioblastoma cells.

Cellular Oncology, vol. 42, p. 41–54, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0405-5>.

VOSS, Anne K.; STRASSER, Andreas. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Research**, vol. 9, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>.

WALLBERG, Fredrik; TENEV, Tencho; MEIER, Pascal. Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting. **Cold Spring Harbor Protocols**, vol. 2016, no. 4, p. 347–352, 2016. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087387>.

WARREN, Chloe F.A.; WONG-BROWN, Michelle W.; BOWDEN, Nikola A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. **Cell Death and Disease**, vol. 10, no. 3, 2019. DOI 10.1038/s41419-019-1407-6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>.

WON, Kwang Ai; SPRUCK, Charles. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. **International Journal of Oncology**, vol. 57, no. 6, p. 1245–1261, 2020. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>.

XIAO, Weikai; ZHENG, Shaoquan; XIE, Xinhua; LI, Xing; ZHANG, Lijuan; YANG, Anli; WANG, Jian; TANG, Hailin; XIE, Xiaoming. SOX2 Promotes Brain Metastasis of Breast Cancer by Upregulating the Expression of FSCN1 and HBEGF. **Molecular Therapy - Oncolytics**, vol. 17, no. June, p. 118–129, 2020. DOI 10.1016/j.omto.2020.03.001. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.001>.

YAN, Chen; WANG, Yehua; WANG, Qian; FENG, Xiao; WANG, Long; BU, Zan; LU, Bo; JIANG, Jian. Identification of key genes and pathways in Ewing's sarcoma using bioinformatics analysis. **Journal of B.U.ON.**, vol. 23, no. 5, p. 1472–1480, 2018. .

YAN, Qin; WANG, Fangyuan; MIAO, Yi; WU, Xiaomei. Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase. **Tumor Biology**, vol. 37, no. 650, p. 12263–12271, 2016. DOI 10.1007/s13277-016-5095-x. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5095-x>.

ZHANG, Jianchao; LIANG, Qian; LEI, Yang; YAO, Min; LI, Lili; GAO, Xiaoge; FENG, Jingxin; ZHANG, Yu; GAO, Hongwen; LIU, Dong Xu; LU, Jun; HUANG, Baiqu. SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. **Cancer Research**, vol. 72, no. 17, p. 4597–4608, 2012a. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1045>.

ZHANG, Jianchao; LIANG, Qian; LEI, Yang; YAO, Min; LI, Lili; GAO, Xiaoge; FENG, Jingxin; ZHANG, Yu; GAO, Hongwen; LIU, Dong Xu; LU, Jun; HUANG, Baiqu. SOX4

induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. **Cancer Research**, vol. 72, no. 17, p. 4597–4608, 2012b. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1045>.

ANEXO I

Medical Oncology

Transcription factor SOX3 regulates apoptosis in human breast cancer

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MEDO-D-21-01893	
Full Title:	Transcription factor SOX3 regulates apoptosis in human breast cancer	
Article Type:	Original Research	
Keywords:	CBIO-D-21-01127	
Corresponding Author:	Helen Lima Del Puerto, Ph.D. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, Minas Gerais BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Felipe Henrique de Souza Silva, Master of biology	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Felipe Henrique de Souza Silva, Master of biology Adam Underwood, Doctor in Philosophy Camila Pereira Almeida, Master in bioscience Thais Salviana Ribeiro, Master in Bioscience Elaine M. Souza-Fagundes, Ph.D Almir S. Martins, Ph.D Luciana O. Andrade, Ph.D Luisa Rezende, Master in Bioscience Hipacia Werneck Gomes, Master in Bioscience Cleida Aparecida Oliveira, Ph.D Raquel Cristina Rodrigues, Medical doctor and Master in human health Isabella Terra Borges, Master in Bioscience Geovanni Dantas Cassali, Ph.D. Enio Ferreira, Ph.D. Helen Lima Del Puerto, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	CNPq	Ph.D. Geovanni Dantas Cassali
	PRPq UFMG (05/20160)	Dr Helen Lima Del Puerto
Abstract:	Background Sex-determining region Y-box 3 (SOX3) protein, a SOX transcriptions factors group, has been identified as a key regulator in several diseases, including cancer. Downregulation of transcriptions factors in invasive ductal carcinoma (IDC) can interfere in neoplasia development, increasing its aggressiveness. We investigated SOX3 protein expression and its correlation with apoptosis in the MDA-MB-231 cell line, as SOX3 and Pro-Caspase-3 immunoexpression in paraffinembedded invasive ductal carcinoma tissue samples from patients (n=27). Breast cancer cell line MDA-MD-231 transfected with pEF1-SOX3+ and pEF1-Empty vector followed by cytotoxicity	

	<p>assay (MTT), Annexin-V FITC PI for apoptosis percentage assessment by flow cytometry, qPCR for apoptotic related gene expression, immunofluorescence and immunohistochemistry to SOX3 immunolocalization in culture cells, and paraffin-embedded invasive ductal carcinoma tissue samples. Results Apoptotic rate was higher in cells transfected with pEF1-SOX3+ (56%) than controls (10%). MDA-MB-231 transfected with pEF1-SOX3+ presented upregulation of proapoptotic mRNA from CASP3, CASP8, CASP9, and BAX genes, contrasting with downregulation antiapoptotic mRNA from BCL2, compared to non-transfected cells and cells transfected with pEF1 empty vector (p<0.005). SOX3 protein nuclear expression was detected in 14% (4/27 cases) of ductal carcinoma cases, and pro-Caspase-3 expression was positive in 50% of the cases. Conclusion Data suggest that SOX3 transcription factor upregulates apoptosis in breast cancer cell line MDAMB-231, and has a down nuclear expression in ductal carcinoma cases, and need to be investigated as a tumor suppressor protein, and its loss of expression and non-nuclear action turn the cells resistant to apoptosis. Further studies are necessary to understand how SOX3 protein regulates the promoter regions of genes involved in apoptosis.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Helenice Gobbi, MD., PhD Full Professor, Universidade Federal do Triangulo Mineiro helenicegobbi@gmail.com Expert in breast cancer</p> <p>Cristiana Buzelin, MD., PhD Professor, Universidade Federal de Minas Gerais cristianabnunes@gmail.com</p> <p>Rafael Malagoli rafael.malagoli@gmail.com</p> <p>Débora Balabram debrot@gmail.com</p> <p>Marina Debrot debrot@gmail.com</p>

1 **Title:** Transcription factor SOX3 regulates apoptosis in human breast cancer
 2
 3
 4
 5 **Authors:** Felipe Henrique de Souza Silva¹, Adam Underwood², Camila Pereira Almeida¹, Thais
 6
 7
 8 Salviana Ribeiro¹, Elaine M. Souza-Fagundes³, Almir S. Martins³, Luciana O. Andrade⁴, Luisa
 9
 10 Rezende⁴, Hipacia Werneck Gomes⁴, Cleida Aparecida Oliveira⁴, Raquel Cristina Rodrigues⁵,
 11
 12 Isabella Terra Borges¹, Giovanni Dantas Cassali¹, Enio Ferreira¹, Helen Lima Del Puerto¹.
 13
 14
 15
 16
 17 **Affiliations:**
 18
 19 ¹ Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
 20
 21 ² Division of Mathematics and Sciences, Walsh University, North Canton, Ohio, USA
 22
 23 ³ Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo
 24
 25 Horizonte, Brazil.
 26
 27 ⁴ Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte,
 28
 29 Brazil.
 30
 31 ⁵ Program in Health and Development in the Midwest Region of UFMS, Campo Grande, Mato
 32
 33 Grosso do Sul, Brazil.
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41 Correspondence to: Helen Lima Del Puerto, PhD.
 42
 43 Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais -
 44
 45 Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 - Campus UFMG, Belo Horizonte - MG, 31270-901- Belo
 46
 47 Horizonte, MG, Brazil
 48
 49 Tel. 55-31-3409-2878 / Fax 55-31-3409-2879
 50
 51 e-mail: helendelpuerto@ufmg.br
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58 **Short running head:** SOX3 role in human breast cancer
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

27 **ABSTRACT**

1
28 **Background:** Sex-determining region Y-box 3 (SOX3) protein, a SOX transcriptions factors group,
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

28 **Background:** Sex-determining region Y-box 3 (SOX3) protein, a SOX transcriptions factors group,
has been identified as a key regulator in several diseases, including cancer. Downregulation of
transcriptions factors in invasive ductal carcinoma (IDC) can interfere in neoplasia development,
increasing its aggressiveness. We investigated SOX3 protein expression and its correlation with
apoptosis in the MDA-MB-231 cell line, as SOX3 and Pro-Caspase-3 immunoexpression in paraffin-
embedded invasive ductal carcinoma tissue samples from patients (n=27). Breast cancer cell line
MDA-MD-231 transfected with pEF1-SOX3+ and pEF1-Empty vector followed by cytotoxicity
assay (MTT), Annexin-V FITC PI for apoptosis percentage assessment by flow cytometry, qPCR for
apoptotic related gene expression, immunofluorescence and immunohistochemistry to SOX3
immunolocalization in culture cells, and paraffin-embedded invasive ductal carcinoma tissue
samples. **Results:** Apoptotic rate was higher in cells transfected with pEF1-SOX3+ (56%) than
controls (10%). MDA-MB-231 transfected with pEF1-SOX3+ presented upregulation of pro-
apoptotic mRNA from CASP3, CASP8, CASP9, and BAX genes, contrasting with downregulation
antiapoptotic mRNA from BCL2, compared to non-transfected cells and cells transfected with pEF1-
empty vector (p<0.005). SOX3 protein nuclear expression was detected in 14% (4/27 cases) of
ductal carcinoma cases, and pro-Caspase-3 expression was positive in 50% of the cases. **Conclusion:**
Data suggest that SOX3 transcription factor upregulates apoptosis in breast cancer cell line MDA-
MB-231, and has a down nuclear expression in ductal carcinoma cases, and need to be investigated
as a tumor suppressor protein, and its loss of expression and non-nuclear action turn the cells
resistant to apoptosis. Further studies are necessary to understand how SOX3 protein regulates the
promoter regions of genes involved in apoptosis.

54 **Keywords:** Apoptosis, Breast Cancer, Invasive ductal carcinoma, MDA-MB-231, SOX3.

52 BACKGROUND

1
2
3 53 Breast cancer is one of the most common malignancies impacting the female phenotype, and
4
5 54 invasive ductal carcinoma (IDC) is the most prevalent histopathological subtype, accounting for
6
7 55 about 90% of all breast cancers. Cancer cells are known to present genetic mutations and epigenetic
8
9 56 modifications on DNA structure, which can induce deactivation of tumor suppressor genes, lead to
10
11 57 the activation of proto-oncogenes, or result in non-functional or super-functional proteins. These
12
13 58 proteins are often involved in regulating the cell cycle and initiating cellular death and differentiation
14
15
16 [1–3].
17

18
19 60 Transcription factors (TFs) play a critical role in regulating the gene expression profile of the cell.
20
21
22 This profile directs the cells' position within the human system, guiding cellular differentiation, de-
23
24 62 differentiation, or trans-differentiation [4]. Different genes in different cell types can be regulated by
25
26 63 the same transcription factor [5]. In this context, SOX proteins are a conserved family of
27
28
29 transcriptional regulators that mediates DNA binding by a highly conserved high-mobility group
30
31 65 (HMG) domain and critically control cell fate and differentiation in major developmental processes
32
33
34 66 [6].
35

36
37 67 SOX deregulation may be significant for cancer promotion and progression [6]. When comparing
38
39 68 tumors to adjacent normal breast tissue, SOX gene and protein expression in human breast tumors
40
41
42 69 have been observed in multiple studies, suggesting that altered activation of this gene family may
43
44 70 contribute to critical aspects in breast cancer initiation, promotion, and progression. Interestingly,
45
46
47 71 previous studies have suggested an oncogenic and tumor-suppressive role for specific SOX proteins,
48
49 72 correlating their expression with some clinical cancer features such as prognosis and metastasis [7].
50

51
52 73 SOX3 upregulation is observed in human esophageal squamous cell carcinoma, epithelial ovarian
53
54 74 cancer, and osteosarcoma, suggesting cell proliferation, migration, and invasion [8–11].
55

56
57 75 In addition, high levels of SOX3 expression, with low levels of SNAIL1, a protein associated with
58
59 76 epithelial-mesenchymal transition (EMT), were observed in MCF-7 cells, a luminal A molecular
60
61
62
63
64
65

77 subtype of breast cancer, that have poorly-aggressive and non-invasive behavior besides its low
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

78 metastatic potential [12]. Furthermore, *SOX3* downregulation by siRNA in MCF7 cells causes an
79 increase in *SNAIL1* expression, suggesting that *SOX3* plays a tumor suppressor role in breast cancer
80 [12,13]. Conversely, the breast cancer cell line MDA-MB-231, a triple-negative and claudin-low
81 molecular subtype breast cancer, is associated with poor prognosis, enrichment for markers linked to
82 EMT and expression of mammary cancer stem cells features; is almost devoid of *SOX3* transcripts
83 and show high *SNAIL1* expression [12–14].

84 Although other members of the *SOX* family, including *SOX2*, *SOX4*, *SOX5*, *SOX8*, *SOX9*, *SOX10*,
85 *SOX11*, *SOX12*, and *SOX18*, are involved in sustaining proliferative signaling, cellular death
86 resistance, angiogenesis, invasion and metastasis, the expression and biological function of *SOX3* in
87 breast cancer remains unclear [7].

88 Therefore, the purpose of this study was to investigate the mechanisms underlying the effects of
89 *SOX3* expression in breast cancer MDA-MB-231 cell line through transient transfection of the pEF-
90 1-human *SOX3* expression vector to determine *SOX3* involvement in cell cycle and cell death.
91 Further, immunohistochemistry (IHC) was employed to investigate *SOX3* and Pro-Caspase-3 protein
92 expression in tissue samples from invasive ductal carcinoma (IDC) cases.

93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165

166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265

266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365

The MDA-MB-231 cells transfected with pGL3-GFP were performed to determine Lipofectamine
3000 transfection efficiency. The green fluorescent protein (GFP) expression was evaluated by
EVOS XL Core microscope and Cell Imaging System (Figure 1A and 1B). Expression of *SOX3*
protein in pEF1-*SOX3*+ transfected MDA-MB-231 cells was confirmed by immunofluorescence and
nuclear localization (Figure D). MCF-7 cells were used as a positive control for *SOX3* protein

102 expression (Figure 1C). SOX3 mRNA expression was detected in cells transfected with pEF1-
 103 SOX3+ (Figure 1E).

104 105 **Cell viability and apoptosis assessment in MDA-MB-231 cells expressing SOX3**

106 A decrease in cells viability was indicated by cytotoxicity assay (MTT) in MDA-MB-231 cells
 107 transfected with pEF-1-SOX3+. Therefore, no cytotoxicity in cells transfected with the pEF-1-Empty
 108 vector was shown (Figure 2A). Regarding apoptosis rate, flow cytometry revealed 56% of apoptotic
 109 cells in the group transfected with pEF-1-SOX3+3 (Q2+Q3), while in non-transfected cells and
 110 transfected with pEF-1-Empty vector controls presented 10% and 11%, respectively, of apoptotic
 111 cells (Q2+Q3) (Figure 2B and 2C).

112 113 **Expression of apoptotic genes in MDA-MD-231 cells expressing SOX3**

114 MDA-MB-231 cells transfected with pEF1-SOX3+ demonstrated upregulation of pro-apoptotic
 115 mRNA from CASP3 (3.26 fold change), CASP8 (2.24 fold change), CASP9 (18.5 fold change), and
 116 BAX (4.11 fold change) genes; contrasting with a downregulation of antiapoptotic mRNA BCL2
 117 (0.40 fold change), comparing to cells transfected with pEF1-empty vector ($p < 0.005$).

118 Quantitative real-time PCR showed SOX3 mRNA expression (17.5 fold change) in pEF1-SOX3+
 119 transfected cells, in comparison with cells transfected with pEF1-empty vector ($p < 0.005$).

120 121 **SOX3 and Pro-Caspase-3 expression and immunolocalization in invasive ductal carcinoma**

122 SOX3 expression in human invasive ductal carcinoma (IDC) samples revealed 52% positive for
 123 SOX3 expression (14 out of 27 cases). Therefore, in SOX3 positive cases, 72% (10/14) had
 124 cytoplasmic staining and 28% (4/14) nuclear immunolocalization. The positive SOX3 IDC cases
 125 showed a diffuse staining pattern, with granular characteristics and weak/moderate intensity, with an
 126 average of 25% of stained cells (Figure 4A and 4B). Pro-Caspase-3 immunohistochemistry was

127 evaluated in 14 IDC cases and revealed positive staining in 50% (7/14) cases. Pro-Caspase-3 positive
128 cells have a diffuse and granular staining pattern, with weak/moderate intensity, with an average of
129 50% of stained cells. 4 showed only cytoplasmic staining within the seven positive cases. In contrast,
130 the other 3 had both cytoplasmic and nuclear immunolocalization (Figure 4C and 4D). Nonetheless,
131 no evidence of a correlation between SOX3 and Pro-Caspase-3 was found, requiring a more
132 significant number of samples to perform this correlation.

134 **DISCUSSION**

135 A significant role is emerging that links the SOX transcription factor family to human cancer
136 initiation, promotion, and progression. SOX proteins are linked to oncogenic and tumor-suppressive
137 outcomes depending on tumor tissue localization, histopathological grade, and molecular subtype
138 [7]. Overall, in most studies, SOX genes behave as oncogenes in many human cancers, and SOX3
139 protein exhibits oncogenic potential in different cancer types [8–11].

140 The expression and function of SOX3 in different tumors have already been described. The behavior
141 as an oncogene in ovarian tumors was described by Yan and collaborators in 2016 [9]. As well as
142 elevated expression of SOX3 in hepatocellular carcinomas is related to advanced stages of the tumor
143 and low differentiation, being a factor for patients' poor prognosis [15]. In addition, upregulated
144 SOX3 in glioblastomas is linked to increased proliferation, cell viability, migration, and invasion
145 [16].

146 In breast cancers, the expression of different members of the SOX family has been described [17-
147 23]. Nevertheless, the present data is the first to search for SOX3 in breast cancer. SOX1 is one of
148 the SOX family members exhibiting a tumor suppressor potential in breast cancer, inhibiting
149 proliferation, invasion, and apoptosis. Interestingly, SOX1 is downregulated in breast cancer tissues
150 and cells [17]. In contrast, SOX2 expression is correlated with high-grade malignancy tumors, more
151 invasive, promoting proliferation, angiogenesis, and metastasis [18,19]. In addition, SOX4

152 overexpression in clinical specimens of human breast invasive ductal carcinoma is correlated with
153 triple-negative molecular subtype and acts in mesenchymal epithelium transition, enhancing cell
154 migration and invasion [20,21]. Finally, SOX11 has also been described as a transcription factor
155 involved in breast cancer progression, regulating proliferation, migration, and invasion [22,23].
156 SOX3 protein was found to be overexpressed in a breast cancer cell line derived from a Luminal A
157 molecular subtype (MCF-7) associated with a better prognosis [12]. The present study confirmed
158 SOX3 protein expression in the MCF-7 cells line. Therefore, SOX3 protein was interestingly found
159 mainly in the cytoplasm and low nuclear localization (Figure 1C). However, SOX3 acts as a
160 transcription factor on cellular nuclei, and mutation on SOX3 nuclear localization sequence in MCF-
161 7 cell line and breast carcinoma SOX3 positive should be investigated.
162 MDA-MB-231 is a breast cancer cell line derived from a triple-negative subtype that usually has a
163 poor prognosis. In contrast to MCF-7, the MDA-MB-231 cell line has no detectable SOX3 mRNA
164 expression (Figure 1E). The fact that MDA-MB-231 does not express SOX3 turned the cell line into
165 an experimental model suitable for SOX3 expression and investigation. Similarly, previous studies
166 of Acloque and collaborators (2011) indicated no SOX3 mRNA expression in the MDA-MB-231
167 cell line. Hence, the absence of SOX3 expression in an aggressive breast cancer subtype may imply a
168 potential tumor suppressor role of SOX3 in breast cancer [12–14].
169 Moreover, after MDA-MB-231 cells transfection with a pEF1-SOX3+ expression vector, it was
170 observed an increase of apoptosis rate (56%) (Figure 2) and the upregulation of pro-apoptotic
171 *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, and *BAX* mRNA expression, in contrast with downregulation of
172 antiapoptotic *BCL2* mRNA expression (Figure 3 and Figure 5). These data reinforce the role of the
173 SOX3 transcription factor in regulating apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231.
174 By the first time is being reported SOX3 protein expression in human breast IDC paraffin-embedded
175 tissues samples. We investigated the immunoreactivity of SOX3 protein in 27 IDC cases. The
176 positive cases for Pro-caspase-3 were negative for SOX3. The weak staining pattern, with a

177 significant cytoplasmic localization (Figure 4A and 4B), and a low score (average of 25%), may be
 178 related to the cell's aggressiveness behavior, showing downregulation of SOX3 with resistance to
 179 apoptosis phenotype. However, it is necessary to increase the sample size (number of cases) in future
 180 studies for a better correlation.

181 Present results indicate the SOX3 involvement in apoptosis regulation *in vitro*, using human breast
 182 cancer cell line, and the importance of understanding its role in the apoptosis, and its direct or
 183 indirect action triggering apoptotic molecular pathways in human breast carcinoma (Figure 5).

185 CONCLUSION

186 SOX3 transcription factor protein induces apoptosis in the human breast cancer cell line. Further
 187 studies are necessary to understand its action in triggering apoptosis and may involve modeling and
 188 dynamics, using functional *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies.

190 MATERIAL AND METHODS

191 Human SOX3 cloning and amplification

192 Protein coding regions of the *SOX3* gene were subcloned into the expression vector pEF1/Myc-His
 193 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). *SOX3* sequence was amplified from human DNA (Thermo -
 194 MHS6278-202857278) by polymerase chain reaction (PCR) using the following right primer: 5'-
 195 AAAGAATTCTCCGATGTGGGTCAGCGGCA - 3', and left primer: 5'-

196 ATAGGATCCGGAATGCGACCTGTTCGAGAGA-3'; at 59.8°C for PCR annealing temperature;
 197 utilizing Phusion Hot-Start II enzyme (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) for amplification.

198 Restriction enzymes BamHI and EcoRI were used for cloning in pEF-1 vector frame A. The vector
 199 was recircularized with T4 ligase after that, and *SOX3* construct was sequence confirmed by BigDye
 200 Sanger sequencing on ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems).

202 **Cell culture and transfection**

1
 203 Human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) were cultured on 100
 3
 4
 204 mm plates (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) to approximately 80-90% confluence, in
 6
 205 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 0,1% Antibiotic-
 8
 9
 206 Antimycotic (Gibco-Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) HEPES and 10% fetal bovine serum
 11
 207 (Gibco- Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). Cells were incubated in a humidified atmosphere at
 13
 14
 208 37°C and 5% CO₂.
 16
 209 1.0 x 10⁵ cells were then seeded into 24 wells plates (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) and
 18
 210 incubated overnight. Before transfection, culture media was removed, and cells were washed once
 20
 21
 211 with sterile phosphate-buffered saline (PBS). Fresh DMEM was added, and cells were incubated for
 23
 24
 212 three hours. Each well was transiently transfected either with 500 ng pEF-1-SOX3 expression vector
 25
 26
 213 or pEF-1 empty vector, using Lipofectamine 3000 reagent according to the protocol provided by the
 28
 29
 214 manufacturer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). A negative control (with no transfection) was
 30
 31
 215 run in parallel. To estimate the percentage of MDA-MB-231 cells successfully transfected by
 33
 34
 216 following Lipofectamine 3000 reagent protocol, a reporter gene GFP in pGL-3 vector was used to
 35
 36
 217 optimize transfection conditions.
 38
 218 After four hours, complexes were removed, and a complete fresh medium was introduced to the
 40
 41
 219 wells. After 24 h, cells were processed for cell viability, flow cytometry, RNA isolation, and
 42
 43
 220 immunocytochemistry. All experimental runs were completed in triplicate, and at least three separate
 45
 46
 221 experiments were conducted.
 47
 48

222
 50
 223 **Immunofluorescence**

51
 224 MDA-MB-231 cells transfected with pEF-1-SOX3 vector and MCF-7 cells that constitutively
 53
 54
 225 express SOX3 protein were both cultured in 24 wells plates for immunofluorescence assay. After 24
 57
 58
 226 h incubation, the medium was removed, and cells were washed twice with PBS containing 0.9 mM
 60
 61
 62
 63
 64
 65

227 CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ (PBS+/+). Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at
228 room temperature onto coverslips, washed three times with PBS+/+, and then permeabilized for
229 three minutes with PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X.
230 Cells were incubated for 30 minutes with PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA) and then
231 washed three times to block endogenous peroxidase. Primary polyclonal goat anti-human SOX3
232 antibody (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was diluted to 5 µg/mL in PBS/BSA
233 2% and pipetted onto cells, which were placed in a humid chamber for three hours at room
234 temperature. Cells were then washed with PBS and incubated for one hour at room temperature with
235 donkey anti-goat Alexa Fluor 488 secondary fluorescent antibody (Invitrogen Life Technologies,
236 Carlsbad, CA, USA) diluted eight µg/mL in PBS/BSA 2%. All preparations were stained with DAPI
237 for nuclei visualization. Lastly, coverslips were mounted on microscope glass slides using hydro
238 mount (National Diagnostics, Georgia, USA) and examined under fluorescence microscopy. Images
239 were acquired and analyzed with Zen software (ZEISS).

241 **Cell viability assay**

242 Cell viability was monitored using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
243 (MTT) (Sigma, San Luis, Missouri, USA). The cells were seeded in a 96-well plate (Kasvi, São José
244 dos Pinhais, PR, Brazil) at a density of 8×10^3 for 24h. Twenty-four hours after transfection protocol,
245 the medium was discarded, and 100 µL MTT (2,5 mg/ mL) was added to each well and incubated at
246 37°C for 4 h. Subsequently, the precipitate dissolving in 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO).
247 Absorbance was measured at 570 nm under a microplate spectrophotometer. The data represented
248 the mean plus standard error of three trials conducted in triplicates, with pEF-1 SOX3 effector
249 construct, pEF-1 empty construct, and non-transfected cells as a negative control.

251 **Apoptosis assessment by flow cytometry**

252 The extent of apoptosis was classified as viable, early, and late apoptotic cells, as described in
1
253 previous studies [24,25] Briefly, negative control cells and cells transfected with pEF-1 SOX3 or
2
3
4
254 pEF-1 empty vector incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere were washed with PBS and
5
6
255 then resuspended in Annexin-V Binding Buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM, NaCl, 2.5
7
8
256 mM CaCl₂). Cells were then double-stained with Annexin-V FITC PI buffer and incubated at room
9
10
11 temperature for 15 min, protected from light. Following incubation, cells from all test groups were
12
13
257 introduced to the FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for
14
15
258 apoptosis rate assessment. Apoptotic cells were detected 24 h post-transfection and quantified using
16
17
259 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA).
18
19
260

261

262 **Flow cytometry data analysis**

263 Flow cytometry data files were analyzed using FlowJo 7.5.5 software (TreeStar Inc, CA, USA). Dot
264 plots were gated to select the cell population and filtered for the expression of annexin V and
265 propidium iodide (PI), using two different fluorochromes. Limits for the quadrant markers were set
266 based on negative populations and isotype controls. PI-positive cells were plotted in quadrant 1 (Q1),
267 PI-annexin V positive cells in quadrant 2 (Q2), and annexin V positive cells in quadrant 3 (Q3). The
268 live cell was shown in quadrant 4 (Q4). The sum of quadrant regions Q1, Q2, and Q3 represented the
269 total frequency of early and late apoptotic and dead cells, whereas Q3 indicated cells in the early
270 apoptotic stage. The data represented the mean plus standard error of three trials conducted in
271 triplicates, with pEF-1 SOX3 effector construct, pEF-1 empty construct, and non-transfected cells as
272 a negative control.

273

274 **RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR**

275 Total RNA was isolated from cells 24 h post-transfection using 1 mL of Trizol® reagent according
276 to the protocol provided by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). First-strand
277

278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365

277 complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of RNA treated with DNase I (Invitrogen,
 1
 278 Carlsbad, CA, USA), following the SuperScript III reverse transcriptase Kit (Invitrogen)
 3
 4
 279 manufacturer's protocol, using random hexamer primers.
 6

280 Duplicate samples were applied in 96 wells plates (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate
 8
 9
 281 with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at a final reaction volume of 10 µL
 11
 282 each, using Sybr® Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Real-
 13
 14
 283 time PCR thermal cycling conditions were as follows: [1] one cycle of 50°C/2 min; [2] one cycle at
 15
 16
 284 95°C/10 min; [3] 40 cycles of 95°C/15s, followed by melting curve from 60°C, for amplicon
 18
 19
 285 specificity analysis. The primers used in PCR and qPCR amplification for BAX, BCL-2, Caspase-3,
 20
 21
 286 Caspase-8, Caspase-9, SOX3, S26, and GAPDH, are listed in Table 1.
 23

287

25

26

288 **Real-time qPCR data analysis**

28

289 Data were accessed by comparative CT method ([CT target gene mean] – [CT endogenous control

30

31

290 mean]), as the endogenous control was used to normalize target gene expression and generate ΔCT.

32

33

291 The ΔΔCT (ΔCT sample - ΔCT of the calibrator) was calculated, and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula was applied

35

36

292 to obtain relative expression levels of each target gene, expressed as fold-change [26].

37

38

293

40

41

294 **Patients and tissue sample**

42

43

295 Paraffin-embedded tissues samples from 27 patients with breast invasive ductal carcinoma (IDC)

45

296 were obtained at the Pathologic Anatomy Department at the Federal University of Mato Grosso do

47

48

297 Sul (UFMS), Brazil. Informed consent was obtained from all the subjects before inclusion in the

50

298 study, which was approved by the local Human Investigation Committee (CAAE

52

53

299 20636419.2.0000.0021).

54

55

300

57

58

301 **Immunohistochemistry**

59

60

61

62

63

64

65

302 Sections from 27 tissue samples of human invasive ductal carcinoma (IDC) from paraffin-embedded
1
303 specimens were cut at 4- μ m, mounted on gelatinized slides, deparaffinized, and rehydrated through
3
4
304 graded concentrations of ethanol. Immunohistochemical staining was performed according to the
6
305 peroxidase reaction method, using a polymerized secondary antibody or an avidin-biotin-peroxidase
8
9
306 method for identification (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon
11
307 Tyne, UK or Kit ABC - Vector Laboratories, San Francisco Bay Area, CA, USA). For antigen
13
14
308 retrieval, sections were incubated for 20 min in Target Retrieval Solution Citrate pH 6.0 (Dako
15
16
309 Cytomation, Glostrup, Denmark) in a pressurized humid heat at 134 °C or 20 min in a water bath at
18
19
310 98 °C and cooled at room temperature. To block endogenous peroxidases, slides were incubated
20
21
311 three times for 5 min each in a 3% H₂O₂ solution in methyl alcohol. To block endogenous proteins,
23
312 slides were incubated for 15 min with Protein Block Solution (Protein Block Serum-Free Ready-to-
25
26
313 use; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA) or one hour with 8% dry milk diluted in
28
314 distilled water (Molico®, Nestle). The sections were counterstained with hematoxylin. Table 2 lists
30
31
315 the manufacturers, clones, dilutions, protein blocks, and secondary antibody information for
32
33
316 antibodies used. The primary antibody incubation step was omitted for the negative control and
35
36
317 replaced by incubation with the antibody diluent (Antibody Diluent with Background Reducing
37
38
318 Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). SOX3 and Pro-caspase-3
40
41
319 analysis was performed by identifying cytoplasmatic and nuclear staining. All analyses were
42
43
320 performed by light microscopy at 400X magnification. Images were captured using an Olympus
45
46
321 BX_40 camera (Olympus Company, Shinjuku, Tokyo, Japan) and Spot Basic imaging software for
47
48
322 microscopy (Spot Imaging, Diagnostic Instruments, Inc.). Images were analyzed using ImageJ
50
51
323 (SciJava), and positive cells were manually counted using the ImageJ cell counter plug-in. The
52
53
324 counting was performed by a single observer out of 500 cells scattered in the samples with the
54
55
325 assistance of a grid. After counting, the marking average was performed, and cases with several
56
57
326 marked cells above the average were considered positive.
58
59
60
61
62
63
64
65

327

1

328 Statistical analysis

3

4

329 Statistical data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

6

8

330 and were presented as mean \pm standard deviation. One-way ANOVA with Tukey's multiple

9

331

comparisons test was employed to evaluate the difference between individual groups. The criterion

11

332of statistical significance was $P < 0.05$.

13

14

333

15

16

334 DECLARATIONS

18

335**Ethics approval and consent to participate**

20

21

336 Informed consent was obtained from all the subjects before inclusion in the study, which was

23

337

approved by the local Human Investigation Committee (CAAE 20636419.2.0000.0021).

25

26

338**Consent for publication**

28

339

Not applicable

30

340**Availability of data and materials**

32

33

341

Not applicable

35

342**Competing interests**

36

343

The authors disclose no potential conflicts of interest.

40

344**Funding**

42

43

345

Research supported by Federal University of Minas Gerais (Edital PRPq

45

346

05/20160); This study was part of a PhD thesis by F.H.H.S. at the Pathology Post-

47

347

Graduation Program at Universidade Federal de Minas Gerais, PhD scholarship funded by CAPES.

49

348**Author contributions**

52

349

FHSS: Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. AU: Resources,

54

350

Supervision, Writing - review & editing. CPA: Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing

57

351

- review & editing. TSR: Data curation, Investigation, Writing - review & editing. EMSF: Resources,

59

60

61

62

63

64

65

352 Investigation. ASM: Resources, Investigation. LOA: Data curation, Resources, Methodology. LR:
 1
 353 Data curation, Methodology. HWG: Data curation, Methodology. CAO: Resources, Methodology.
 3
 4
 354 RCR: Patient's recruitment and sample curation. ITB: Data curation, Investigation, Writing - review
 6
 355 & editing. GDC: Resources, Investigation. EF: Data curation, Formal analysis, Resources,
 8
 9
 356 Supervision. HLDP: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project
 11
 357 administration, Resources, Supervision, Writing -review & editing.
 13

358 **Acknowledgements**

14
 15
 16
 359 We thank the patients and volunteers who contributed to this research. We thank Doctor Amy
 18
 19
 360 Milsted very much for reviewing the manuscript.
 20

21
 361

22
 23
 362

24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

363 **REFERENCES**

- 364
 365 1. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes.
 366 J Cancer. 2016;7:1281–94.
 367 2. El Hachem G, Gombos A, Awada A. Recent advances in understanding breast cancer and
 368 emerging therapies with a focus on luminal and triple-negative breast cancer. F1000Research.
 369 2019;8.
 370 3. Patten DK, Sharifi LK, Fazel M. New Approaches in the Management of Male Breast Cancer.
 371 Clin Breast Cancer [Internet]. 2013;13:309–14. Available from:
 372 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820913001079>
 373 4. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to
 374 pluripotency. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;17:183–93.
 375 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
 376 5. Gertz J, Reddy TE, Varley KE, Garabedian MJ, Myers RM. Genistein and bisphenol A exposure
 377 cause estrogen receptor 1 to bind thousands of sites in a cell type-specific manner. Genome Res.
 378 2012;22:2153–62.
 379 6. Sarkar A, Hochedlinger K. The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem
 380 and Progenitor Cell Fate. Cell Stem Cell [Internet]. 2013;12:15–30. Available from:
 381 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590912007126>
 382 7. Mehta GA, Khanna P, Gatz ML. Emerging Role of SOX Proteins in Breast Cancer Development
 383 and Maintenance. J Mammary Gland Biol Neoplasia. Journal of Mammary Gland Biology and
 384 Neoplasia; 2019;24:213–30.
 385 8. Li K, Wang R, Jiang Y, Zou Y, Guo W. Overexpression of Sox3 is Associated with Diminished
 386 Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Onco. 2013;20:459–66.
 387 9. Yan Q, Wang F, Miao Y, Wu X. Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an
 388 oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase. Tumor Biol [Internet].

- 389 Tumor Biology; 2016;37:12263–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5095-x>
 1
 2
 390 10. Guo Y, Yin J, Tang M, Yu X. Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the
 3
 4
 391 proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 2018;52:1277–84.
 6
 392 11. Cai QY, Liang GY, Zheng YF, Tan QY, Wang RW, Li K. Sox3 silencing inhibits metastasis and
 8
 9
 393 growth of esophageal squamous cell carcinoma cell via down-regulating GSK-3 β . *Int J Clin Exp*
 11
 394 *Pathol.* 2016;9:2939–49.
 13
 14
 395 12. Acloque H, Ocaña OH, Matheu A, Rizzoti K, Wise C, Lovell-Badge R, et al. Reciprocal
 15
 16
 396 repression between Sox3 and Snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation.
 18
 19
 397 *Dev Cell.* 2011;21:546–58.
 21
 22
 398 13. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of
 23
 24
 399 experience in research. *Anticancer Res.* 2015;35:3147–54.
 25
 26
 400 14. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*
 28
 29
 401 [Internet]. 2011;13:215. Available from: [https://breast-cancer-](https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889)
 30
 31
 402 [research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889](https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889)
 32
 33
 403 15. Feng Y, Xiao F, Yang N, Zhu N, Fu Y, Zhang H, et al. Overexpression of Sox3 is associated
 35
 36
 404 with promoted tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol.*
 37
 38
 405 2017;10:7873–81.
 40
 41
 406 16. Vicentic JM, Drakulic D, Garcia I, Vukovic V, Aldaz P. SOX3 can promote the malignant
 42
 43
 407 behavior of glioblastoma cells. *Cell Oncol. Cellular Oncology;* 2018;42:41–54.
 45
 46
 408 17. Song L, Liu D, He J, Wang X, Dai Z, Zhao Y, et al. SOX1 inhibits breast cancer cell growth and
 47
 48
 409 invasion through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Apmis.* 2016;124:547–55.
 50
 51
 410 18. Das T, Nair RR, Green R, Padhee S, Howell M, Banerjee J, et al. Actinomycin D down-regulates
 52
 53
 411 SOX2 expression and induces death in breast cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2017;37:1655–63.
 54
 55
 412 19. Liang S, Furuhashi M, Nakane R, Nakazawa S, Goudarzi H, Hamada J ichi, et al. Isolation and
 57
 58
 413 characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem Biophys Res*
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

- 414 Commun [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;437:205–11. Available from:
1
415 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.038>
2
3
4
416 20. Mehta GA, Parker JS, Silva GO, Hoadley KA, Perou CM, Gatz ML. Amplification of SOX4
5
6
417 promotes PI3K/Akt signaling in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet].
7
8
418 2017;162:439–50. Available from: <https://www2.tri->
9
10
419 [kobe.org/nccn/guideline/breast/english/breast.pdf](https://www2.tri-kobe.org/nccn/guideline/breast/english/breast.pdf)
11
12
13
420 21. Zhang J, Liang Q, Lei Y, Yao M, Li L, Gao X, et al. SOX4 induces epithelial-mesenchymal
14
15
16
421 transition and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.* 2012;72:4597–608.
17
18
422 22. Oliemuller E, Kogata N, Bland P, Kriplani D, Daley F, Haider S, et al. SOX11 promotes invasive
19
20
21
423 growth and ductal carcinoma in situ progression. *J Pathol.* 2017;243:193–207.
22
23
424 23. Oliemuller E, Newman R, Tsang SM, Foo S, Muirhead G, Noor F, et al. Sox11 promotes
24
25
26
425 epithelial/mesenchymal hybrid state and alters tropism of invasive breast cancer cells. *Elife.*
27
28
426 2020;9:1–29.
29
30
427 24. Coutinho LM, Vieira EL, Dela Cruz C, Casalechi M, Teixeira AL, Del Puerto HL, et al.
31
32
33
428 Apoptosis modulation by activin A and follistatin in human endometrial stromal cells. *Gynecol*
34
35
429 *Endocrinol.* 2016;32:161–5.
36
37
38
430 25. Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie RCAA, LaFace DM, et
39
40
41
431 al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis
42
43
432 regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of BCL-2 and Abl. *J Exp Med.*
44
45
433 1995;182:1545–56.
46
47
48
434 26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative
49
50
435 PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25:402–8.
51
52
53
436
54
55
437
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

438 **List of abbreviations**

- 1
2
3 439 • TFs - Transcription Factors
4
5 440 • IDC - Invasive Ductal Carcinoma
6
7 441 • HMG - High-mobility group
8
9 442 • EMT - Epithelial Mesenchymal Transition
10
11 443 • IHC - Immunohistochemistry
12
13 444 • DMEM - Dulbecco's Modified Eagle medium
14
15 445 • PBS - Phosphate Buffered Saline
16
17 446 • GFP - Green Fluorescent Protein
18
19 447 • BSA - Bovine Serum Albumin
20
21 448 • MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
22
23 449 • DMSO - Dimethyl sulfoxide
24
25 450 • PI - Propidium Iodide
26
27 451 • UFMS - Federal University of Mato Grosso do Sul
28
29
30
31
32
33

452

35

36

453

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

454 **Figure Legends:**

455
456 **Figure 1.** Transfection efficiency in human breast adenocarcinoma cells (MDA-MB-231) with pGL3-
457 GFP vector for 24 hours **(A)** Bright-field images were captured 24 hours post-transfection. **(B)**
458 Fluorescence images, positive for GFP. **(C)** and **(D)** Immunocytochemistry and immunofluorescence
459 assay to detect SOX3 protein in MCF-7 and MDA-MB-231 transfected with pEF1-SOX3 vector.
460 Nuclei stained in blue with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and SOX3-positive cells were
461 marked green. **(E)** Gel-based RT-PCR for SOX3 mRNA detection in cells transfected with pEF1-
462 SOX3, cells transfected with pEF1-empty vector, and control cells with no transfection, demonstrating
463 that SOX3 genes were readily delivered into MDA-MB-231 and transcribed. The gene encoding the
464 human ribosomal protein S26 was used as a reference gene. Three μ l of the amplification reaction were
465 applied and visualized by silver-stained 8% polyacrylamide gel after electrophoresis at 100V/50 min.
466 SOX3 specific amplicon of 126 bp is visualized only on cells transfected with pEF1-SOX3 (well 6),
467 and the S26 75 bp reference gene is shown for each sample (wells 2-5). Ladder: 50 bp DNA ladder
468 (0.3 μ g); 2 and 8: Control cells with no transfection; 3 and 6: MDA cells transfected with pEF1-SOX3;
469 4 and 7: MDA cells transfected with pEF1-empty vector; 5 and 9: NTC- No RT template control.

470
471 **Figure 2. Cell viability (MTT) and Apoptosis rate (Annexin V-Pi-FITC Flowcytometry):**
472 Apoptosis analysis after 24 hours of transfection with pEF1-SOX3+ vector in MDA-MB-231 cells.
473 **(A)** Q1 shows cells in a late stage of death (positive only for PI); Q2 shows cells in a late stage of
474 apoptosis (positive for PI and Annexin V-FITC); Q3 shows cells in an early stage of apoptosis (positive
475 only for Annexin V-FITC); Q4 shows viable cells. **(B)** The total average (early + late) apoptosis rate
476 of control cells was 10,0%. The total average (early + late) apoptosis rate of pEF1-SOX3+ transfected
477 cells was 56%, and the total (early + late) apoptosis rate of pEF1-empty vector-transfected cells was
478 11%. The results represented the average of three independent experiments (mean \pm standard error of

479 the mean). ***p<0.0001, as compared of pEF1-SOX3+ transfected cells to pEF1-empty vector and
 480 control cells non-transfected.

481
 482 **Figure 3. Quantitative PCR – Gene expression:** mRNA expression in MDA-MB-231 cells: with no
 483 transfection (control); transfected with pEF1-empty vector and transfected with pEF1-SOX3+. (A)
 484 SOX3 (B) Caspase-8, (C) Caspase-3, (D) Caspase-9, (E) Bax, and (F) Bcl-2. Real-time qPCR was
 485 expressed as DCt, which is the cycle threshold (Ct) of the target gene minus the reference gene,
 486 GAPDH. The relative gene expression was calculated as fold change using the formula 2^{-DCt} , where
 487 DCt of the transfected group minus the DCt of the control group. The real-time PCR results
 488 demonstrated higher mRNA expression of Caspase-3 (3.26 fold change), Caspase-8 (2.24 fold
 489 change), Caspase-9 (18.5 fold change), and BAX (4.11 fold change), and lower mRNA expression of
 490 Bcl-2 (0.40 fold change) compared to untransfected control and empty vector-transfected cells,
 491 respectively, p<0.005.

492
 493 **Figure 4. SOX3 and Pro-Caspase-3 immunohistochemistry in human invasive ductal carcinoma**
 494 **(IDC):** SOX3 expression in human invasive ductal carcinoma (IDC) samples revealed 52% positive
 495 cases for SOX3 expression (14 out of 27 cases). Therefore, in SOX3 positive cases, 72% (10/14) had
 496 cytoplasmic staining and 28% (4/14) nuclear immunolocalization. (A) Cytoplasmic immunostaining
 497 for SOX3. (B) Nuclear immunostaining for SOX3. (C) Cytoplasmic immunostaining for Pro-Caspase-
 498 3. (D) Cytoplasmic and nuclear immunostaining for Pro-Caspase-3. Scale bar = 50 μ m. Yellow arrows:
 499 nuclear immunostaining. Red arrowheads: cytoplasmic immunostaining.

500
 501 **Figure 5. MDA-MB-231 cells transfected with the pEF1-SOX3+ expression vector.** The
 502 upregulation of pro-apoptotic CASP3, CASP8, CASP9, and BAX mRNA expression, in contrast with

503 downregulation of antiapoptotic BCL2 mRNA expression, reinforce the role of the SOX3 transcription
1
2
3 504 factor in regulating apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231.
4

505

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

506 **Table 1** - Primer for PCR and real-time PCR

1
2
3
4
507
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Primers	Nucleotide sequence (nt)	Fragment size	GenBank Accession number
S26			
Forward	5'- TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG -3'	75	NM_001029.3
Reverse	5'- CGATTCTGACTACTTTGCTGTGAA -3'		
BAXHs			
Forward	5'- TCTACTTTGCCAGCAAAGCTGGTGC - 3'	80	NM_138765.3
Reverse	5'- TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT - 3'		
Bcl-2Hs			
Forward	5'- ATTCCTGCATCTCATGCCAAGGG -3'	90	NM_000657
Reverse	5'- TGTGCTTTGCATTCTTGGACGAGG -3'		
Casp9Hs			
Forward	5'- GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT -3'	129	NM_001229.5
Reverse	5'- CAACGTACCAGGAGCCACTCTT -3'		
GAPDH			
Forward	5'- TGGGTGTGAACCATGAGAAG -3'	125	NM_001289746.1
Reverse	5'- GAGTCCTTCCACGATACCAAAG -3'		
Casp3Hs			
Forward	5'- GTAGATGGTTTGAGCCTGAG -3'	106	NM_032991.2
Reverse	5'- CCAGTGCGTATGGAGAAATG -3'		
SOX3Hs			
Forward	5'- GTTGGGACGCCTTGTTTA -3'	126	NM_005634.2
Reverse	5'- TCGCTGCTCCTGACTTAT -3'		

516 **Table 2:** IHC protocol for Pro-Caspase-3 and SOX3 antibodies

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Antigen retrieval	Protein blocking	Secondary antibody
Pro-Caspase-3	Neomarkers	RB-1197-P	1:400	Citrate buffer + WB	8% dry milk powder	Novolink
SOX3	Invitrogen	Polyclonal	1:50	Citrate buffer + PH	Dako	Anti-Goat - IgG (Kit ABC)

517 WB – Water bath (98°C)

518 PH – Pressurized humid heat (134°C)

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Figure 1 - 300dpi.tif](#)

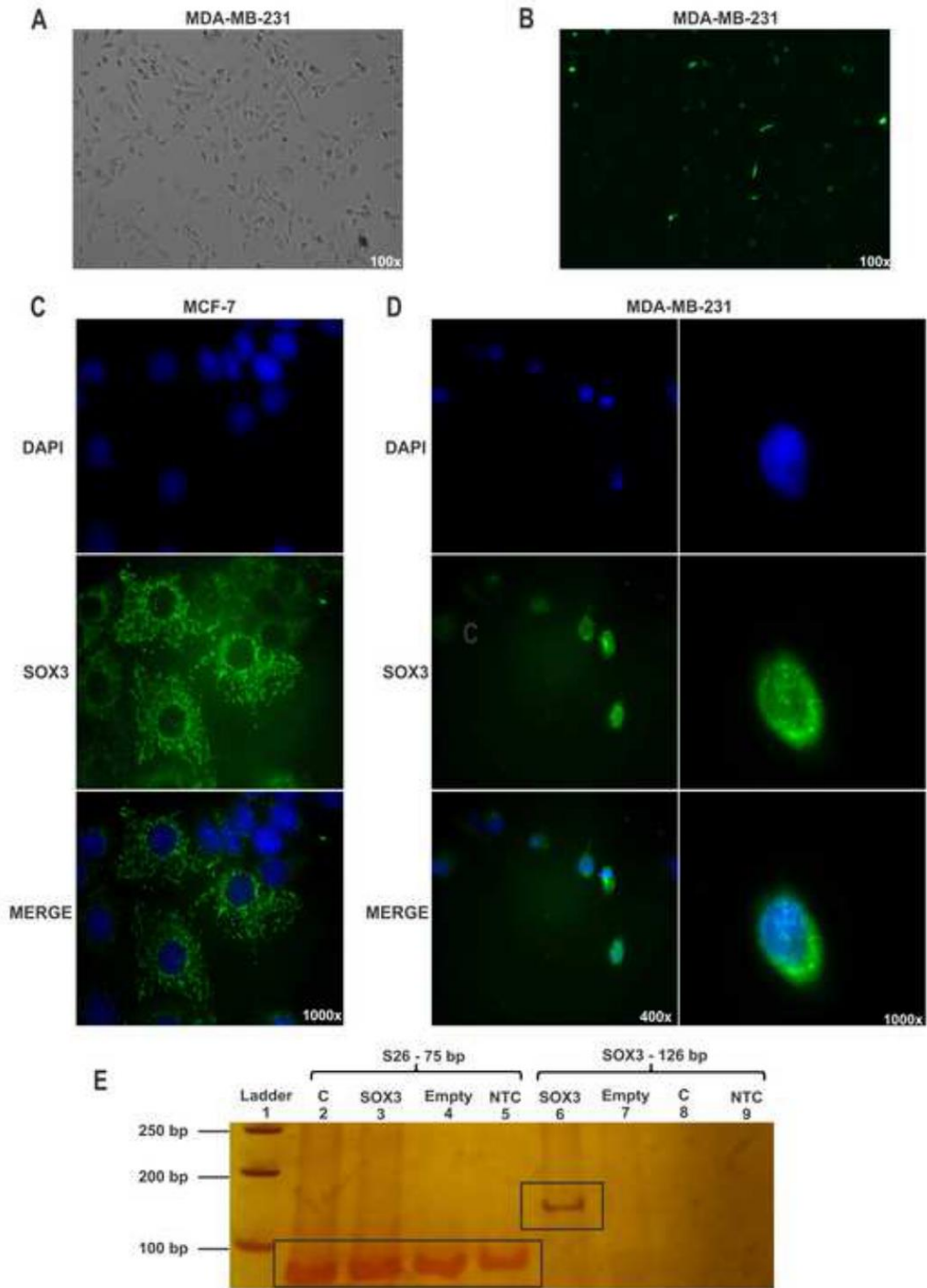


Figure 2

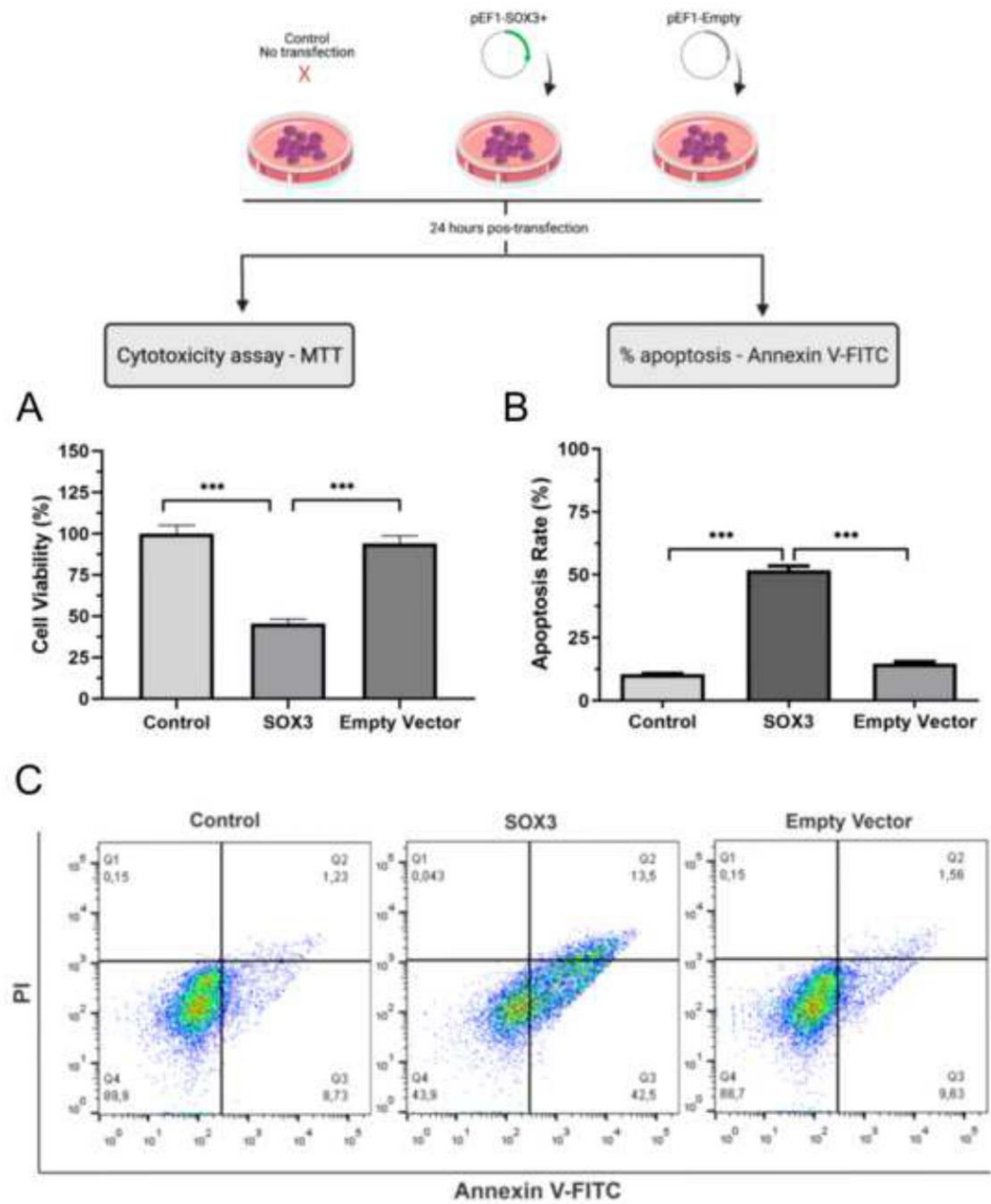
[Click here to access/download;Figure;Figure 2 - 300dpi.tiff](#)

Figure 3

[Click here to access/download;Figure;Figure 3 - 300dpi.tif](#)

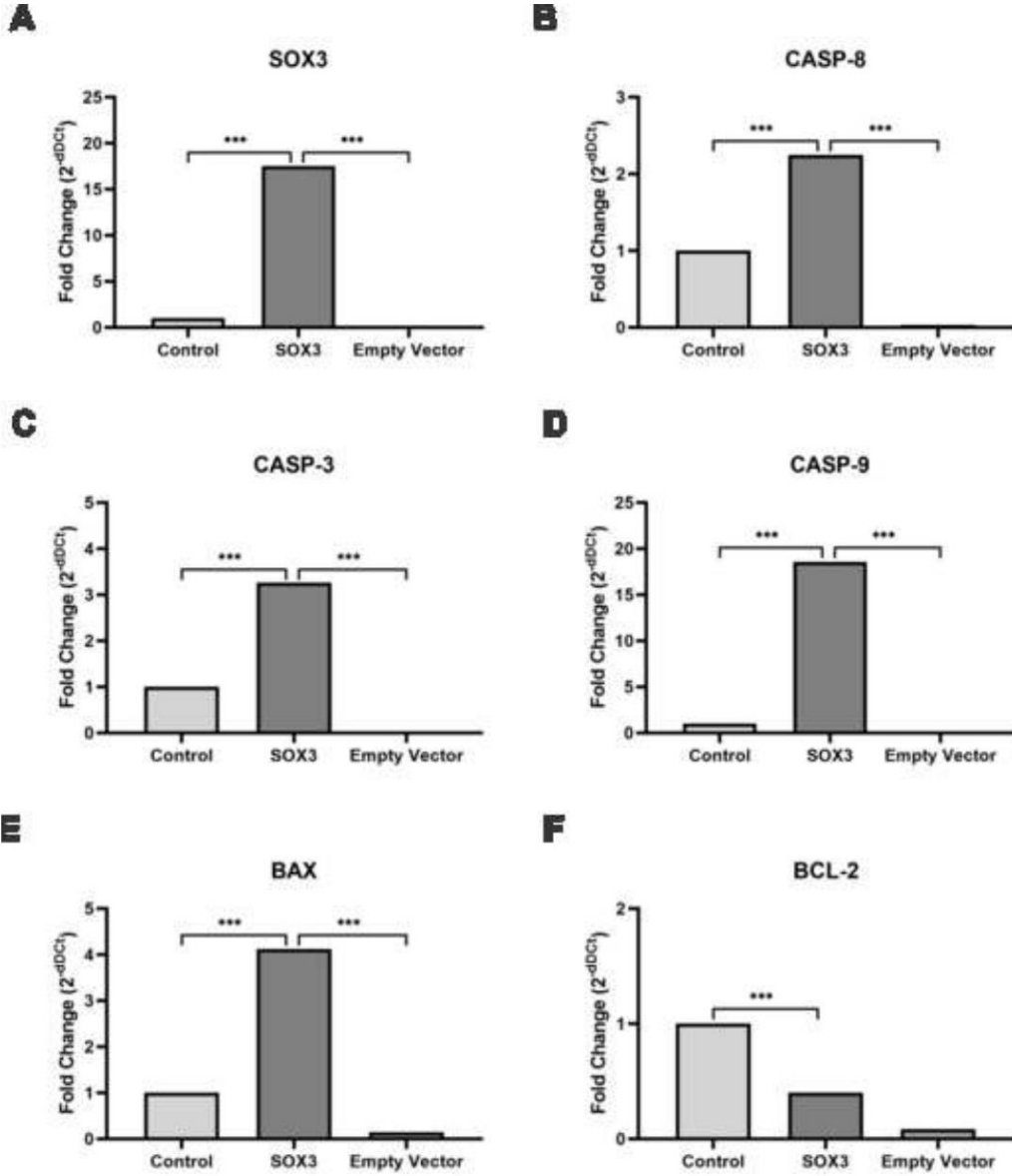


Figure 4

[Click here to access/download;Figure;Figure 4- 300dpi.tiff](#)

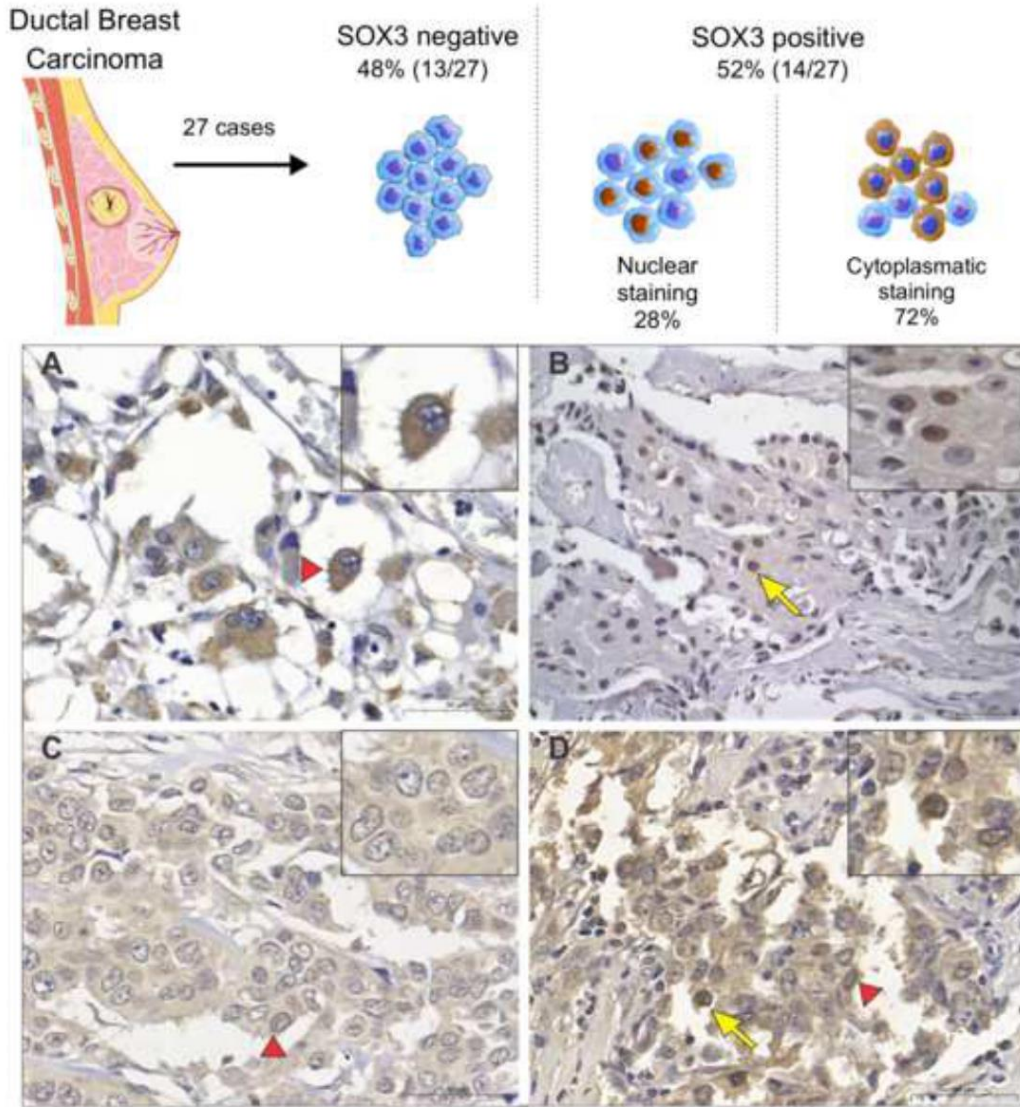


Figure 5

[Click here to access/download;Figure;Figure 5 - 300dpi.tif](#)

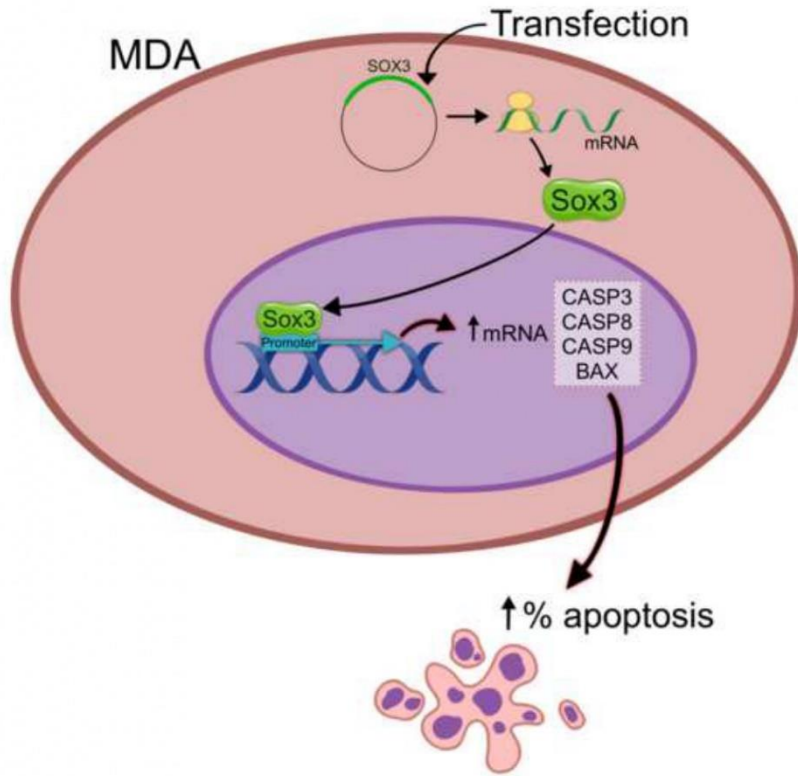


Table 1

[Click here to access/download;Table;Table 1.docx](#)1 **Table 1** - Primer for PCR and real-time PCR

			Fragment	GenBank Accession
	Primers	Nucleotide sequence (nt)	size	number
2				
3				
4	S26			
5	Forward	5'- TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG -3'	75	NM_001029.3
6	Reverse	5'- CGATTCTGACTACTTTGCTGTGAA -3'		
7	BAXHs			
	Forward	5'- TCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGC - 3'	80	NM_138765.3
	Reverse	5'- TGTCAGCCCATGATGGTTCTGAT - 3'		
	Bcl-2Hs			
	Forward	5'- ATTCCTGCATCTCATGCCAAGGG -3'	90	NM_000657
	Reverse	5'- TGTGCTTTGCATTCTTGACGAGG -3'		
	Casp9Hs			
	Forward	5'- GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT -3'	129	NM_001229.5
	Reverse	5'- CAACGTACCAGGAGCCACTCTT -3'		
	GAPDH			
	Forward	5'- TGGGTGTGAACCATGAGAAG -3'	125	NM_001289746.1
	Reverse	5'- GAGTCCTCCACGATACCAAAG -3'		
	Casp3Hs			
	Forward	5'- GTAGATGGTTTGAGCCTGAG -3'	106	NM_032991.2
	Reverse	5'- CCAGTGCGTATGGAGAAATG -3'		
	SOX3Hs			
	Forward	5'- GTTGGGACGCCTTGTTA -3'	126	NM_005634.2
	Reverse	5'- TCGCTGCTCCTGACTTAT -3'		

8

9

10

11

Table 2

[Click here to access/download;Table;Table 2.docx](#)**Table 2:** IHC protocol for Pro-Caspase-3 and SOX3 antibodies

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Antigen retrieval	Protein blocking	Secondary antibody
Pro-Caspase-3	Neomarkers	RB-1197-P	1:400	Citrate buffer + WB	8% dry milk powder	Novolink Anti-Goat - IgG (Kit
SOX3	Invitrogen	Polyclonal	1:50	Citrate buffer + PH	Dako	ABC)

WB – Water bath (98°C)

PH – Pressurized humid heat (134°C)

ANEXO II

Cell Biology International



Transcription factor SOX3 regulates epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cell line MDA-MB-231

Journal:	<i>Cell Biology International</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Felipe; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, Department of General Pathology Underwood, Adam; Walsh University, Division of Mathematics and Sciences Almeida, Camila; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil., Department of General Pathology Borges, Isabella; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, Department of General Pathology Veloso, Emerson; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil., Department of General Pathology Cassali, Geovanni ; Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Patologia Ferreira, Enio; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil., Department of General Pathology Del Puerto, Helen; Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Patologia
Key words:	Cancer, Cell differentiation
Key phrase/interests:	epithelial-mesenchymal transition, Transcription factor, Breast cancer
Abstract:	Transcription factors proteins play essential roles in regulating cellular events in breast cancer that mediate or contribute to tumorigenesis. Embryonic transcription factors, such as SOX proteins, are key players regulating the balance between Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the reverse mesenchymal-epithelial transition (MET), both involved in breast cancer plasticity. In breast cancer, SOX proteins function both as oncogenes and tumor suppressors, depending on each SOX protein involved and in which tissue and cell line its acting. We investigated SOX3 protein regulation of EMT-MET phenotype in the MDA-MB-231 cell line. Breast cancer cell line MDA-MD-231 transfected with pEF1-SOX3+ and pEF1-Empty vector followed by qPCR for EMT-related gene expression. MDA-MB-231 transfected with pEF1-SOX3+ presented upregulation of mRNA from ECAD gene, contrasting with downregulation mRNA from NCAD, SNAIL, ZEB1 and ZEB2, compared to non-transfected cells and cells transfected with pEF1-empty vector (p<0.005). SOX3 appears essential for maintaining an epithelial cells phenotype in breast cancer and allowing cells that underwent EMT to transiently re-acquire the epithelial phenotype. This present study revealed that transcription

	factors regulates EMT-MET in cancer cell phenotype may serve as important targets for breast cancers therapy and markers. Hence, additional studies are needed to understand SOX3 protein involvement the EMT-MET phenomenon.

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Title:** Transcription factor SOX3 regulates epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer
2 cell line MDA-MB-231

3

4 **Authors:** Felipe Henrique de Souza Silva¹, Adam Underwood², Camila Pereira Almeida¹, Isabella
5 Terra Borges¹, Emerson Soares Veloso¹, Geovanni Dantas Cassali¹, Enio Ferreira¹, Helen Lima Del
6 Puerto¹.

7

8 **Affiliations:**

9 ¹ Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

10 ² Division of Mathematics and Sciences, Walsh University, North Canton, Ohio, USA

11

12 **Short running head:** SOX3 regulates EMT-MET

13

14

15 Correspondence to: Helen Lima Del Puerto, PhD.

16 Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais -

17 Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 - Campus UFMG, Belo Horizonte - MG, 31270-901- Belo

18 Horizonte, MG, Brazil

19 Tel. 55-31-3409-2878 / Fax 55-31-3409-2879

20 e-mail: helendelpuerto@ufmg.br

21

22

23

24

25

26

27

28 **List of abbreviations**

29 DMEM - Dulbecco's Modified Eagle medium

30 DMSO - Dimethyl sulfoxide

31 EMT - Epithelial Mesenchymal Transition

32 GFP - Green Fluorescent Protein

33 HMG - High-mobility group

34 MET - Mesenchymal-epithelial transition

35 MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

36 PBS - Phosphate Buffered Saline

37

38 **ABSTRACT**

39 Transcription factors proteins play essential roles in regulating cellular events in breast cancer that
40 mediate or contribute to tumorigenesis. Embryonic transcription factors, such as SOX proteins, are
41 key players regulating the balance between Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the reverse
42 mesenchymal-epithelial transition (MET), both involved in breast cancer plasticity. In breast cancer,
43 SOX proteins function both as oncogenes and tumor suppressors, depending on each SOX protein
44 involved and in which tissue and cell line its acting. We investigated SOX3 protein regulation of EMT-
45 MET phenotype in the MDA-MB-231 cell line. Breast cancer cell line MDA-MD-231 transfected with
46 pEF1-SOX3+ and pEF1-Empty vector followed by qPCR for EMT-related gene expression. MDA-
47 MB-231 transfected with pEF1-SOX3+ presented upregulation of mRNA from ECAD gene,
48 contrasting with downregulation mRNA from NCAD, SNAIL, ZEB1 and ZEB2, compared to non-
49 transfected cells and cells transfected with pEF1-empty vector ($p < 0.005$). SOX3 appears essential for
50 maintaining an epithelial cells phenotype in breast cancer and allowing cells that underwent EMT to

51 transiently re-acquire the epithelial phenotype. This present study revealed that transcription factors
52 regulates EMT-MET in cancer cell phenotype may serve as important targets for breast cancers therapy
53 and markers. Hence, additional studies are needed to understand SOX3 protein involvement the EMT-
54 MET phenomenon.

55 **Keywords:** SOX3, Breast Cancer, EMT, MET, MDA-MB-231

56

57 **1. Introduction**

58 Cells have plasticity, related to the ability to adapt physiologically. These changes that occur at the
59 cellular level can be irreversible or reversible. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) has become
60 an important factor in tumor development and its biological characteristics, where epithelial cells
61 become mesenchymal cells acquiring a more resistant profile (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).

62 The quest to understand the mechanisms involved in EMT led to the understanding that different
63 signaling factors are responsible for triggering the stimulation of this event, being the expression of
64 transcription factors, microRNAs, genetic and epigenetic regulators. All these factors promote
65 significant genotypic and phenotypic changes, at the cellular level, favoring processes of loss of
66 adhesion, migration, invasion, and resistance to death by apoptosis (Feroni, Brogginì, Generali, &
67 Damia, 2012; Karamanou, Franchi, Vynios, & Brézillon, 2020). As epithelial cells pass through the
68 EMT process, some markers such as E-Cadherin, desmoplakin, and cytokeratin are downregulated.

69 In contrast, mesenchymal cell markers such as N-Cadherin, fibronectin, and vimentin are
70 upregulated (Diepenbruck & Christofori, 2016).

71 In some situations, the EMT is reversible, the mesenchymal-epithelial transition (MET) is observed.
72 This mechanism is a way for the metastatic sites to assume the epithelial profile again. The cells that
73 underwent the transition are reprogrammed, favoring the development of metastasis and survival of
74 these cells that have migrated (Lima, Nofech-Mozes, Bayani, & Bartlett, 2016).

75 In breast cancer, EMT is an essential mechanism in acquiring invasive and metastatic capacity, with
76 cells acquiring the ability to move freely, surpassing the surrounding extracellular matrix, invading
77 adjacent tissues, and establishing secondary sites (Lima et al., 2016). Understanding the role and
78 importance of EMT in breast cancer has been the focus of study by many research groups. We have
79 transcription factors among the numerous mediators that induce and favor EMT. It is already
80 described in the literature that different transcription factors have as their primary focus the
81 repression of CDH1 (E-cadherin) expression. As leading examples, the zinc-finger proteins (SNAI1),
82 Zeb1(ZEB1) and Zeb2 (ZEB2) stand out, both acting directly in the repression of CDH1 expression,
83 binding to promoter regions (Drasin, Robin, & Ford, 2011; Hajra, Chen, & Fearon, 2002; Liang,
84 Song, Xu, Li, & Liu, 2018).

85 Transcription factor SOX (SOX) family proteins contain a highly conserved high-mobility group
86 (HMG) domain that regulates their DNA binding capacity. Proteins of the SOX family act as
87 regulators of important genes, and the action may be repression or activation of expression (Dong,
88 Wilhelm, & Koopman, 2004; Grimm et al., 2020).

89 The SOX family has some members involved in the EMT induction process. Within this family, the
90 Sex-determining region Y-box 3 (SOX3) represents an important member, a key factor in pituitary
91 and testicular development. Studies show that SOX3 favors invasion and proliferation in some
92 tumors, such as osteosarcomas and ovarian cancer, and its expression is related to an oncogene (Guo,
93 Yin, Tang, & Yu, 2018; Li, Wang, Jiang, Zou, & Guo, 2013; Yan, Wang, Miao, & Wu, 2016). It is
94 already described in the literature that SOX4 promotes the epithelial-mesenchymal transition, both in
95 normal cells and in breast epithelial tumor cells, being observed in vivo the induction of growth and
96 metastasis formation (Parvani & Schiemann, 2013; Tiwari et al., 2013). On the other hand, SOX3
97 overexpression was determined as a promoter of EMT in osteosarcoma tissues, favoring all cellular
98 signs of resistance, such as migration and invasion (Qiu et al., 2017). However, the expression of
99 SOX3 in breast cancer and its relationship with EMT is not yet described in the literature. They are

100 making it important to deepen the studies in this relationship, being able to elucidate the mechanisms
101 involved and their importance in the development of breast cancer.
102 This present study investigated the effects of SOX3 expression in triple-negative breast cancer
103 MDA-MB-231 cell line through transient transfection of the pEF-1-human SOX3 expression vector
104 to determine SOX3 involvement in EMT process.

105

106 **2. MATERIAL AND METHODS**

107

108 **2.1 Human SOX3 cloning and amplification**

109 Protein coding regions of the *SOX3* gene were subcloned into the expression vector pEF1/Myc-His
110 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). *SOX3* sequence was amplified from human DNA (Thermo -
111 MHS6278-202857278) by polymerase chain reaction (PCR) using the following right primer: 5'-
112 AAAGAATTCTCCGATGTGGGTCAGCGGCA - 3', and left primer: 5'-
113 ATAGGATCCGGAATGCGACCTGTTTCGAGAGA-3'; at 59.8°C for PCR annealing temperature;
114 utilizing Phusion Hot-Start II enzyme (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) for amplification.
115 Restriction enzymes BamHI and EcoRI were used for cloning in pEF-1 vector frame A. The vector
116 was recircularized with T4 ligase after that, and *SOX3* construct was sequence confirmed by BigDye
117 Sanger sequencing on ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems).

118

119 **2.2 Cell culture and transfection**

120 Human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) were cultured in
121 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 0,1% Antibiotic-
122 Antimycotic (Gibco-Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) HEPES and 10% fetal bovine serum
123 (Gibco- Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). 1.0×10^5 cells were then seeded into six well plates
124 (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) and incubated in a humidified atmosphere at 37°C and 5%.

125 In experiments, cells were in the logarithmic growth phase with 70-80% confluence. Before
126 initiating transfection, the culture medium was removed, and the wells were washed with sterile
127 phosphate-buffered saline (PBS). DMEM supplemented with BSF, and fresh antibiotic was added,
128 and the cells were incubated for three hours. Each well was transfected with 500 ng of pEF-1-SOX3
129 expression vector or pEF-1 empty vector, using Lipofectamine 3000 reagent according to the
130 protocol provided by the manufacturer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). In parallel, a negative
131 control (no transfection) was performed. To estimate the percentage of MDA-MB-231 cells
132 successfully transfected following the Lipofectamine 3000 reagent protocol, a GFP reporter gene in
133 the pGL-3 vector was used to optimize the transfection conditions.

134 The complexes were removed after four hours of incubation, and DMEM supplemented with 5%
135 BSF and 1% antibiotic was added to the wells. After 24 h, cells were processed for cell viability
136 protocol and RNA isolation. All experimental runs were completed in triplicate and at least three
137 separate experiments were performed.

138

139 **2.3 Cell viability assay**

140 Cell viability was monitored using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)
141 bromide (Sigma, San Luis, Missouri, USA). Cells were seeded in a 96-well plate (Kasvi, São José
142 dos Pinhais, PR, Brazil) at a density of 8×10^3 for 24h, enough time to reach 70-80% confluence. The
143 cells went through the transfection protocol, and after 24 hours, the medium was aspirated, and 100
144 μL of MTT (2.5 mg/mL) was added to each well and incubated at 37°C for 4 h protected from light.
145 Subsequently, the solution containing the MTT was aspirated and the precipitate dissolved in 100 μL
146 of dimethylsulfoxide (DMSO). Absorbance was measured at 570 nm under a microplate
147 spectrophotometer. Data represented the mean plus standard error of three assays performed in
148 triplicate, with effector construct pEF-1 SOX3, empty construct pEF-1, and untransfected cells as a
149 negative control.

150

151 2.4 RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR

152 After 24h of the transfection protocol, total RNA was isolated using 1 mL of Trizol® reagent
153 according to the protocol provided by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
154 Complementary first-strand DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of RNA treated with DNase I
155 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the protocol of the manufacturer of the SuperScript III
156 reverse transcriptase kit (Invitrogen), using primers random hexamers. Samples were pipetted into
157 96-well plates with duplicates for each condition (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate
158 with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in a final reaction volume of 20
159 µL each, using Sybr® Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
160 The real-time PCR thermal cycling conditions were as follows: [1] a 50°C/2 min cycle; [2] one cycle
161 at 95°C/10 min; [3] 40 cycles of 95°C/15s, followed by melting curve from 57°C, for analysis of
162 amplicon specificity. The primers used in PCR and qPCR amplification for ECAD, NCAD, SNAIL,
163 ZEB1, ZEB2, SOX3 and GAPDH are listed in Table 1.

164

165 2.5 Real-time qPCR data analysis

166 Data were accessed by comparative CT method ($[CT_{\text{target gene mean}}] - [CT_{\text{endogenous control mean}}]$), as the endogenous control was used to normalize target gene expression and generate ΔCT .
167
168 The $\Delta\Delta CT$ ($\Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{of the calibrator}}$) was calculated, and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula was applied
169 to obtain relative expression levels of each target gene, expressed as fold-change (Livak &
170 Schmittgen, 2001).

171

172 2.6 Statistical analysis

173 Statistical data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
174 and were presented as mean \pm standard deviation. One-way ANOVA with Tukey's multiple

175 comparisons test was employed to evaluate the difference between individual groups. The criterion
176 of statistical significance was $P < 0.05$.

177

178 **3. RESULTS**

179

180 **3.1 Transfection and expression of pEF1-SOX3+ and its function with cell viability**

181 After the transfection pEF1-SOX3+ in MDA-MB-231 cells, SOX3 gene and protein expression was
182 observed, showing the effectiveness of the protocol. Important morphological alterations were
183 observed in the transfected group, such as a reduction in the number of cells, cell rounding and
184 alterations in the cell membrane (blebs), indicative of cell death (Figure 1A). Regarding cell viability
185 was indicated by cytotoxicity assay (MTT). In the group transfected with pEF1-SOX3+, a significant
186 increase in the decrease of viable cells was observed. In the group transfected with pEF1-Empty
187 vector, an increase in cytotoxicity was not observed, maintaining cell viability compatible with the
188 control group (Figure 1B). This result indicates that the transfection protocol does not reduce cell
189 viability and, therefore, is not cytotoxic, and the viability reduction is related to the expression of
190 SOX3.

191

192 **3.2 Expression of EMT genes in MDA-MD-231 cells expressing SOX3**

193 MDA-MB-231 cells transfected with pEF1-SOX3+ demonstrated upregulation of mRNA from
194 ECAD (27.01 fold change) gene; contrasting with downregulation of mRNA from NCAD (0.06 fold
195 change), SNAIL (0.18 fold change), ZEB1 (0.15 fold change), and ZEB2 (0.11 fold change),
196 comparing to cells transfected with pEF1-empty vector ($p < 0.005$). Quantitative real-time PCR
197 showed SOX3 mRNA expression (17.51 fold change) in pEF1-SOX3+ transfected cells, in
198 comparison with cells transfected with pEF1-empty vector ($p < 0.005$) (Figure 2).

199

200 4. **DISCUSSION**

201 Several studies have shown that SOX3 is upregulated in different tumors, acting on tumor
202 progression, inducing proliferation, invasion, and metastasis, leading to a worse prognosis. Although
203 this oncogenic role is well defined in osteosarcomas, ovarian cancer, hepatocellular carcinoma and
204 esophageal squamous cell carcinoma, the role of SOX3 in breast cancer is poorly explored (Guo et
205 al., 2018; Li et al., 2013; Marjanovic Vicentic et al., 2019; Yan et al., 2016).

206 MDA-MB-231 is a breast cancer cell line derived from a triple negative subtype, which confers a
207 poor prognosis. Because it does not express SOX3, this breast cancer cell line, it became an ideal
208 model for the study (Acloque et al., 2011a). After the vector transfection protocol, SOX3 gene and
209 protein expression was found, and this expression reduced cell viability and modulated the
210 expression of important EMT-related genes.

211 The results of the present study revealed that inducing SOX3 protein expression in the triple-
212 negative breast cancer MDA-MB-231 cell line, is followed by a reduction in NCAD expression, an
213 important mesenchymal marker, which favors EMT (Figure 3). Other transcription factors that are
214 important in EMT induction also had their expression rates reduced, including SNAIL, ZEB1 and
215 ZEB2. High levels of SOX3 have been previously described as an important factor in inhibiting
216 EMT, acting together with the low expression of SNAIL in the breast cancer cell line, MCF-7
217 (Acloque et al., 2011b). These results corroborate those found in this work, and the tumor cell
218 lineage MDA-MB-231, expressing SOX3 protein had altered the expression rates of transcription
219 factors related to the induction of EMT and, upregulating ECAD mRNA expression, a key factor in
220 blocking EMT (Figure 3). Present results indicate SOX3 regulation EMT *in vitro*, and this regulation
221 is related to a possible behavior of SOX3 as a transcriptional repressor of important genes related to
222 EMT induction, and further studies are important for understanding its role in this mechanism.

223

224

225

226 **5. CONCLUSION**

227 The expression of SOX3 in the triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell line, was shown to
228 be favorable in maintaining the epithelial behavior of the cells and may also act in the
229 reestablishment of the cells that passed through the EMT, reacquiring the epithelial behavior. The
230 results indicate that the expression of SOX3 in the breast model increased the expression of ECAD
231 and reduced the expression of genes related to EMT induction, such as NCAD, ZEB1, ZEB2 and
232 SNAIL. This EMT-MET modulation behavior, caused by the expression of SOX3 in breast cancer
233 cells, may demonstrate a new path for the development of new therapeutic and diagnostic modalities.

234

235 **ADDITIONAL INFORMATION**

236

237 **Acknowledgements:**

238

239 **Authors' contributions:** FHSS: Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing - original
240 draft. AU: Resources, Supervision, Writing - review & editing. CPA: Data curation, Formal analysis,
241 Investigation, Writing - review & editing. ITB: Data curation, Investigation, GDC: Resources,
242 Investigation. EF: Data curation, Formal analysis, Resources, Supervision. HLDP:
243 Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration,
244 Resources, Supervision, Writing -review & editing.

245

246 **Funding information:** Research supported by Federal University of Minas Gerais (Edital PRPq
247 05/20160); This study was part of a PhD thesis by F.H.H.S. at the Pathology Post-
248 Graduation Program at Universidade Federal de Minas Gerais, PhD scholarship funded by CAPES.

249

251 **REFERENCES**

252

- 253 Acloque, H., Ocaña, O. H., Matheu, A., Rizzoti, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., & Nieto, M. A.
254 (2011b). Reciprocal repression between Sox3 and Snail transcription factors defines embryonic
255 territories at gastrulation. *Developmental Cell*, *21*(3), 546–558.
256 <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.005>
- 257 Diepenbruck, M., & Christofori, G. (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and
258 metastasis: Yes, no, maybe? *Current Opinion in Cell Biology*, *43*, 7–13.
259 <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>
- 260 Dong, C., Wilhelm, D., & Koopman, P. (2004). *Sox genes and cancer*. *447*, 442–447.
261 <https://doi.org/10.1159/000078217>
- 262 Drasin, D. J., Robin, T. P., & Ford, H. L. (2011). Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition:
263 Examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Research*, *13*(6).
264 <https://doi.org/10.1186/bcr3037>
- 265 Foroni, C., Brogini, M., Generali, D., & Damia, G. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and
266 breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treatment Reviews*,
267 *38*(6), 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.001>
- 268 Grimm, D., Bauer, J., Wise, P., Krüger, M., Simonsen, U., Wehland, M., ... Corydon, T. J. (2020).
269 The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*,
270 *67*(March 2019), 122–153. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.03.004>
- 271 Guo, Y., Yin, J., Tang, M., & Yu, X. (2018). Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the
272 proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*,
273 *52*(4), 1277–1284. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4278>
- 274 Hajra, K. M., Chen, D. Y. S., & Fearon, E. R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-
275 cadherin in breast cancer. *Cancer Research*, *62*(6), 1613–1618.
- 276 Karamanou, K., Franchi, M., Vynios, D., & Brézillon, S. (2020). Epithelial-to-mesenchymal
277 transition and invadopodia markers in breast cancer: Lumican a key regulator. *Seminars in*
278 *Cancer Biology*, *62*(May), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.003>
- 279 Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Fakultas Psikologi Dan Sosial Budaya Universitas
280 Islam Indonesia Yogyakarta. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196.
281 <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.Molecular
- 282 Li, K., Wang, R., Jiang, Y., Zou, Y., & Guo, W. (2013). Overexpression of Sox3 is Associated with
283 Diminished Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Onco*, *20*, 459–466.
284 <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2792-6>

- 285 Liang, W., Song, S., Xu, Y., Li, H., & Liu, H. (2018). Knockdown of ZEB1 suppressed the
286 formation of easculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition in the human breast
287 cancer cell line MDA-MB-231. *Molecular Medicine Reports*, *17*(5), 6711–6716.
288 <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8677>
- 289 Lima, J. F., Nofech-Mozes, S., Bayani, J., & Bartlett, J. M. S. (2016). EMT in breast carcinoma—A
290 review. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jcm5070065>
- 291 Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time
292 quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408.
293 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- 294 Marjanovic Vicentic, J., Drakulic, D., Garcia, I., Vukovic, V., Aldaz, P., Puskas, N., ... Stevanovic,
295 M. (2019). SOX3 can promote the malignant behavior of glioblastoma cells. *Cellular Oncology*,
296 *42*(1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0405-5>
- 297 Parvani, J. G., & Schiemann, W. P. (2013). Sox4, EMT programs, and the metastatic progression of
298 breast cancers: Mastering the masters of EMT. *Breast Cancer Research*, *15*(4), 14–16.
299 <https://doi.org/10.1186/bcr3466>
- 300 Qiu, M., Chen, D., Shen, C., Shen, J., Zhao, H., & He, Y. (2017). Sex-determining region Y-box
301 protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional
302 activation of Snail1. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *36*(46), 1–11.
303 <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0515-3>
- 304 Tiwari, N., Tiwari, V. K., Waldmeier, L., Balwierz, P. J., Arnold, P., Pachkov, M., ... Christofori, G.
305 (2013). Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2
306 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell*, *23*(6), 768–783.
307 <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.020>
- 308 Yan, Q., Wang, F., Miao, Y., & Wu, X. (2016). Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions
309 as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase. *Tumor Biology*,
310 *37*(650), 12263–12271. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5095-x>
- 311
- 312

314 **Figure Legends:**

315

316 **Figure 1. pEF1-SOX3+ on cell morphology and viability:** (A) Morphological changes induced by
317 pEF1-SOX3+. Photomicrographs from phase-contrast microscopy of the MDA-MB-231 tumor cells.
318 After 24 hours of transfection protocol, cells showed cell volume reduction, cell rounding,
319 irregularities in the plasma membrane and formation of blebs and vacuoles (white arrows). Images
320 were acquired by the digital camera Nikon Coolpix 4500, coupled to the MO (100x and 200X
321 amplification). (B) Cytotoxic effect of pEF1-SOX3+ on MDA-MB-231 tumor cells. Cell survival was
322 measured by MTT. Results are presented as cell survival compared with the control group (untreated
323 cells), $p < 0.005$.

324

325

326 **Figure 2. Quantitative PCR – Gene expression:** mRNA expression in MDA-MB-231 cells: with no
327 transfection (control); transfected with pEF1-empty vector and transfected with pEF1-SOX3+. (A)
328 SOX3 (B) ECAD, (C) NCAD, (D) SNAIL, (E) ZEB1, and (F) ZEB2. Real-time qPCR was expressed
329 as DCt, which is the cycle threshold (Ct) of the target gene minus the reference gene, GAPDH. The
330 relative gene expression was calculated as fold change using the formula 2^{-DCt} , where DCt of the
331 transfected group minus the DCt of the control group. The real-time PCR results demonstrated higher
332 mRNA expression of ECAD (27.01 fold change), and lower mRNA expression of NCAD (0.06 fold
333 change), SNAIL (0.18 fold change), ZEB1 (0.15 fold change), and ZEB2 (0.11 fold change), compared
334 to untransfected control and empty vector-transfected cells, respectively, $p < 0.005$.

335

336 **Figure 3. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition phenotype in MDA-**
337 **MB-231 cells transfected with pEF-1/MycHis/SOX3+.** SOX3 protein expression in the triple-
338 negative breast cancer MDA-MB-231 cell line, is followed by a downregulation in NCAD expression,

339 an important mesenchymal phenotype marker, and an upregulation of ECAD expression an important
 340 epithelial phenotype marker.

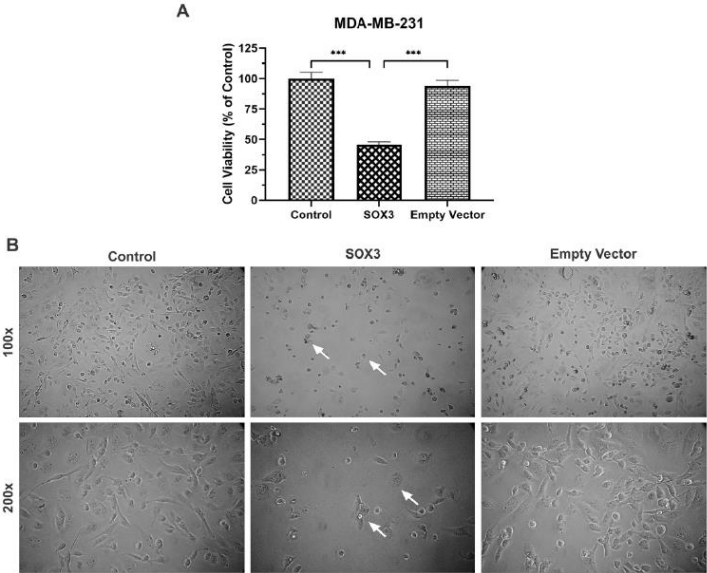
341

342 **Table 1** - Primer for PCR and real-time PCR

		Fragment	GenBank Accession
	Primers	size	number
343	ECAD		
	Forward	5'- CCCTTCACAGCAGAATAAC - 3'	108
345	Reverse	5'- CACCTCTAAGGCCATCTTIG - 3'	NM_001317185.1
346	NCAD		
	Forward	5'- GGACCGAGAATCACCAAATG - 3'	94
347	Reverse	5'- CGTTCCTGTCCACTCATAG - 3'	NM_001308176.1
348	ZEB1		
	Forward	5'- GGGAGGATGACAGAAAGGAA - 3'	100
	Reverse	5'- GCATCTGACTCGCATTTCATC - 3'	NM_001323654.1
	ZEB2		
	Forward	5'- CCATCTGATCCGCTCTTATC - 3'	125
	Reverse	5'- CCTGTGTCCACTACATTGTC - 3'	NM_001171653.1
	GAPDH		
	Forward	5'- TGGGTGTGAACCATGAGAAG - 3'	125
	Reverse	5'- GAGTCCTTCCACGATACCAAAG - 3'	NM_001289746.1
	SNAIL		
	Forward	5'- GCAGGACTCTAATCCAGAGTTTACC - 3'	127
	Reverse	5'- GACAGAGTCCCAGATGAGCATT - 3'	NM_005985.4
	SOX3Hs		
	Forward	5'- GTTGGGACGCCTTGTTA - 3'	126
	Reverse	5'- TCGCTGCTCCTGACTTAT - 3'	NM_005634.2

349

350



415x336mm (300 x 300 DPI)

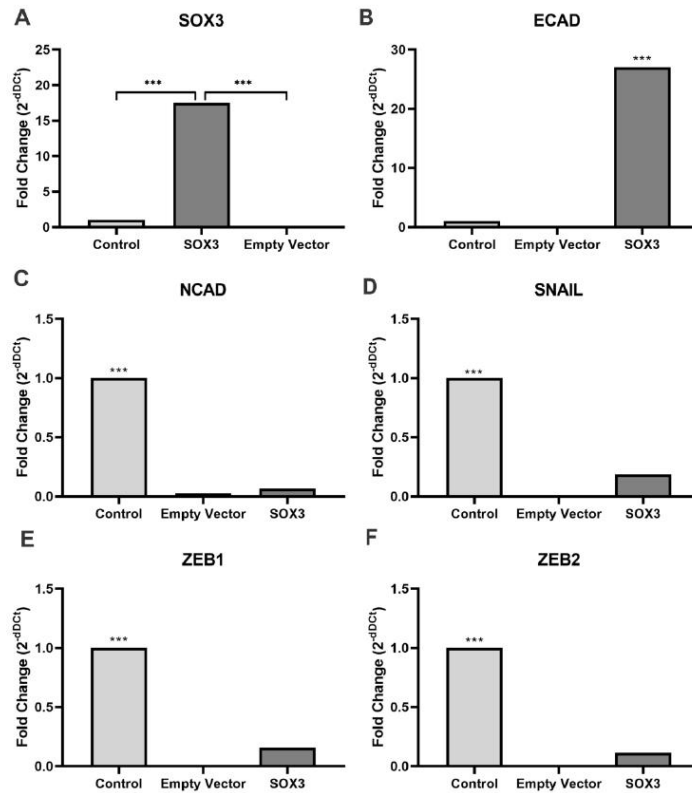


Figure 2. Quantitative PCR – Gene expression: mRNA expression in MDA-MB-231 cells: with no transfection (control); transfected with pEF1-empty vector and transfected with pEF1-SOX3+. (A) SOX3 (B) ECAD, (C) NCAD, (D) SNAIL, (E) ZEB1, and (F) ZEB2. Real-time qPCR was expressed as ΔC_t , which is the cycle threshold (Ct) of the target gene minus the reference gene, GAPDH. The relative gene expression was calculated as fold change using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where ΔC_t of the transfected group minus the ΔC_t of the control group. The real-time PCR results demonstrated higher mRNA expression of ECAD (27.01 fold change), and lower mRNA expression of NCAD (0.06 fold change), SNAIL (0.18 fold change), ZEB1 (0.15 fold change), and ZEB2 (0.11 fold change), compared to untransfected control and empty vector-transfected cells, respectively, $p < 0.005$.

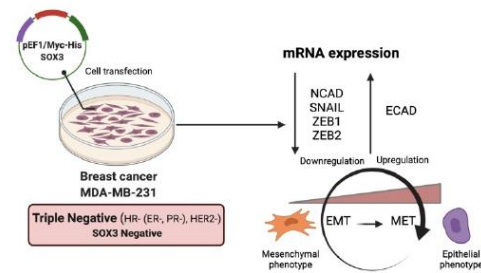


Figure 3. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition phenotype in MDA-MB-231 cells transfected with pEF-1/MycHis/SOX3+. SOX3 protein expression in the triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell line, is followed by a downregulation in NCAD expression, an important mesenchymal phenotype marker, and an upregulation of ECAD expression an important epithelial phenotype marker.

645x452mm (118 x 118 DPI)