



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Raquel Nascimento das Neves

Sinalização de p53 mutante e Interleucina-8: Caracterização funcional e influência na patogênese do câncer de mama triplo-negativo

Florianópolis
2023

Raquel Nascimento das Neves

Sinalização de p53 mutante e Interleucina-8: Caracterização funcional e influência na patogênese do câncer de mama triplo-negativo

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Florianópolis

2023

das Neves, Raquel Nascimento

Sinalização de p53 mutante e Interleucina-8: Caracterização funcional e influência na patogênese do câncer de mama triplo-negativo / Raquel Nascimento das Neves ; orientador, Alfeu Zanotto-Filho, 2023.

101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Câncer de mama. 3. Mutações . 4. Proteína p53. 5. Inflamação tumoral. I. Zanotto-Filho, Alfeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Raquel Nascimento das Neves

Sinalização de p53 mutante e Interleucina-8: Caracterização funcional e influência na patogênese do câncer de mama triplo-negativo

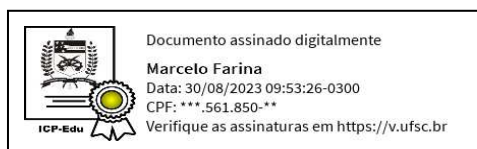
O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 16 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Luciana Pereira Rangel, Dra.
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

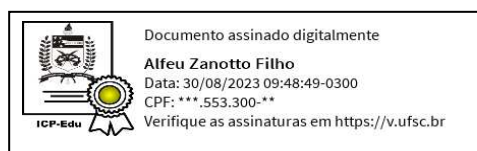
Nauana Somensi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Marcelo Farina Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho à minha família, por sempre incentivarem e apoiarem
minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, à CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por serem os pilares que sustentaram minha trajetória acadêmica. Através dos recursos disponíveis, apoio financeiro, laboratórios de excelência e do corpo docente altamente qualificado, encontrei um ambiente de aprendizado estimulante e propício para o desenvolvimento da minha formação acadêmica e científica.

Ao Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, meu sincero reconhecimento pelo ambiente colaborativo que proporcionou. Agradeço especialmente ao Prof. Alfeu Zanotto Filho, pela sua orientação e dedicação incansável. Sua visão científica, habilidades como educador e inspiração constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e me guiaram ao longo deste percurso, contribuindo para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço aos colegas e amigos de laboratório, que foram essenciais nesta jornada, compartilhando ideias, sonhos e dificuldades, tornando o ambiente de trabalho mais alegre e acolhedor. Agradeço por compartilharmos momentos de aprendizado e crescimento, por estarmos presentes nos momentos tristes e felizes, fortalecendo nossos laços de amizade e colaboração.

Por fim, minha gratidão se estende a todos os colegas, amigos e familiares que me apoiaram nesta jornada. Seus incentivos, encorajamento e compreensão foram fundamentais durante os momentos desafiadores desta trajetória acadêmica. Sem o apoio e carinho de cada um de vocês, esta conquista não seria possível.

"[...] A ciência me ensinou que tudo é mais complicado do que inicialmente supomos, e que ser capaz de derivar a felicidade da descoberta é uma receita para uma vida bela" (JAHREN, Hope, 2016, Lab Girl).

RESUMO

Os tumores mamários do subtipo triplo-negativo (TNBC) possuem alta frequência de mutações no gene do supressor tumoral p53 (*TP53*) e elevada expressão de interleucina-8 (IL-8), sendo considerados os mais agressivos e desafiadores, do ponto de vista terapêutico. Esta tese teve como objetivo estudar a relação entre as mutações do tipo ganho-de-função (GOF) em *TP53* no câncer de mama e a IL-8 expressa por tumores mamários. Para isso, utilizou-se modelos celulares, ferramentas de silenciamento gênico e análises histológicas e de bioinformática. Inicialmente, o estudo revelou que a depleção da p53 mutante tornou as linhagens celulares TNBC suscetíveis ao tratamento com Metanossulfonato de metila (MMS) e cisplatina, reduziu o potencial de invasão, migração e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo CXCL2, IL-8 e IL-6 em linhagens celulares TNBC. No entanto, moléculas associadas à malignidade do câncer de mama, como PGE2 e MMP1, reguladas pela via de sinalização ERK1/2 MAPK, não foram afetadas pela depleção de p53 mutante. O tratamento com inibidores de MEK1/2 demonstrou uma diminuição na produção de citocinas, e a combinação da inibição destas duas vias de sinalização resultou em uma redução aprimorada de IL-8 e IL-6, além de redução na invasão e migração celular, em comparação com cada tratamento isolado. A inibição da sinalização do NFκB também contribuiu para diminuição da viabilidade celular e da produção de citocinas. Embora a depleção de p53 mutante não tenha afetado o status de fosforilação do MEK/ERK1/2 ou dos complexos NFκB, foi observada uma diminuição da atividade do NFκB no núcleo, indicando seu papel na regulação da atividade do NFκB em linhagens celulares TNBC. Esses achados indicam que mutações GOF do *TP53* contribuem com ERK1/2 MAPK e NFκB para a produção do secretoma inflamatório em linhagens celulares TNBC. Sabendo que a IL-8 é produzida por subtipos específicos de câncer de mama e contribui para fenótipos malignos, especialmente no câncer de mama TNBC, nós revisitamos o perfil de expressão e a importância funcional da IL-8. O estudo revelou que há uma ampla faixa de expressão de *CXCL8* (mRNA de IL-8) em tumores mamários e linhagens de câncer de mama. Análises de enriquecimento funcional de genes e mutações indicaram uma sinalização inflamatória aumentada e uma resposta ao estrogênio diminuída associada a níveis mais elevados de *CXCL8* em tumores de mama. A expressão de *CXCL8* se mostrou aumentada em tumores do subtipo molecular tipo-basal e claudin-low. Notavelmente, mutações no gene *TP53* foram associadas a altos níveis de expressão de *CXCL8*. Além disso, foram observados níveis elevados de *CXCL8* e secreção de IL-8 em um painel de linhagens celulares do tipo-basal e claudin-low, as quais apresentaram maior invasividade, quando comparado a linhagens de fenótipo RE+ (ou luminais). A redução da expressão de *CXCL8* por siRNA ou antagonista de receptor CXCR1/2 demonstrou uma diminuição significativa na viabilidade, invasão e potencial de migração de linhagens celulares triplo-negativas/claudin-low de câncer de mama, indicando um papel importante da via IL-8/CXCR1/2 na malignidade tumoral. Esses achados fornecem insights importantes sobre a interação entre IL-8, mutações GOF em *TP53* e resposta inflamatória no câncer de mama, destacando alvos terapêuticos e estratégias potenciais para melhorar a eficácia do tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama; Proteína p53; Ganho-de-função; Inflamação tumoral.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) have high frequency of mutations in the tumor suppressor gene p53 (TP53) and elevated expression of interleukin-8 (IL-8), making them the most aggressive and challenging subtype from a therapeutic standpoint. This thesis aimed to study the relationship between gain-of-function (GOF) mutations in TP53 in breast cancer and the IL-8 expressed by mammary tumors. To do this, cellular models, gene silencing tools, and histological and bioinformatic analyses were employed. Initially, the study revealed that depletion of mutant p53 rendered TNBC cell lines susceptible to treatment with Methyl methanesulfonate (MMS) and cisplatin, reduced invasion and migration potential, and decreased the expression of pro-inflammatory cytokines, including CXCL2, IL-8, and IL-6 in TNBC cell lines. However, molecules associated with breast cancer malignancy, such as PGE2 and MMP1, regulated by the ERK1/2 MAPK signaling pathway, were not affected by mutant p53 depletion. Treatment with MEK1/2 inhibitors showed a decrease in cytokine production, and the combination of inhibiting these two signaling pathways resulted in enhanced reduction of IL-8 and IL-6, as well as decreased cell invasion and migration compared to each treatment alone. Inhibition of NFκB signaling also contributed to decreased cell viability and cytokine production. While mutant p53 depletion did not affect the phosphorylation status of MEK/ERK1/2 or NFκB complexes, decreased NFκB activity in the nucleus was observed, indicating its role in NFκB activity regulation in TNBC cell lines. These findings indicate that GOF mutations in TP53 contribute to ERK1/2 MAPK and NFκB signaling for the production of the inflammatory secretome in TNBC cell lines. Knowing that IL-8 is produced by specific subtypes of breast cancer and contributes to malignant phenotypes, especially in TNBC, we revisited the expression profile and functional importance of IL-8. The study revealed a wide range of CXCL8 (IL-8 mRNA) expression in mammary tumors and breast cancer cell lines. Functional enrichment analyses of genes and mutations indicated increased inflammatory signaling and decreased estrogen response associated with higher levels of CXCL8 in breast tumors. CXCL8 expression was elevated in basal-like and claudin-low molecular subtype tumors. Notably, TP53 gene mutations were associated with high levels of CXCL8 expression. Furthermore, elevated levels of CXCL8 and IL-8 secretion were observed in a panel of basal-like and claudin-low cell lines, which exhibited higher invasiveness compared to RE+ (luminal) phenotype lines. Reducing CXCL8 expression using siRNA or CXCR1/2 receptor antagonists demonstrated a significant decrease in viability, invasion, and migration potential of triple-negative/claudin-low breast cancer cells, indicating an important role of the IL-8/CXCR1/2 pathway in tumor malignancy. These findings provide important insights into the interaction between IL-8, GOF mutations in TP53, and inflammatory response in breast cancer, highlighting therapeutic targets and potential strategies to enhance the effectiveness of breast cancer treatment.

Keywords: Breast cancer; p53 protein; Gain-of-function; Tumor inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hallmarks do Câncer.....	22
Figura 2. Esquema de classificação molecular do câncer de mama.....	26
Figura 3. Supressor tumoral p53.....	31
Figura 4. Feedback regulatório p53-MDM2 sob condições não estressadas e função p53 sob estímulos estressantes.....	32
Figura 5. Frequência de mutações em p53 nos domínios da proteína.	34
Figura 6. Mutação em p53.	36
Figura 7. Vias ERK, JNK e p38 MAPK na sinalização MAPK.	40
Figura 8. Via de sinalização canônica e não-canônica de NFκB	45

Capítulo 1

Figure 1. Mutant p53 role in cell proliferation, invasion, migration, and response to cellular damage in TNBC cells.....	60
Figure 2. Mutant p53 regulates pro-inflammatory cytokines production.....	62
Figure 3. Concomitant inhibition of <i>TP53</i> GOF mutation and MEK/ERK1/2 pathways reduced malignant phenotypes in TNBC cells.....	63
Figure 4. <i>TP53</i> GOF mutation decrease NFκB activity in TNBC cells.....	65

Capítulo 2

Figure 1. <i>CXCL8</i> is expressed in healthy tissues, tumors and cancer cell lines.....	74
Figure 2. <i>CXCL8</i> demonstrates increased expression in ER-, PR-, HER2+ samples and in invasive ductal carcinoma.....	77
Figure 3. <i>CXCL8</i> exhibits elevated expression in basal-like, claudin-low and HER2 tumors.....	79
Figure 4. Functional enrichment and mutational differences in breast cancer	81
Figure 5. Single cell analysis of IL8 expressing cell types in the breast cancer microenvironment.....	83
Figure 6. IL-8 role in triple-negative breast cancer.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine Triphosphate
BRCA1	Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
BRCA2	Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein
CBA	Cytometric Beads Array
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2
CCLE	Cancer Cell Line Encyclopedia
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
COX2	Ciclo-oxigenase-2
DBD	DNA Binding Domain
DEG	Differentially Expressed Genes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNE	Dominant Negative Effect
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Estrogen Receptor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GEA	Gene Enrichment Analysis
GOBO	Gene Expression-based Outcome of Breast Cancer Online
GOF	Gain of Function
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTE _x	Genotype-Tissue Expression
HER2	Human Epidermal Growth Fator Receptor-Type 2
HR	Hormone Receptor
IDC	Invasive Ductal Carcinoma
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor

IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ILC	Invasive Lobular Carcinoma
JNK	C-Jun N-Terminal Kinase
LOF	Loss of Function
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2	Murine Double Minute
miRNA	MicroRNA
MMP1	Matrix metalloproteinase 1
MMPs	Matrix Metalloproteinases
mRNA	RNA mensageiro
NFkB	Nuclear Factor-Kb
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2
OD	Oligomerization Domain
PAM50	Prediction Analysis of Microarray 50
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PGE2	Prostaglandina-E2
PKB	Protein Kinase B
PR	Progesterone Receptor
PRD	Proline Rich Domain
qRT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
REs	Response Elements
RNA	Ácido Ribonucleico
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases
siRNA	Small-Interference RNA
SRB	Sulforhodamine B
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TAD	Transactivation Domain
TBNC	Triple-Negative Breast Cancer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue MicroArray
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	CÂNCER.....	20
1.2	CÂNCER DE MAMA	22
1.2.1	Classificação histológica e molecular do câncer de mama	23
1.2.2	Terapia do câncer de mama	27
1.3	ALTERAÇÕES EM VIAS DE SINALIZAÇÃO NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO.....	29
1.3.1	Proteína p53	29
1.3.1.1	<i>Mutação: a perda e o ganho de função dos mutantes</i>	32
1.3.1.2	<i>p53 mutante como alvo na terapia do câncer de mama</i>	37
1.3.2	ERK1/2 MAPK no câncer de mama.....	38
1.3.2.1	<i>ERK1/2 MAPK como alvo na terapia do câncer de mama</i>	40
1.4	INFLAMAÇÃO PROMOVIDA PELO TUMOR	42
1.4.1	Alguns fatores-chave na inflamação associada ao tumor	44
2	JUSTIFICATIVA.....	48
3	HIPÓTESES.....	49
3.1	CAPÍTULO 1	49
3.2	CAPÍTULO 2	49
4	OBJETIVOS	50
4.1	OBJETIVO GERAL: CAPÍTULO 1	50
4.1.1	Objetivos específicos	50
4.2	OBJETIVO GERAL: CAPÍTULO 2	50
4.2.1	Objetivos específicos	51
5	DESENVOLVIMENTO	52
5.1	CAPÍTULO 1 - MUTANT P53 AND ERK1/2 MAPK COOPERATE WITH THE PRODUCTION OF TNBC INFLAMMATORY SECRETOME	52
5.2	CAPÍTULO 2 - MOLECULAR PORTRAIT OF IL-8 IN BREAST CANCER: REVISITING AN OLD FOE	71
6	COLABORAÇÕES	94
7	CONCLUSÃO	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo e está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (BRAY *et al.*, 2018a). A mais recente estimativa mundial, aponta que em 2020 ocorreram cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer e quase 10,0 milhões de mortes por câncer no mundo (SUNG *et al.*, 2021). Para o Brasil, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer no triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2023).

A formação do câncer é um processo complexo, composto por várias etapas que demandam numerosas alterações e modificações em nível celular que podem variar entre os diferentes tipos de tumores e indivíduos (BASU, 2018; BRAY *et al.*, 2018b). De acordo com Basu e colaboradores (2018), a iniciação acontece quando ocorrem mudanças estáveis no genoma das células, como mutações, deleções ou ampliações gênicas, que podem ocorrer de forma espontânea ou serem induzidas pela exposição a fatores ambientais, como substâncias químicas carcinogênicas, radiação ou vírus (BASU, 2018). A iniciação leva à formação de células com características genéticas alteradas, que são a base para o desenvolvimento do câncer. A promoção, é a fase em que as células iniciadas entram em um processo de proliferação acelerada, estimulada por agentes promotores, que podem ser hormônios, substâncias químicas ou fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral. A exposição contínua a esses agentes promotores leva à expansão do clone celular mutado e à formação de lesões pré-cancerosas ou tumores benignos. A progressão é a fase irreversível em que novas alterações genômicas se somam a mudanças no microambiente tumoral. Isso inclui a acumulação de mutações adicionais, pressão seletiva do microambiente tumoral e seleção clonal das células mais adaptadas. Esses processos resultam em uma população de células malignas com alto potencial de invasão tecidual, capacidade metastática e escape dos mecanismos de controle do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2011b).

Associados a sustentação da sinalização proliferativa, em 2011, Hanahan e Weiberg, descreveram fenótipos que também caracterizam o câncer, como evasão

da atividade de supressores de crescimento, resistência à morte celular programada, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, ativação da invasão celular e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011a). Além destas características, estão a instabilidade genômica, que resulta em mutações e alterações no DNA, que contribuem para a diversidade genética observada nos tumores, e a inflamação promovida pelo tumor, que também desempenha um papel importante no câncer, favorecendo várias das características descritas anteriormente por Hanahan e Weinberg, através da promoção um ambiente favorável para o crescimento tumoral, indução da proliferação celular, estimulação da angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN, 2022).

A reprogramação do metabolismo energético e evasão do sistema imunológico também são cruciais para o crescimento e sobrevivência das células tumorais. Em contraste com as células diferenciadas, que na presença de oxigênio dependem do sistema de fosforilação oxidativa, as células tumorais têm a capacidade de reprogramar o seu metabolismo para manter um metabolismo altamente glicolítico, independentemente da presença de oxigênio. Esse fenômeno de glicólise aeróbica característico dos tecidos tumorais, descrito no início do século XX, é conhecido como efeito Warburg (CRUZ-BERMÚDEZ *et al.*, 2021). Já o sistema imunológico, possui mecanismos de controle que reconhecem e eliminam células cancerosas, entretanto, as células tumorais desenvolvem estratégias para escapar da resposta imune, permitindo assim a sobrevivência e progressão tumoral (LABANI-MOTLAGH; ASHJA-MAHDAVI; LOSKOG, 2020).

Outro componente que é agora amplamente estudado por desempenhar um papel importante na tumorigênese e progressão maligna, é o microambiente tumoral, composto por populações heterogêneas e interativas de células tumorais e células-tronco cancerosas, juntamente com uma multiplicidade de células estromais como fibroblastos, células endoteliais, células imunes e células do tecido adiposo (HANAHAN, 2022). Essas células estromais recrutadas secretam fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e enzimas que promovem a proliferação, angiogênese, invasão e metástase das células tumorais. Além disso, o microambiente tumoral também inclui componentes da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicanos e outras proteínas, que fornecem suporte estrutural para o tumor (BAGHBAN *et al.*, 2020). Esses fenótipos e características, representadas na Figura 1, fornecem uma base sólida para a compreensão dos mecanismos

envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer, contribuindo para o avanço dos estudos e terapias relacionadas à doença.

Hallmarks do Cancer

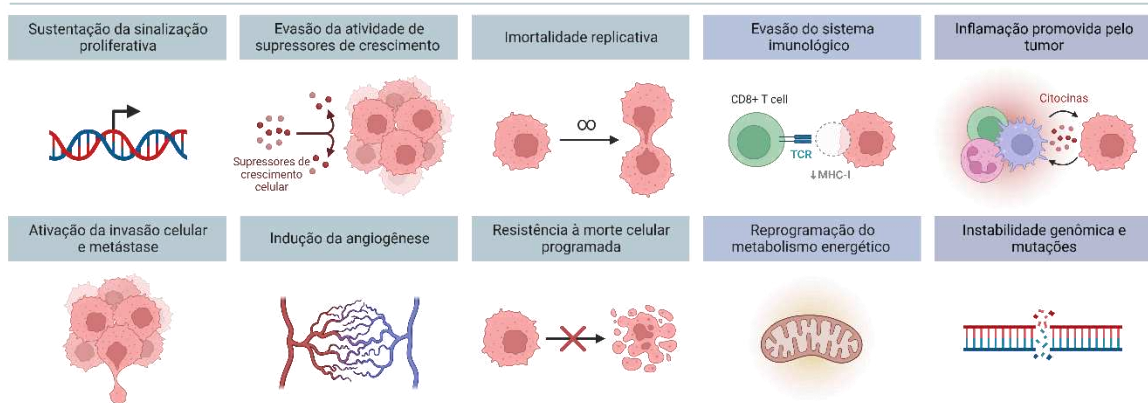


Figura 1. Hallmarks do Câncer. Adaptado de Hanahan, 2022 (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

1.2 CÂNCER DE MAMA

Os tumores de mama são os mais incidentes entre os tipos de câncer existentes, são os mais comumente diagnosticados e são a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. No período de 2023 a 2025, a estimativa para o Brasil é de 73.610 novos casos de câncer de mama, correspondendo a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023). Apesar dos avanços no rastreamento, como a mamografia bienal em mulheres entre 50 e 69 anos, ainda há desafios significativos relacionados ao diagnóstico tardio e à progressão para doença metastática. Muitas pacientes são diagnosticadas em estágios avançados da doença, o que torna o tratamento mais desafiador (SUNG *et al.*, 2021).

O câncer de mama é uma doença heterogênea que envolve uma diversidade de tipos celulares e alterações genéticas (DAI *et al.*, 2016). Fatores de risco não atuam isoladamente, mas interagem de maneira complexa e embora não haja um único fator de risco predominante, a idade é considerada o fator mais importante para o desenvolvimento do câncer de mama, dado que o risco aumenta significativamente após os 50 anos de idade (FENG *et al.*, 2018). No entanto, existem outros fatores que também podem aumentar substancialmente o risco de desenvolver a doença, como os fatores genéticos e hereditários que desempenham um papel significativo em casos de câncer de mama, como mutações nos genes

BRCA1 e *BRCA2*, e em outros genes de suscetibilidade ao câncer (BRAY *et al.*, 2018a). Além disso, fatores relacionados à história reprodutiva e hormonal também estão associados ao risco de câncer de mama. A menopausa tardia, por exemplo, está relacionada a um maior risco, assim como a exposição a hormônios como o estrogênio e a progesterona ao longo da vida. Fatores comportamentais e ambientais como obesidade, sedentarismo e exposição frequente a radiações ionizantes, como radioterapia prévia, também desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer de mama e estão associados a um aumento do risco (DAVIS LYNN *et al.*, 2018).

1.2.1 Classificação histológica e molecular do câncer de mama

Os cânceres de mama são bastante heterogêneos, apresentam características morfológicas e biológicas variáveis e, conseqüentemente, comportamento clínico e resposta ao tratamento diferenciados. A classificação histológica dos cânceres de mama por meio de histologia e imuno-histoquímica (IHC) é essencial para a avaliação do prognóstico e a determinação das opções terapêuticas mais eficazes para cada paciente. Sendo assim, a classificação do câncer visa fornecer um diagnóstico preciso da doença e a previsão do comportamento do tumor (TSANG; TSE, 2019).

A classificação histológica dos cânceres de mama é baseada em vários critérios que avaliam o crescimento patológico do tumor. Isso inclui o tipo celular, a secreção extracelular, as características arquitetônicas e o perfil imuno-histoquímico. Existem mais de 20 tipos histológicos de câncer de mama, mas os mais frequentemente encontrados na prática clínica são o Carcinoma Ductal Invasivo (IDC, do inglês: *Invasive Ductal Carcinoma*) e o Carcinoma Lobular Invasivo (ILC, do inglês: *Invasive Lobular Carcinoma*). O IDC é responsável por 70% a 80% de todos os cânceres invasivos de mama, enquanto o ILC representa cerca de 10% desses casos. Além desses, existem outros tipos histológicos menos comuns, como os carcinomas mucinoso, cribriforme, micropapilar, papilar, tubular, medular, metaplásico e apócrino (TAN *et al.*, 2020; TSANG; TSE, 2019).

A avaliação do câncer de mama de acordo com as características do tumor em análise de IHC inclui análises da expressão de marcadores que são amplamente utilizados na rotina clínica para classificar os tumores de mama e guiar o tratamento.

São eles: receptor de estrogênio (ER, do inglês: *Estrogen Receptor*), receptor de progesterona (PR, do inglês: *Progesterone Receptor*) e Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER2, do inglês: *Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2*). Tumores de mama que expressam ER e/ou PR são classificados como homônio positivos (HR+, do inglês: *Hormone Receptor positive*), tumores que possuem superexpressão de HER2 são classificados como HER2+, e os tumores de mama que não expressam nenhum desses três marcadores (ER, PR e HER2) são conhecidos como cânceres de mama triplo-negativos (TNBC, do inglês: *Triple-negative Breast Cancer*) (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014). Além dos marcadores ER, PR e HER2, outros testes moleculares e genéticos também são usados para fornecer informações adicionais sobre o perfil molecular do tumor, incluindo a expressão de genes relacionados à proliferação celular (e. g., Ki67), com o objetivo de personalizar o tratamento e prever a resposta do paciente a terapias específicas. No entanto, é importante destacar que a classificação histológica, embora forneça informações importantes sobre o tipo e fenótipo do tumor, é uma categorização ampla e não detalhada o suficiente para capturar a heterogeneidade biológica dos cânceres de mama. Tumores do mesmo tipo histológico podem ter comportamentos biológicos muito diferentes. Sendo assim, a avaliação desses parâmetros pode não capturar os variados cursos clínicos individuais de cânceres de mama (RAKHA *et al.*, 2010).

A avaliação dos subtipos moleculares de câncer de mama é uma abordagem mais refinada e complementar à classificação histológica. A heterogeneidade dos cânceres de mama em nível molecular se tornou mais evidente com os avanços da genômica e da transcriptômica - como os estudos do consórcio do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA, do inglês: *The Cancer Genome Atlas*), os quais permitiram uma caracterização abrangente da heterogeneidade molecular da doença (CURTIS, C., 2012). Essas abordagens têm revelado que cânceres de uma mesma origem tecidual são caracterizados como doenças molecularmente distintas, podendo apresentar perfis mutacionais diferentes, variações no número de cópias de genes e expressões gênicas distintas.(KOBOLDT *et al.*, 2012).

Sendo assim, estudos de perfil de expressão gênica global têm desempenhado um papel fundamental na caracterização molecular dos cânceres de mama. Existem dois sistemas de classificação molecular mais amplamente utilizados, onde a análise pode ser realizada em tecido tumoral fixado em formalina

e embebido em parafina. O EndoPredict, é um ensaio de expressão de 12 genes. Este ensaio mede a expressão de três genes proliferativos e cinco genes associados à sinalização do receptor do estrogênio, juntos com quatro genes de normalização e controle, por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR, do inglês: *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*) (DUBSKY *et al.*, 2013). Já o Prosigna *Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay*, anteriormente chamado de teste PAM50, (do inglês: *Prediction Analysis of Microarray 50*), utiliza a plataforma nCounter NanoString para analisar a expressão de 50 genes específicos (BERNARD *et al.*, 2009). Esses estudos permitiram a identificação de subtipos moleculares clinicamente relevantes, conhecidos como subtipos moleculares intrínsecos, são eles:

- Luminal A: É caracterizado por uma expressão gênica semelhante às células epiteliais que revestem os ductos mamários normais. Os tumores luminais A são frequentemente positivos para os receptores de estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR) e apresentam um prognóstico favorável (KOBOLDT *et al.*, 2012).
- Luminal B: Também são positivos para os receptores de estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR), mas apresentam alta expressão de genes relacionados ao aumento da proliferação celular, como Ki67, e um prognóstico um pouco menos favorável em comparação aos tumores luminais A (KOBOLDT *et al.*, 2012).
- HER2+: É caracterizado pela amplificação ou superexpressão do gene HER2. Os tumores HER2+ tendem a ser mais agressivos, mas os pacientes se beneficiam com terapias específicas direcionadas ao HER2 (PRAT; PEROU, 2011).
- Basal-like: É caracterizado por uma expressão gênica semelhante às células basais da mama. Esses tumores geralmente são negativos para os ER, PR e HER2, sendo denominados como triplo-negativos. Apresentam um comportamento mais agressivo e estão associados a um prognóstico geralmente pior comparado aos outros subtipos (PRAT; PEROU, 2011).
- Normal-like: É considerado um subtipo residual e representa uma pequena proporção de tumores de mama, apresentando expressão gênica semelhante aos tecidos mamários normais (TSANG; TSE, 2019).

Em 2010, Prat e colaboradores caracterizaram o subtipo claudin-low, como um subtipo de tumores do tipo basal-like, usando um banco de dados de tumores humanos e múltiplos conjuntos de dados independentes, apresentando as características patológicas e a resposta à quimioterapia deste subtipo de cânceres de mama triplo-negativo. Em contraste com o subtipo basal-like, os tumores claudin-low apresentam expressão reduzida de claudinas, que estão envolvidas na formação de junções celulares e desempenham um papel na manutenção da integridade dos tecidos. Além disso, possuem baixa instabilidade genômica, exibem uma carga mutacional e níveis de proliferação celular mais baixos. Entretanto, apresentam presença de altos níveis de infiltração de células imunes e estromais (PRAT *et al.*, 2010). Essa classificação molecular dos subtipos intrínsecos, representados na Figura 2, permite uma melhor compreensão da biologia dos tumores de mama e tem implicações clínicas importantes, como a seleção de terapias direcionadas específicas para cada subtipo.

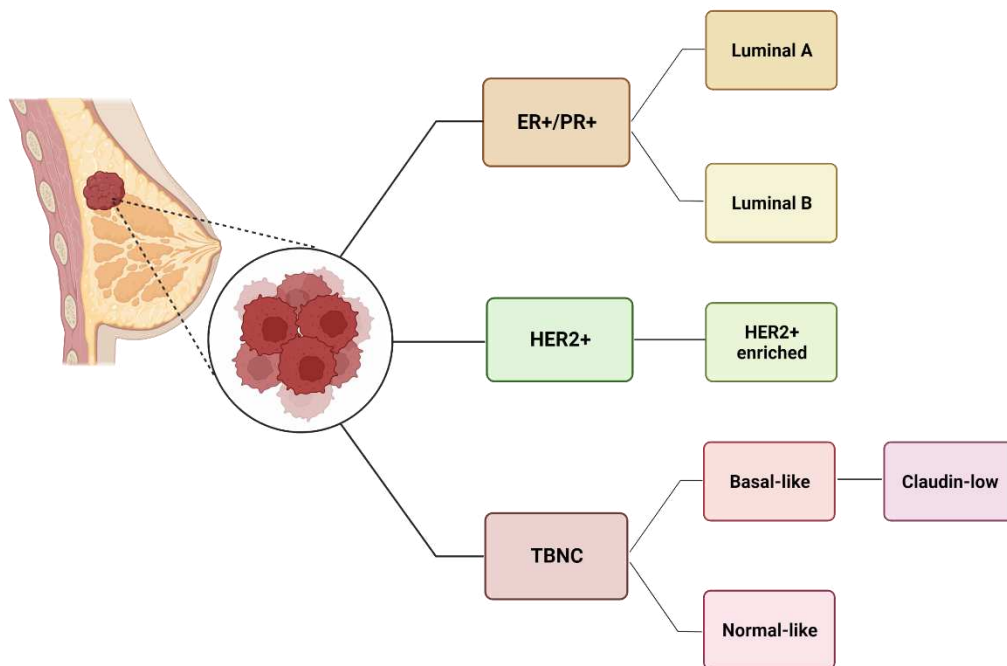


Figura 2. Esquema de classificação molecular do câncer de mama. Um modelo proposto para entender como os subtipos moleculares correspondem ao esquema molecular inicial de ER/PR, HER2 e TNBC. A assinatura do gene PAM50 organiza os cânceres de mama em cinco subtipos distintos: luminal A, luminal B, tipo normal-like, basal-like e enriquecido com HER2, com classificação adicional do subtipo distinto de claudin-low. Legendas: ER, receptor de estrogênio; HER2, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; PR, receptor de progesterona; TNBC, câncer de mama triplo-negativo. Adaptado de (TURNER *et al.*, 2021) (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

1.2.2 Terapia do câncer de mama

A abordagem terapêutica para o câncer de mama é altamente personalizada, levando em consideração fatores como o subtipo molecular do tumor, estadiamento da doença, características individuais do paciente e resposta ao tratamento. A terapia do câncer de mama tem se beneficiado de inúmeros avanços nas últimas décadas, permitindo abordagens terapêuticas mais específicas e eficazes para diferentes subtipos moleculares da doença. No caso dos tumores de mama ER positivos, o tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrógeno oral que se liga aos receptores de estrogênio nas células tumorais e inibe seu estímulo proliferativo, tem sido amplamente utilizado como terapia hormonal. Essa abordagem tem mostrado resultados favoráveis, especialmente quando combinada com o estadiamento precoce da doença (WILSON *et al.*, 2017). Para tumores HER2 positivos, o uso do anticorpo monoclonal trastuzumabe (comercialmente conhecido como Herceptin) tem revolucionado a terapia-alvo. O trastuzumabe atua direcionando-se ao receptor HER2, presente em grande quantidade nessas células tumorais, inibindo sua atividade e sinalização proliferativa. Isso resulta em uma melhoria significativa no prognóstico e na sobrevida dos pacientes com tumores HER2 positivos. No entanto, os TNBC, representam um desafio terapêutico, pois não possuem alvos moleculares específicos para terapias direcionadas disponíveis (KWON *et al.*, 2017).

A quimioterapia tornou-se a principal abordagem para o tratamento dos tumores de mama triplo-negativos. Nos últimos anos, o uso de regimes de quimioterapia neoadjuvante no tratamento destes tumores tem apresentado uma taxa de remissão patológica significativamente maior do que para o câncer de mama com receptor hormonal positivo e pode melhorar significativamente o prognóstico dos pacientes. Atualmente, as diretrizes de tratamento recomendam o uso de regimes de combinação com base em taxano, antraciclina, ciclofosfamida, cisplatina e fluorouracil (YIN *et al.*, 2020).

Há um grande número de ensaios clínicos em andamento que tem como alvo receptores específicos ou em terapias direcionadas para tumores de mama triplo-negativos. Dados de estudos pré-clínicos apoiam o uso do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês: *Epidermal Growth Factor Receptor*) como potencial alvo para a terapia direcionada para TNBC, devido à 70-78% destes

tumores superexpressarem EGFR. Entretanto, dados experimentais clínicos com inibidores de transdução, como o gefitinib, não obtiveram resultados eficazes (CERSOSIMO, 2019; MA, C. X. *et al.*, 2017).

A poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1, do inglês: *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*) é uma das enzimas mais importantes da família PARP e desempenha um papel vital no reparo do DNA. A inibição da PARP leva à perda da função de reparo do DNA e, assim, induz a apoptose (TENTORI; GRAZIANI, 2005). Os inibidores de PARP têm efeitos antitumorais significativos em tumores deficientes em *BRCA1/2*, e até 25% dos pacientes com tumores de mama triplo-negativos carregam mutações em *BRCA1/2* (BARCHIESI *et al.*, 2021). Portanto, espera-se que os inibidores de PARP sejam usados na terapia direcionada de pacientes com tumores de mama triplo-negativos com mutações *BRCA1*. Entretanto, a administração de olaparibe, um inibidor de PARP, não gerou diferença significativa na taxa de resposta entre pacientes com tumores de mama triplo-negativos com e sem mutações *BRCA1/2* (TUNG; GARBER, 2022).

O ligante de morte programado 1 (PD-L1, do inglês: *Programmed death-ligand 1*) é um alvo potencial importante encontrado principalmente em células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (CHA *et al.*, 2019). No entanto, células tumorais também expressam PD-L1 em sua superfície, interagindo com o receptor inibitório PD1 em linfócitos T. Essa interação inibe a atividade citotóxica das células CD8 infiltrantes de tumores, suprimindo a produção de citocinas. Isso permite que as células cancerosas evitem a detecção e causem a "exaustão de células T", suprimindo a via de sinalização do receptor de células T (TCR, do inglês: *T cell receptor*) (SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018). Em 2016, Sun e colaboradores demonstraram que 59% dos pacientes com tumores de mama triplo-negativos superexpressam PD-L1, indicando que PD-L1 pode ser um potencial alvo imunoterapêutico (SUN; LEE; KOO, 2016). Sendo assim, em um estudo clínico que realizou o tratamento de tumores TNBC com pembrolizumabe, um anticorpo monoclonal anti-PD-1, verificou-se que a taxa de resposta geral (ORR, do inglês: *Overall response rate*) foi de 18,5% nos 27 pacientes cuja atividade antitumoral foi avaliada (NANDA *et al.*, 2016).

1.3 ALTERAÇÕES EM VIAS DE SINALIZAÇÃO NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Diante da complexidade dos tumores de mama triplo-negativos e da falta de biomarcadores validados, a pesquisa atual busca identificar genes que possam desempenhar papéis importantes no direcionamento terapêutico, no prognóstico da doença e na predição da resposta ao tratamento. Nesse contexto, o TCGA revelou que aproximadamente 80% dos casos de tumores de mama triplo-negativos apresentam mutações no gene supressor de tumor p53 (*TP53*) (CURTIS, C., 2012). Essa descoberta ressalta a importância da proteína p53 no contexto dos tumores de mama triplo-negativos, uma vez que essa proteína desempenha um papel crucial na supressão de tumores, regulando a resposta ao estresse celular e evitando a proliferação de células danificadas ou geneticamente instáveis (XIAO *et al.*, 2020). Além disso, uma das vias de sinalização conhecidas por estar ativada durante a progressão tumoral dos tumores de mama triplo-negativos é a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (do inglês: *Mitogen-activated Protein Kinase*). Essa via desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento celular e tem sido alvo de interesse na busca por novas estratégias terapêuticas (BARTHOLOMEUSZ *et al.*, 2012).

1.3.1 Proteína p53

p53 é uma proteína chave na regulação do ciclo celular e na supressão do crescimento tumoral. O nome "p53" refere-se ao peso molecular aproximado da proteína, que é de cerca de 53 kilodaltons (kDa) (SOUSSEI; MAY, 1996). O gene que codifica a proteína, o *TP53*, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e consiste em 11 exons, que são as regiões do gene que contêm informações para a síntese da proteína. O tamanho aproximado do gene *TP53* é de cerca de 20 kilobases (kb), e a proteína resultante da sua expressão é composta por 393 aminoácidos (LIU *et al.*, 2016). A proteína p53 é composta por cinco domínios funcionais distintos que desempenham papéis importantes em sua atividade reguladora. Esses domínios são:

- Domínios de transativação (TAD) (do inglês: *Transactivation Domain*): Contém dois domínios independentes (aa 1-42 e 43-63) e o sítio de ligação da proteína MDM2 (aa 13-29). São responsáveis por ativar a transcrição de genes alvo e interagem com fatores de transcrição e cofatores para regular a expressão gênica.
- Domínio rico em prolina (PRD) (do inglês: *Proline-Rich Domain*) contém uma série de resíduos de prolina repetidos (aa 64-92) que são conservados na maioria das proteínas p53. É importante para a interação da p53 com proteínas regulatórias, como aquelas envolvidas no controle do ciclo celular e na resposta a danos no DNA.
- Domínio de ligação ao DNA central (DBD) (do inglês: *DNA-Binding Domain*): (aa 101-300) confere à p53 sua capacidade de se ligar especificamente a sequências de DNA chamadas de elementos de resposta p53 (REs) (do inglês: *response elements*). A ligação ao DNA é essencial para a regulação da expressão de genes alvo envolvidos na resposta a estresses celulares.
- Domínio de oligomerização (OD) (do inglês: *Oligomerization Domain*): (aa 307-355) consiste em uma fita beta, seguida de uma alfa-hélice necessária para a dimerização, para que múltiplas moléculas de p53 se associem entre si, formando uma estrutura oligomérica. A oligomerização da p53 é necessária para sua atividade transcricional e interação com outras proteínas regulatórias.
- Domínio C-terminal: (aa 356-393) Contém sinais de localização subcelular que direcionam a proteína p53 para diferentes compartimentos celulares, como o núcleo. Também está envolvido na regulação da estabilidade e atividade da p53.

Em conjunto, esses domínios, representados na Figura 3, conferem à proteína p53 a capacidade de regular a expressão gênica e desempenhar um papel crucial na manutenção da integridade genômica (KASTENHUBER; LOWE, 2017). Conseqüentemente, a proteína p53 é frequentemente referida como a "guardiã do genoma". A regulação transcricional pela p53 de genes envolvidos em processos celulares que suprimem o crescimento tumoral é fundamental para prevenir o início e a progressão de tumores (BECKERMAN; PRIVES, 2010).



Figura 3. Supressor tumoral p53. A. Cristalografia do complexo p53-DNA. Protein Data Bank; Cho *et al*, 1995; Tumor Suppressor p53 Complexed With DNA; <https://doi.org/10.2210/pdb1TUP/pdb>. **B.** Representação esquemática dos diferentes domínios de p53. Adaptado de (PALANIKUMAR *et al.*, 2021) (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

Em condições fisiológicas sem estresse, a expressão de p53 é mantida em baixos níveis, principalmente por ser degradada por uma série de reguladores negativos, incluindo MDM2 (do inglês: *Murine Double Minute*) que interage com a p53 e atua como um ligante de ubiquitina E3, marcando a p53 para a degradação pelo proteassoma, um complexo proteolítico intracelular responsável pela quebra de proteínas (PARRALES; IWAKUMA, 2015).

No entanto, após a exposição a estresses genotóxicos, a proteína p53 sofre modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação, que estabilizam a proteína e bloqueiam sua degradação mediada por MDM2. Isso leva a um aumento nos níveis de p53 na célula e desencadeia uma série de respostas celulares. Uma das principais atividades da p53 é promover a parada do ciclo celular nos pontos de verificação das fases G1 e G2. Isso é parcialmente realizado por meio da ativação transcricional de genes como *p21* e *GADD45* (KASTENHUBER; LOWE, 2017). A parada temporária do ciclo celular permite que as células tenham tempo para reparar danos no DNA antes de continuar a divisão celular, evitando a propagação e acumulação de danos e mutações (LIU; ZHANG; FENG, 2014b).

Além disso, se o dano causado ao DNA não for reparado, p53 pode induzir mecanismos de morte celular, como senescência ou apoptose. A ativação da p53

resulta na transcrição de genes envolvidos em processos de morte celular, como *PUMA*, *Bax* e *Noxa*, e esta indução de morte celular programada é importante para remover células danificadas ou com potencial de transformação maligna, contribuindo para a supressão tumoral (AUBREY *et al.*, 2018). p53 também desempenha outras funções importantes na supressão tumoral, incluindo a regulação do metabolismo celular, defesa antioxidante e ativação de microRNAs (miRNAs). Esses mecanismos adicionais ajudam a manter a integridade genômica, equilibrar o metabolismo celular e suprimir o crescimento de células tumorais (PITOLLI *et al.*, 2019)

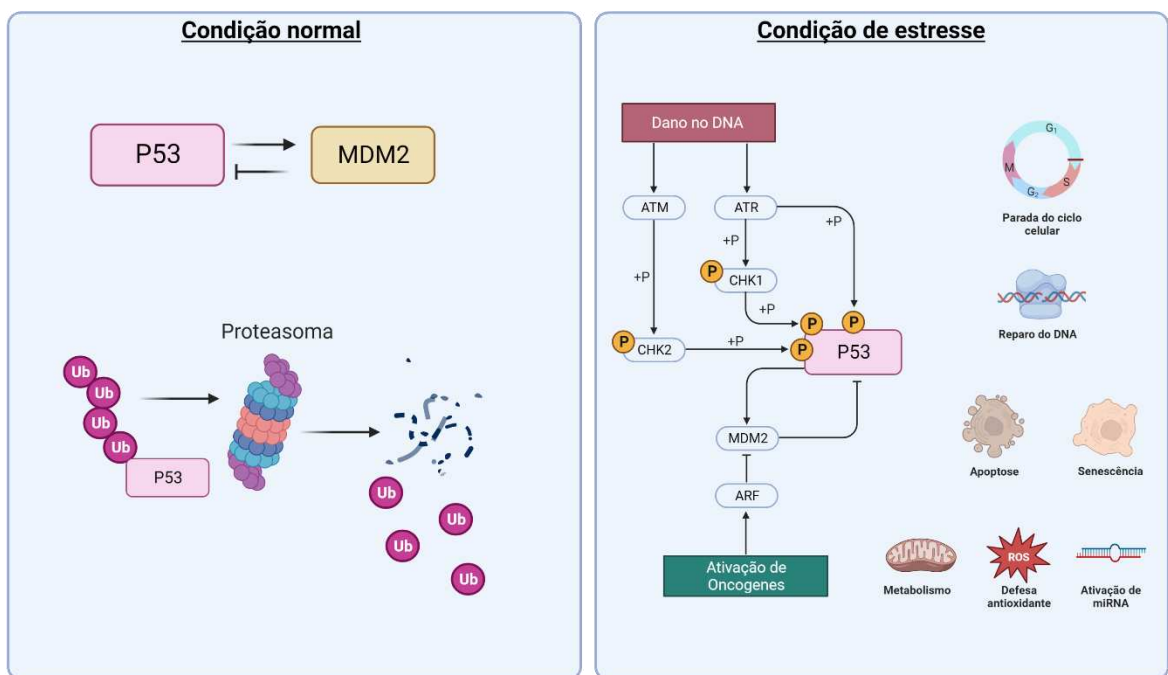


Figura 4. Feedback regulatório p53-MDM2 sob condições não estressadas e função p53 sob estímulos estressantes. Adaptado de (URSO *et al.*, 2016) (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

1.3.1.1 Mutação: a perda e o ganho de função dos mutantes

A perda de função da proteína p53 é um evento crítico no desenvolvimento tumoral. Mutações ou inativação do gene *TP53* são observadas em uma ampla variedade de tipos de câncer. A síndrome de Li-Fraumeni é um exemplo importante que ilustra o impacto das mutações germinativas hereditárias em p53. Essa síndrome é caracterizada por uma predisposição hereditária ao câncer devido a mutações no gene *TP53* transmitidas de geração em geração. Os indivíduos afetados pela síndrome de Li-Fraumeni têm um risco aumentado de desenvolver

vários tipos de câncer, incluindo sarcoma, câncer de mama, câncer cerebral e outros, muitas vezes em uma idade jovem (MAI *et al.*, 2016).

A mutação no gene *TP53* é frequentemente encontrada em tumores malignos, incluindo tumores mamários. Estudos têm demonstrado que a mutação em *TP53* ocorre em aproximadamente 30% dos casos de tumores mamários, independentemente do subtipo (YUE *et al.*, 2017). Quando os tumores mamários são sequenciados e analisados de acordo com os subtipos moleculares, a maioria das mutações em *TP53* está concentrada em tumores do subtipo triplo-negativo/basal-like. Estima-se que cerca de 80% das mutações em p53 ocorram nesse subtipo específico de tumores mamários. Essa alta frequência de mutações em p53 em tumores triplo-negativos/basal-like sugere um papel importante da proteína p53 na patogênese desses tumores (CURTIS, C., 2012).

Ao contrário de muitos genes supressores de tumor, que geralmente sofrem inativação bialélica durante a carcinogênese por meio de deleções ou mutações truncadas, o gene *TP53* é frequentemente inativado por uma única mutação monoalélica sem sentido (*missense*) (>70%), que envolve a substituição de um único nucleotídeo no gene, levando à troca de um aminoácido específico na proteína p53, resultando na formação de uma proteína mutante com comprimento total, mas que perde sua função supressora tumoral normal (BROSH; ROTTER, 2009). A estabilidade aumentada das proteínas p53 mutantes ocorre porque a mutação interfere nos mecanismos que normalmente levam à degradação da p53, como a interação com a proteína MDM2, mencionada anteriormente. Como resultado, a p53 mutante não é efetivamente degradada e acumulam-se em níveis elevados nas células tumorais. A presença dessas proteínas p53 mutantes com acúmulo excessivo pode levar a efeitos negativos nas células tumorais, como aquisição de novas funções oncogênicas, interação com outros fatores de transcrição e modulação de vias de sinalização (YUE *et al.*, 2017).

Das mutações encontradas no gene *TP53*, aproximadamente 80% estão agrupadas nas regiões que codificam o domínio de ligação ao DNA da proteína p53, como demonstrado na Figura 5. Essas regiões incluem locais específicos, onde mutações recorrentes são observadas com maior frequência (LEROY; ANDERSON; SOUSSI, 2014). Alguns exemplos destas mutações no gene *TP53* incluem alterações nos resíduos de aminoácidos 175, 248 e 273. Essas mutações têm efeitos significativos na forma e função da proteína p53 traduzida. Por exemplo,

mutações nos resíduos R273H (Arginina → Histidina) e R248Q (Arginina → Glutamina) afetam resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o DNA, comprometendo assim a capacidade da proteína p53 de se ligar especificamente ao DNA e regular a transcrição de genes alvo. Outras mutações, como nos resíduos R175H (Arginina → Histidina) e R249S (Arginina → Serina), afetam a conformação geral da proteína p53, causando uma distorção total ou parcial do dobramento correto do domínio de ligação ao DNA, levando a uma perda ou alteração na especificidade de ligação da proteína p53 a sequências de DNA específicas (SABAPATHY; LANE, 2018a). Essas mutações no domínio de ligação ao DNA da p53 têm implicações funcionais significativas. A capacidade da p53 de ativar a transcrição de genes alvo envolvidos na supressão tumoral, reparo de DNA e outras funções importantes é prejudicada por essas mutações. Isso pode levar a uma perda ou redução drástica da atividade supressora de tumor da p53 e contribuir para a progressão tumoral (STIEWE; HARAN, 2018).

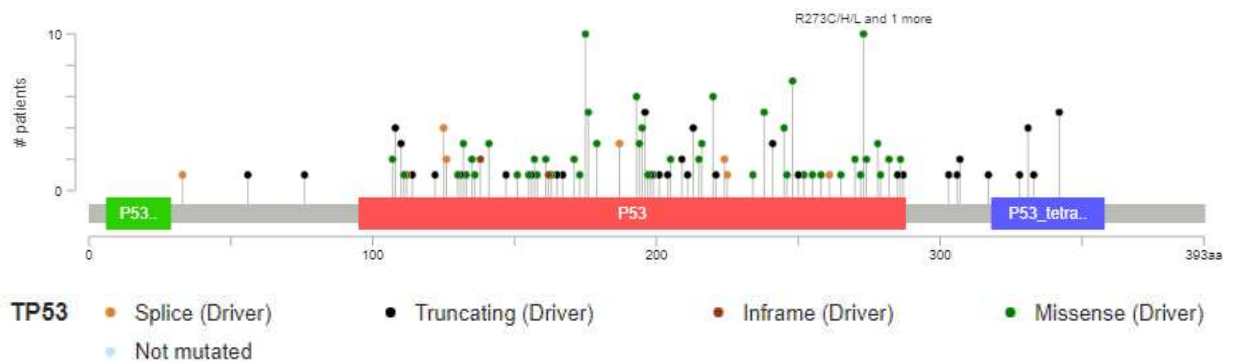


Figura 5. Frequência de mutações em p53 nos domínios da proteína. Gráfico lollipop mostrando as diferentes mutações na proteína p53, principalmente no Domínio de ligação ao DNA. Dados obtidos a partir do projeto TCGA, 2012 (Fonte: *The cBioPortal for Cancer Genomics*, 2023).

Ambos os tipos de mutantes não apenas perdem a atividade do tipo selvagem (LOF, do inglês: *Loss of Function*), mas também podem resultar em outros fenômenos como representado na Figura 6. As mutações no gene *TP53* que ocorrem no domínio de ligação ao DNA da proteína p53 podem apresentar um efeito dominante negativo (DNE, do inglês: *Dominant-Negative Effect*) sobre o alelo selvagem presente no cromossomo homólogo. Esse efeito dominante negativo ocorre quando as proteínas p53 mutantes se oligomerizam com as proteínas p53 do tipo selvagem, formando complexos mistos. Como resultado, a presença de proteínas p53 mutantes com efeito dominante negativo interfere na função da proteína p53 do tipo selvagem. Esses complexos mistos bloqueiam a função de

supressão tumoral da p53, comprometendo a capacidade da p53 selvagem de regular adequadamente a transcrição de genes alvo e exercer suas atividades protetoras contra o desenvolvimento tumoral (PARRALES; IWAKUMA, 2015).

As mutações *missense* de *TP53* no câncer humano são geralmente seguidas por perda de heterozigidade (LOH, do inglês: *Loss of Heterozygosity*) no locus correspondente, ou seja, o alelo saudável e não mutado do *TP53* é perdido nas células tumorais, deixando apenas o alelo mutante. A perda de heterozigidade no locus do *TP53* também é frequentemente associada a um estágio mais avançado do câncer, maior agressividade tumoral e pior prognóstico. Isso destaca a importância da inativação completa da p53 para a progressão tumoral e sugere que a perda do alelo do *TP53* funcional pode ser um evento crítico para a evolução do câncer (YUE *et al.*, 2017).

Além da perda da função do tipo selvagem e do efeito dominante negativo, as mutações de p53 também podem adquirir funções oncogênicas adicionais, conhecidas como mutações com ganho-de-função (GOF, do inglês: *Gain-of-function*). Essas mutações conferem à p53 mutantes novas características que promovem a sobrevivência e a progressão das células tumorais, através de respostas celulares que não são associadas às funções normais da p53 do tipo selvagem (LIU; ZHANG; FENG, 2014a). Essas características oncogênicas da proteína p53 mutante podem afetar diversos processos biológicos associados à progressão do câncer. Por exemplo, a proteína p53 mutante pode promover a invasão e a metástase tumoral através da ativação de vias de sinalização envolvidas na remodelação da matriz extracelular e na migração celular. Além disso, a proteína p53 mutante pode induzir alterações no metabolismo celular, favorecendo a reprogramação metabólica que fornece aos tumores energia e biomassa necessárias para seu crescimento descontrolado. A proteína p53 mutante também pode interagir com o sistema imunológico de maneiras complexas, inibindo a apresentação de antígenos e promovendo a tolerância imunológica. Essas interações com o sistema imunológico podem contribuir para a evasão tumoral do reconhecimento e da destruição pelo sistema imunológico (ALVARADO-ORTIZ *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que os mecanismos e efeitos do ganho de função do p53 mutante são complexos e variados, e podem depender do tipo específico de mutação presente (Figura 6B). O estudo desses mecanismos pode fornecer

conhecimentos importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a tumores com mutações de p53. Em câncer de mama, mutações no resíduo R175H (Arginina → Histidina), promovem a proliferação, migração, metástase e reprogramação metabólica (CAPACI *et al.*, 2020; GAIDDON *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2009). Já mutações no resíduo R273H (Arginina → Histidina) promovem a evasão imune através do aumento da atividade pró-inflamatória no microambiente tumoral (FREED-PASTOR *et al.*, 2012), e mutações em R280K (Arginina → Lisina), promovem a resistência farmacológica através da regulação das vias de reparo do DNA (LIN *et al.*, 2019). Embora esses processos sejam centrais para o câncer, os mecanismos moleculares envolvidos e os alvos precisos das mutações em p53 com ganho de função só recentemente estão sendo elucidados.

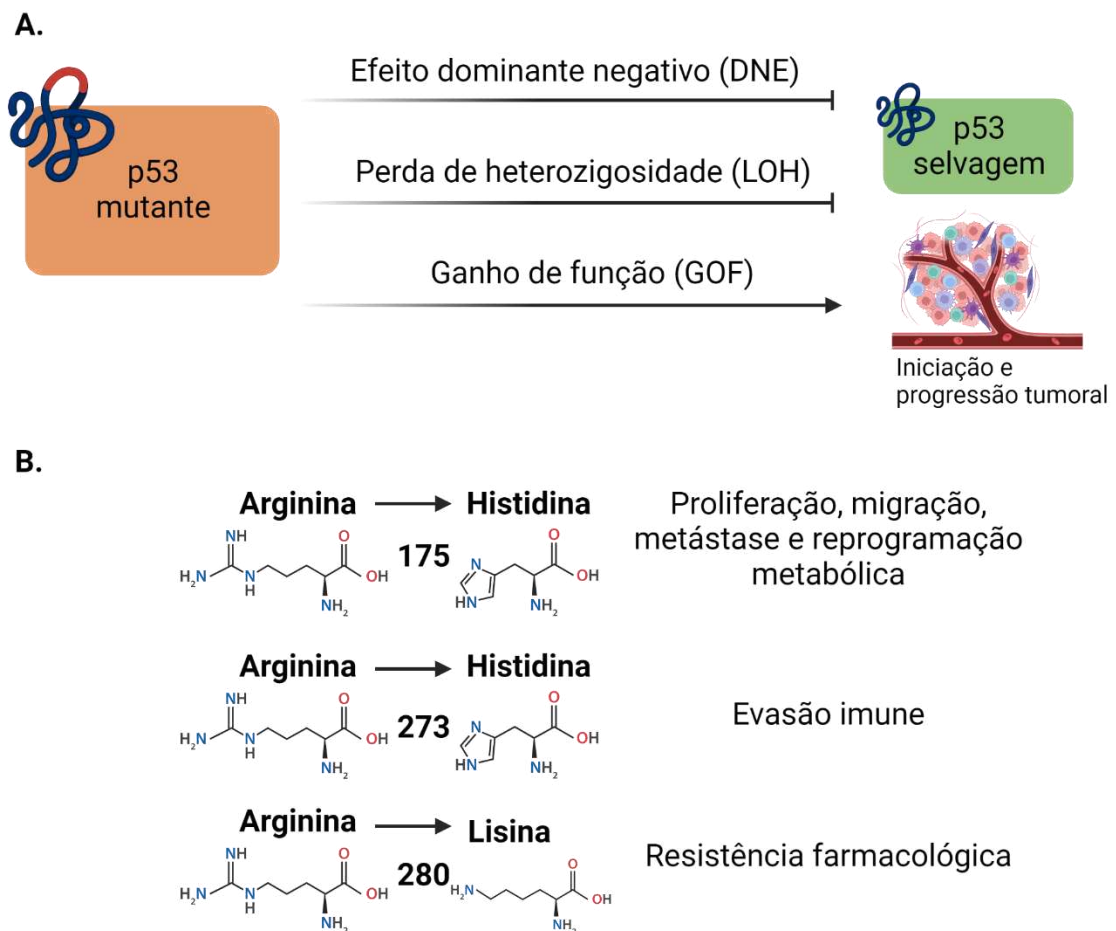


Figura 6. Mutação em p53. (A) As consequências das mutações somáticas do TP53 na tumorigênese. Os resultados dos mutantes p53 são a perda da função do tipo selvagem e o ganho de uma nova função. O LOH (perda de heterozigosidade) e DNE (efeito negativo dominante) são os dois principais mecanismos principais para anular o supressor de tumor função do tipo selvagem p53. Em alguns casos de câncer com mutações TP53, o GOF (ganho de função) dos mutantes p53 são capacitados com tipos de potenciais oncogênicos, que promovem o início do câncer e progressão; **(B)** Exemplos de mutações em diferentes resíduos da proteína p53 e suas consequências na

iniciação e progressão tumoral. Adaptado de (LI *et al.*, 2019) (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

1.3.1.2 *p53* mutante como alvo na terapia do câncer de mama

Uma abordagem promissora na terapia do câncer de mama é o desenvolvimento de terapias direcionadas específicas para tumores com mutações em *TP53*. As mutações em *p53* são específicas do tumor e, portanto, são alvos moleculares ideais para a terapia direcionada ao câncer, que deve causar efeitos colaterais mínimos. Vários medicamentos foram desenvolvidos para atingir as mutações em *p53*. Embora os efeitos biológicos utilizando linhagens celulares e modelos de camundongos tenham sido demonstrados, a segurança clínica e a eficácia da maioria dos medicamentos direcionados às mutações em *p53* ainda não foram determinadas (CANDEIAS *et al.*, 2023).

A primeira estratégia para mutações *missense* de *p53* visa restaurar a atividade da *p53* selvagem ou estabilizar a conformação da *p53* selvagem. Drogas ou compostos que possuem essa função são conhecidos como reativadores. A droga mais representativa desse grupo é o APR246 (Eprenetapopt/PRIMA-1^{MET}), que está sendo testada em vários ensaios clínicos de fase 2 ou 3 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02999893, NCT03931291, NCT04214860 e NCT04383938). É relatado que o APR-246 funciona por sua conversão em células no eletrófilo reativo metileno quinuclidinona (MQ). O MQ reage com os resíduos de cisteína C124, C229 e C277 no núcleo das proteínas *p53* mutantes e, assim, altera sua conformação de mutante para selvagem, resultando na restauração da transativação de genes alvo que inibem o crescimento do tumor (BYKOV *et al.*, 2002). Além disso, já foi demonstrado que PRIMA-1 previne a agregação de *p53* mutante e inibe os efeitos da mutação em linhagens celulares de câncer de mama e ovário, reduzindo os níveis de oligômeros amilóides intracelulares de mutantes nos resíduos R280K e R248Q *p53* juntamente com a reativação e restauração da atividade de *p53* selvagem (RANGEL *et al.*, 2019). Em linhagens celulares de TNBC, APR-246 reduziu significativamente a viabilidade das linhagens MDA-MB231 e MDA-MB468 *in vitro*, mas não teve efeito sobre linhagens mamárias normais (AG11132A) ou linhagens de câncer de mama que expressam *p53* selvagem (MCF-7). Em modelo de xenoenxerto tumoral em camundongos, a administração de APR-246

isoladamente ou em combinação com bavituximab, um anticorpo monoclonal quimérico humano-camundongo que rompe a vasculatura tumoral, reduziu significativamente o crescimento tumoral da linhagem celular MDA-MB231, bem como dois marcadores de angiogênese (LIANG *et al.*, 2020).

A segunda estratégia é induzir a degradação ou esgotamento da p53 mutante *missense*, aproveitando a dependência das células tumorais da p53 mutante e potencialmente restaurando as atividades de alguns supressores de tumor, incluindo p63 e p73, cujas funções são suprimidas pela p53 mutante. Drogas ou compostos empregados para essa estratégia incluem inibidores de HSP90 ou estatinas, medicamentos redutores de colesterol que são capazes de induzir a degradação da p53 mutante, resultando em supressão tumoral (ALEXANDROVA *et al.*, 2015; PARRALES; IWAKUMA, 2015)

A terceira estratégia é induzir a morte celular especificamente em células tumorais com deleções ou mutações em p53, conhecida como letalidade sintética da p53 (Harada *et al.*, 2011). Essa estratégia geralmente visa vulnerabilidades impostas pela deficiência de p53 ou pelo ganho-de-função (GOF) da p53 mutante, em vez de direcionar diretamente para a p53 mutante. Drogas ou compostos utilizados para essa estratégia incluem inibidores de Wee1 ou inibidores de sinalização de resposta a danos no DNA (por exemplo, inibidores de ATR ou Chk1/2) (HIRAI *et al.*, 2009; ORIGANTI *et al.*, 2013; REAPER *et al.*, 2011).

1.3.2 ERK1/2 MAPK no câncer de mama

A via de sinalização MAPK é uma das vias de sinalização mais importantes e amplamente estudadas nas células eucarióticas. Essa via é crucial para a transdução de sinais extracelulares para o interior da célula, regulando uma variedade de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e resposta a estímulos externos (MCCUBREY; LAHAIR; FRANKLIN, 2006). Como demonstrado na figura 7, a via MAPK é ativada por diversos estímulos, como fatores de crescimento, hormônios, estresses ambientais, entre outros. Esses estímulos são reconhecidos por receptores de membrana específicos que desencadeiam uma cascata de reações químicas intracelulares. A via MAPK consiste em três principais níveis de cinases (enzimas que transferem grupos fosfato): MAPKKK, MAPKK e MAPK. O primeiro passo na ativação da via MAPK é a

fosforilação do MAPKKK em resposta ao estímulo extracelular. Essa fosforilação ativa a MAPKKK, que, por sua vez, fosforila e ativa a MAPKK. Em seguida, o MAPKK fosforila a MAPK, ativando-a totalmente, promovendo a ativação de diversos substratos com decisões específicas de destino celular e diferentes desfechos biológicos (CARGNELLO; ROUX, 2011).

A via de sinalização MAPK é altamente regulada para evitar uma ativação indiscriminada e garantir uma resposta adequada aos estímulos. Muitos mecanismos de controle estão em vigor para controlar a atividade das cinases envolvidas e para garantir a sua degradação e inativação após a resposta ao estímulo (YUAN *et al.*, 2020a). A desregulação na via de sinalização MAPK tem sido associada a diversas doenças, incluindo câncer, doenças autoimunes, neurodegenerativas e cardiovasculares. Portanto, o estudo dessa via é de grande relevância para a compreensão dos processos celulares normais e patológicos (SANTARPIA; LIPPMAN; EL-NAGGAR, 2012).

As três principais famílias de MAPKs são: proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK, do inglês: *extracellular signal-regulated kinase*), proteína cinase ativada por c-Jun N-terminal (JNK, do inglês: *c-Jun N-terminal kinase*) e proteína cinase p38 (WIDMANN *et al.*, 1999). Essas vias de sinalização respondem a uma ampla gama de estímulos, incluindo sinais fisiológicos, como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, bem como estresse endógeno e sinais ambientais (Kim *et al.*, 2010). Embora as MAPKs (ERK, JNK e p38) respondam a uma variedade ampla e sobreposta de sinais, a ERK é a mais bem estudada e a via RAS-RAF-MEK-ERK é uma das mais caracterizadas. No contexto do câncer, essa via é especialmente relevante, uma vez que está alterada em cerca de 30% dos casos de câncer humano (FORBES *et al.*, 2011). A ativação das MAPKs ocorre em várias etapas em resposta à estimulação dos receptores de tirosina cinase (RTKs) (do inglês: *Receptor Tyrosine Kinases*). Por exemplo, os ligantes essenciais dos EGFRs são responsáveis pela ativação da MAP cinase e envolvem proteínas como Grb2, Sos e p21ras, além de uma cascata de proteínas cinases sequencialmente definidas, como c-Raf-1 (MAPKKK) e MEK1 e MEK2 (MAPKK). Essas últimas enzimas fosforilam as ERKs, também conhecidas como ERK1 e ERK2, aumentando sua atividade enzimática (STOKOE *et al.*, 1994). Uma vez ativadas, as ERKs migram para o núcleo da célula e ativam fatores de transcrição que regulam a expressão gênica, promovendo crescimento, diferenciação ou mitose. No entanto, quando essa via é

anormalmente ativada devido a mutações genéticas ou outros mecanismos, pode levar a um descontrole na proliferação celular, supressão da apoptose e aumento da capacidade de invasão e metástase de células tumorais (YUAN *et al.*, 2020b).

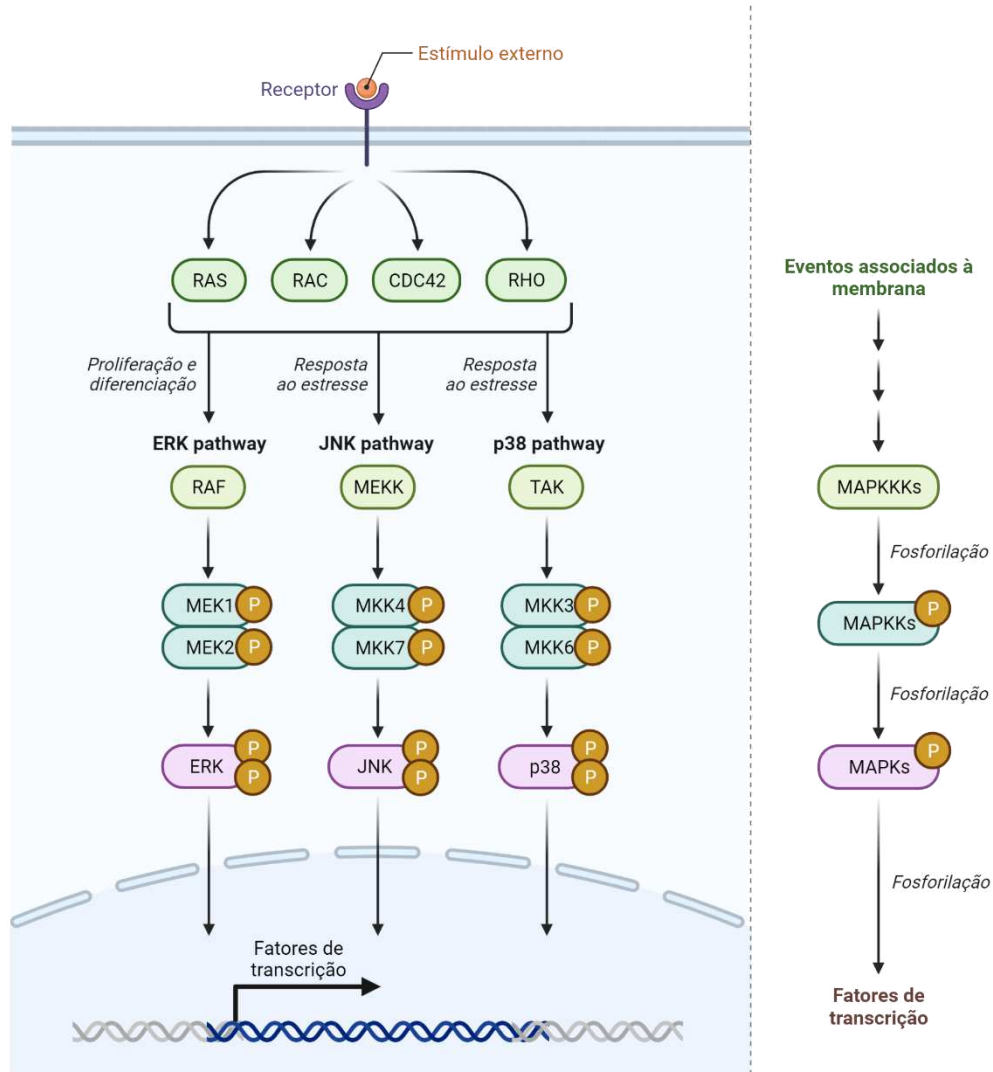


Figura 7. Vias ERK, JNK e p38 MAPK na sinalização MAPK. Após estimulação externa, os receptores tirosina cinases (RTKs) ativam o módulo de cinase de três camadas que compreende MAPKK. MAPKK, e MAPK através da fosforilação sequencial de proteínas. As MAPKs ativadas são translocadas para o núcleo e desencadeiam respostas celulares. Adaptado de (PUA *et al.*, 2022) (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

1.3.2.1 ERK1/2 MAPK como alvo na terapia do câncer de mama

Devido à importância da via RAS-RAF-MEK-ERK no câncer, muitos esforços de pesquisa têm sido direcionados para o desenvolvimento de terapias direcionadas a essa via, o que modificou essencialmente a estratégia terapêutica dos cânceres em estudos pré-clínicos e clínicos (SONG *et al.*, 2023).

Embora as mutações ativadas em MEK sejam relativamente baixas em tumores humanos, a atividade de MEK é encontrada em níveis elevados em mais de 85% dos cânceres, em parte devido às mutações *upstream* de *RAS* ou *RAF*. Portanto, inibir MEK é uma estratégia terapêutica atraente e para esse fim, várias combinações (inibidor de MEK e inibidor de B-Raf) foram aprovadas pelo FDA, e essas abordagens terapêuticas efetivamente interromperam o crescimento tumoral em modelos pré-clínicos e em pacientes com mutações *RAS* ou *RAF* em diferentes tipos de tumores (KIRCHBERGER *et al.*, 2018). A imunoterapia fez um progresso notável em alcançar um aumento da sobrevida global e remissão durável a longo prazo em pacientes com tumor, que depende principalmente de células T CD8+ de memória. Recentemente, estudos mostraram que a inibição de MEK, com o inibidor selumetinibe (Koselugo) pode reprogramar as células T CD8+ em células-tronco de memória com potente capacidade antitumoral (LOI *et al.*, 2016), e a inibição de RAF poderia induzir a expressão de PD-L1 de células tumorais (EBERT *et al.*, 2016). Em linhagens celulares de TNBC, o inibidor de MEK aumentou significativamente a expressão de PD-L1, e a combinação de anticorpos PD-L1 e inibidor de MEK aumentou a resposta imune antitumoral em um modelo de camundongo de câncer de mama e câncer de cólon (EBERT *et al.*, 2016; LOI *et al.*, 2016).

O UO126 é uma molécula sintética que foi desenvolvida para bloquear especificamente a atividade das cinases MEK1 e MEK2. Essas cinases são responsáveis por fosforilar e ativar as proteínas cinases ERK1 e ERK2, que por sua vez têm um papel central na transmissão de sinais para o núcleo celular. A inibição do MEK impede a ativação subsequente das ERKs, interrompendo assim a cascata de sinalização MAPK/ERK (FAVATA *et al.*, 1998). Ao inibir seletivamente o MEK1/2, o UO126 tem sido amplamente utilizado como ferramenta de pesquisa em estudos pré-clínicos e em linhagens celulares. No entanto, sua aplicação clínica direta como um medicamento terapêutico é limitada devido a vários fatores, incluindo a falta de especificidade, toxicidade e dificuldades em alcançar alvos específicos *in vivo* (ADNANE *et al.*, 2006; WILHELM *et al.*, 2006).

O sorafenibe é um medicamento que pertence à classe dos inibidores de tirosina cinase, que são compostos que bloqueiam as enzimas responsáveis por transmitir sinais de crescimento celular. Foi aprovado para uso clínico em 2005 e é utilizado principalmente para tratar tumores de cólon, rim, pulmão e mama em modelos xenotransplante (ADNANE *et al.*, 2006; WILHELM *et al.*, 2006), bloqueando

a inflamação induzida pelo tumor, invasão celular e angiogênese (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2018). O sorafenibe atua inibindo várias proteínas cinases, incluindo as cinases do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR, do inglês: *Vascular endothelial growth factor*), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR, do inglês: *Platelet-derived growth factor receptors*), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (do inglês: *Epidermal growth factor receptor*), *B-Raf* e *C-Raf*. Em ensaios clínicos de câncer de mama, a monoterapia com sorafenibe e as combinações com taxanos e bevacizumabe mostraram baixa eficácia, enquanto que as combinações com gemcitabina e/ou capecitabina em doença localmente avançada ou metastática apresentaram resultados promissores. Em relação à toxicidade, o sorafenib geralmente é bem tolerado, embora em alguns ensaios sua dosagem tenha precisado ser reduzida e as taxas de interrupção do tratamento tenham sido altas (ZAFRAKAS; PAPASOZOMENOU; EMMANOUILIDES, 2016).

1.4 INFLAMAÇÃO PROMOVIDA PELO TUMOR

A correlação entre inflamação e câncer foi inicialmente proposta em 1863 por Rudolf Virchow, com base em observações de que o câncer se originava em locais de inflamação crônica e que as células inflamatórias, como leucócitos, eram abundantes em biópsias tumorais. Essas observações levaram à hipótese de que a inflamação crônica poderia estar envolvida no desenvolvimento e progressão do câncer (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Atualmente, a inflamação associada ao tumor é considerada uma característica chave do câncer, com uma ligação bem estabelecida entre a inflamação crônica e o desenvolvimento do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011b).

A inflamação aguda e a inflamação crônica têm efeitos diferentes no contexto do câncer. A inflamação aguda é uma resposta temporária e controlada do sistema imunológico a lesões ou infecções. Nesse caso, a inflamação pode desempenhar um papel protetor, ajudando a eliminar as células tumorais. Durante a inflamação aguda, as células do sistema imunológico, como os macrófagos, são ativadas e iniciam a resposta imune antitumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). No entanto, a inflamação crônica, desregulada e persistente é prejudicial e pode promover o desenvolvimento e a progressão do câncer. Nesse contexto, a

resposta inflamatória não é resolvida e continua por um período prolongado de tempo, o que pode levar a danos contínuos nos tecidos e na resposta imune. A inflamação crônica pode contribuir para a resistência terapêutica, tornando as células tumorais menos sensíveis aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia. Além disso, a inflamação crônica pode promover a angiogênese, bem como a invasão local das células tumorais em tecidos adjacentes e a disseminação metastática (ZHAO *et al.*, 2021).

O câncer e a inflamação estão conectados por duas vias: a via extrínseca e a via intrínseca. A inflamação extrínseca do tumor refere-se à inflamação que é desencadeada por fatores externos como fatores ambientais e comportamentais, que estão associados à inflamação crônica e ao aumento do risco de câncer. Entre esses fatores, estão incluídos: doenças autoimunes; infecções bacterianas e virais; obesidade; tabagismo e consumo excessivo de álcool (COUSSENS; WERB, 2002). Em contraste, a inflamação intrínseca do câncer, também conhecida como inflamação induzida pelo câncer, refere-se à resposta inflamatória que ocorre dentro do próprio tumor devido a mutações genéticas e alterações nas células. Essas mutações podem levar à produção de moléculas inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que recrutam e ativam células inflamatórias no microambiente tumoral. A inflamação intrínseca do câncer cria um ambiente favorável para a progressão tumoral, fornecendo nutrientes, fatores de crescimento e proteção contra a resposta imunológica. Essa interação entre as células tumorais e as células inflamatórias no microambiente tumoral é complexa e desempenha um papel importante na iniciação e progressão do câncer (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; ZHAO *et al.*, 2021).

Durante a iniciação do câncer, um microambiente tumoral inflamatório pode contribuir para o aumento das taxas de mutações por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e reativos intermediários de nitrogênio, como por exemplo, o óxido nítrico. Essas espécies reativas podem causar danos no DNA, incluindo danos oxidativos, quebras de fita dupla do DNA e outras lesões no material genético. O dano no DNA pode levar a erros de replicação e reparo inadequado do DNA, resultando em instabilidade genômica e mutações acumulativas (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

A inflamação também impulsiona mecanismos relacionados à promoção tumoral, processo de crescimento do tumor a partir de uma única célula inicial em

um tumor primário totalmente desenvolvido. Durante o processo de crescimento tumoral, a inflamação crônica contribui para a progressão do tumor fornecendo uma variedade de moléculas bioativas ao microambiente tumoral, que incluem fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e fatores de sobrevivência, entre outros. Essas substâncias são secretadas pelas células inflamatórias e células tumorais ativadas no microambiente tumoral, criando um ambiente favorável para o crescimento e a sobrevivência das células tumorais (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

1.4.1 Alguns fatores-chave na inflamação associada ao tumor

Na inflamação associada ao tumor, existem vários fatores intrínsecos que desempenham um papel importante na promoção e sustentação do ambiente inflamatório tumoral. Isso inclui fatores de transcrição e citocinas inflamatórias chave.

O Fator Nuclear kappa B (NFκB, do inglês: *Nuclear Factor κB*) é um coordenador-chave da imunidade inata e da inflamação, e emergiu como um importante promotor tumoral endógeno (MANTOVANI *et al.*, 2008). Em células tumorais, células epiteliais em risco de transformação por carcinógenos, e células inflamatórias, o NFκB ativa a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas na via de síntese de prostaglandinas, óxido nítrico sintase (NOS2, do inglês: *Nitric Oxide Synthase 2*) e fatores angiogênicos. Além disso, uma das funções importantes do NFκB em células tumorais ou alvo de agentes carcinogênicos é promover a sobrevivência celular, por meio da indução da expressão de genes antiapoptóticos (XIA; SHEN; VERMA, 2014).

A ativação do NFκB pode ocorrer de várias maneiras, mas geralmente é desencadeada por estímulos pró-inflamatórios, como citocinas, fatores de crescimento, lipopolissacarídeos bacterianos e estresse celular (SUN, 2017). Existem duas principais vias de sinalização envolvidas na ativação do NFκB: a via canônica e a via não-canônica (Figura 8). A via canônica medeia a ativação de NFκB1 p50, RELA e c-REL, onde um estímulo pró-inflamatório, como a ligação de um fator de crescimento ou uma citocina ao seu receptor de superfície celular, desencadeia a ativação de uma enzima chamada IκB cinase (IKK). A IKK, por sua vez, fosforila e degrada a proteína IκBα, que normalmente inibe a atividade do NFκB, retendo-o no citoplasma. A degradação de IκBα libera o NFκB, permitindo sua

translocação para o núcleo da célula, onde ele se liga aos elementos reguladores do DNA e ativa a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória e imune. Na via não-canônica, um grupo diferente de estímulos, como a ligação de ligantes a receptores de fator de necrose tumoral (TNF) (do inglês: *Tumor Necrosis Factor*) ou receptores de linfotóxina- β , desencadeia uma cascata de sinalização que leva à ativação da cinase IKK α . A IKK α fosforila e processa uma proteína chamada p100, convertendo-a em seu produto de clivagem, p52. O complexo NF κ B p52/RELB é então liberado e translocado para o núcleo, onde ativa a expressão de genes específicos (SUN, 2017).

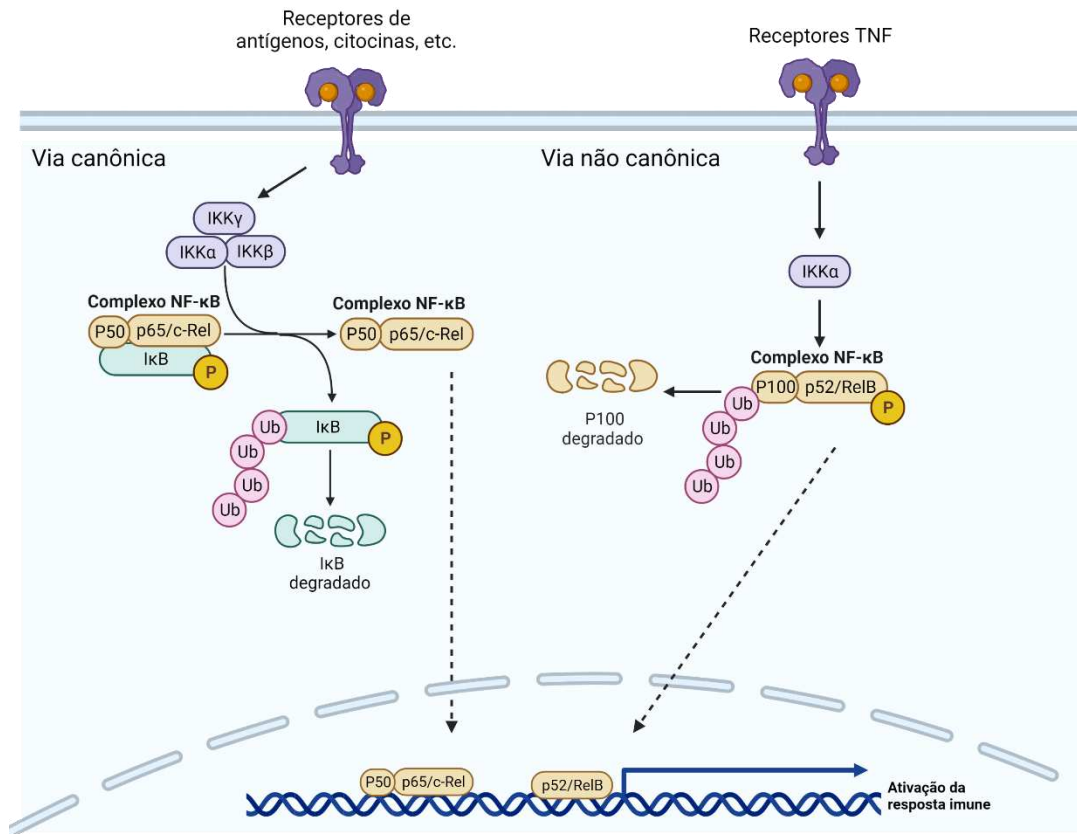


Figura 8. Via de sinalização canônica e não-canônica de NF κ B. A via canônica do NF- κ B envolve a fosforilação e degradação das proteínas I κ B para liberar dímeros de NF- κ B que entram no núcleo e se ligam aos genes alvo. A via não canônica envolve o processamento de p100 para produzir p52 e RELB, que também se translocam para o núcleo. Adaptado de (SUN, 2017) (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender, 2023).

O NF κ B juntamente com outros fatores de transcrição, como o Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT3, do inglês: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como a produção de ciclooxigenase 2 (COX2)

(que, por sua vez, resulta na produção de prostaglandinas) (DIWAKAR *et al.*, 2017). As citocinas ativam os mesmos fatores-chave de transcrição em células inflamatórias, células estromais e células tumorais, resultando na produção de mais mediadores inflamatórios e na geração de um microambiente inflamatório relacionado ao câncer (DIWAKAR *et al.*, 2017).

Entre os mediadores inflamatórios produzidos por células tumorais estão as metaloproteinases e prostaglandinas. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas que desempenham um papel importante na remodelação da matriz extracelular, incluindo a degradação de componentes como colágeno e elastina (WANG *et al.*, 2019). No câncer de mama, as células tumorais podem secretar várias MMPs, como a Metaloproteinase da Matriz 1 (MMP1, do inglês: *Matrix Metalloproteinase 1*), também conhecida como colagenase-1, está envolvida na degradação da matriz extracelular. O aumento dos níveis de MMP-1 tem sido observado em câncer de mama triplo-negativo, tanto nas células tumorais quanto nas células estromais circundantes. A expressão aumentada de MMP-1 está associada à progressão do câncer de mama e ao mau prognóstico (NILAND; RISCANEVO; EBLE, 2022). A atividade excessiva da MMP-1 pode contribuir para a invasão local e a metástase do tumor de mama, permitindo que as células tumorais atravessem a matriz extracelular e invadam tecidos adjacentes ou se espalhem para órgãos distantes (WANG *et al.*, 2017). As prostaglandinas são derivadas do ácido araquidônico e desempenham um papel importante na resposta inflamatória. No câncer de mama, as células tumorais podem produzir prostaglandinas, principalmente a Prostaglandina E2 (PGE2), um dos principais produtos derivados da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (WANG; DUBOIS, 2010). Além de afetar as vias de sinalização intracelular nas células tumorais, a PGE2 também contribui para a modificação do microambiente tumoral, promovendo a supressão e evasão imunológica e favorecendo a tumorigênese (CHEN; SMYTH, 2011).

Além disso, células tumorais têm a capacidade de produzir citocinas e quimiocinas, que desempenham um papel crucial na subversão do sistema imunológico e na promoção do crescimento e disseminação do tumor (MANTOVANI *et al.*, 2008). As citocinas produzidas pelas células tumorais podem influenciar o comportamento das células imunes, levando a fenótipos pró-tumorais, como por exemplo, o Ligante de quimiocina 2 (CXCL2, do inglês: *C-C motif chemokine ligand 2*), também conhecido como proteína quimiotática de monócitos 1, é uma citocina

pró-inflamatória que desempenha um papel importante na resposta inflamatória e no recrutamento de células do sistema imunológico, especialmente monócitos e macrófagos, para locais de lesão tecidual e inflamação. No contexto do câncer de mama, o CCL2 pode ser altamente expresso tanto pelas células tumorais quanto pelas células estromais circundantes, incluindo fibroblastos e células endoteliais (SUN *et al.*, 2017).

Citocinas como a IL-6 (Interleucina-6) e interleucina-8 (IL-8), desempenham um papel importante na regulação de vários processos fisiológicos e patológicos podem desencadear respostas inflamatórias e estão associadas a inflamação crônica, que contribui para o desenvolvimento de várias doenças, incluindo câncer (MA, Y. *et al.*, 2017). A Interleucina-8 (IL-8) especificamente, também conhecida como quimiocina CXCL8, é uma proteína de 8,4 kDa, pertencente à subfamília de quimiocinas CXC, caracterizada como uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crucial no recrutamento e ativação de neutrófilos, que são importantes células imunes envolvidas na resposta inicial a infecções e lesões (CHEN, S. jie *et al.*, 2018). A IL-8 é produzida por diversos tipos de células, incluindo células epiteliais, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. A IL-8 se liga a dois receptores na superfície de células-alvo, receptor alfa da IL-8 (IL-8RA/CXCR1) e receptor beta da IL-8 (IL-8RB/CXCR2), para mediar seus efeitos. Além dos neutrófilos, a IL-8 também atrai outras células imunes, como células T, células natural killer e monócitos, para locais de inflamação (RUSSO *et al.*, 2014). A desregulação da IL-8 tem sido implicada em diversas doenças humanas, incluindo aterosclerose, câncer, doença inflamatória intestinal, infecção, sepse, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), psoríase e artrite reumatoide. Nessas condições, a IL-8 pode contribuir para a inflamação crônica, danos teciduais e progressão da doença. No contexto do câncer de mama, a inflamação crônica descontrolada pode levar à produção excessiva de interleucinas, que são secretadas pelas próprias células tumorais (autócrina) ou por células no ambiente circundante (parácrina), promovendo a proliferação e sobrevivência celular, e estão associadas a características agressivas do tumor, como maior invasão, metástase e resistência a tratamentos (SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Os avanços terapêuticos no câncer de mama nas últimas décadas têm sido notáveis, beneficiando especialmente pacientes com tumores expressando receptores de estrogênio (ER-positivos) e tumores com amplificação de HER2 (HER2-positivos). No entanto, tumores de mama triplo-negativos ainda representam um desafio significativo devido à sua natureza invasiva e metastática, além da falta de alvos moleculares específicos. Portanto, há uma necessidade contínua de caracterizar novas vias de sinalização e validar medicamentos que possam interferir na taxa de crescimento, invasão e/ou angiogênese desses tipos tumorais. (BIANCHINI *et al.*, 2022). Diante dessa lacuna terapêutica, compreender os mecanismos associados à inflamação tumoral promovida pelo ganho-de-função dos mutantes de p53 em tumores triplo-negativos torna-se uma etapa crucial para direcionar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, é fundamental investigar a diversidade de mutações p53 com ganho de função, juntamente com o impacto funcional dessas mutações na biologia tumoral, e desenvolver fármacos mutante-específicos que possam afetar essas formas mutantes sem prejudicar as células saudáveis (SABAPATHY; LANE, 2018b).

Especificamente no câncer de mama, o infiltrado inflamatório e o estroma podem constituir até 50% da massa tumoral (VOLODKO *et al.*, 2019). A interleucina-8 (IL-8) em particular tem sido associada à malignidade tumoral em diversos tumores sólidos humanos, incluindo o câncer de mama. Sua superexpressão e potencial efeito autócrino e/ou parácrino na promoção tumoral, além do impacto na angiogênese e resposta imune, tornam a IL-8 uma candidata promissora para investigações mais aprofundadas (LABANI-MOTLAGH; ASHJA-MAHDAVI; LOSKOG, 2020).

Diante desse cenário, o presente trabalho visa investigar o perfil de expressão da IL-8, sua regulação e associação com mutantes de p53 e outros mediadores inflamatórios no câncer de mama. A pesquisa nessa área oferece um campo fértil para inovação na terapia do câncer de mama e o objetivo é contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na malignidade tumoral, especialmente no contexto de tumores triplo-negativos, e identificar possíveis alvos terapêuticos específicos para o câncer de mama.

3 HIPÓTESES

3.1 CAPÍTULO 1

A proteína p53 mutante com ganho-de-função desempenha um papel crucial na promoção da ativação de vias inflamatórias e processos de malignidade em células de câncer de mama triplo-negativo. Acredita-se que essas mutações específicas de p53 estejam associadas a expressão de mediadores inflamatórios no secretoma tumoral, como a IL-8/CXCL8 e outros, levando a uma maior complexidade do microambiente tumoral.

3.2 CAPÍTULO 2

A interleucina-8 (IL-8) desempenha um papel crucial na malignidade tumoral e na progressão do câncer de mama, e a expressão aumentada da IL-8 no microambiente tumoral de tumores triplo-negativos está associada a um perfil de agressividade tumoral.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL: CAPÍTULO 1

Avaliar o papel da mutação da proteína p53 em parâmetros de malignidade tumoral de linhagens celulares de câncer de mama e seu papel na produção de IL-8 e outros mediadores inflamatórios do secretoma tumoral.

4.1.1 Objetivos específicos

- Investigar o impacto das mutações nos resíduos R280K e V157F da proteína p53 em linhagens celulares de câncer de mama, através da análise da proliferação, migração, invasão celular e resposta ao dano no DNA, após a depleção da *TP53* mutante;
- Quantificar os níveis de IL-8, IL-6, CXCL2, MMP1 e PGE2 no sobrenadante de linhagens celulares de câncer de mama, tanto em condições basais quanto após a depleção da *TP53* mutante;
- Avaliar a interação entre as vias de sinalização ERK1/2 MAPK e p53 mutante na secreção de IL-8, IL-6, CXCL2, MMP1 e PGE2, após a depleção da *TP53* mutante inibição da via ERK1/2 MAPK;
- Investigar o efeito da depleção da *TP53* mutante e da inibição da via ERK1/2 MAPK sobre parâmetros de malignidade tumoral, como proliferação, migração e invasão celular;
- Avaliar o efeito da depleção dos fatores de transcrição p65 e RelB, bem como o tratamento com inibidor farmacológico de NFkB;
- Quantificar o imunoconteúdo basal dos fatores de transcrição p65 e RelB e das proteínas ERK1/2 em um painel de linhagens de câncer de mama.
- Investigar a interação da proteína p53 mutante com os complexos de NFkB no citoplasma e no núcleo celular;
- Avaliar o efeito da depleção da *TP53* mutante na atividade transcricional de NFkB.

4.2 OBJETIVO GERAL: CAPÍTULO 2

Realizar uma caracterização abrangente do perfil de expressão da Interleucina-8 (IL-8) no câncer de mama, explorando seu papel funcional em diferentes subtipos moleculares e histológicos da doença.

4.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de expressão de *CXCL8* em bancos de dados de tecidos normais (GTEx), tumores (TCGA) e linhagens celulares (CCLE);
- Avaliar o nível de marcação de IL-8 em Tissue MicroArray de tumores mamários por Imuno-histoquímica (IHC);
- Correlacionar a expressão de IL-8 e seu mRNA com a expressão do receptor de estrogênio, receptor de progesterona, estágio tumoral, diagnóstico patológico e subtipos moleculares de câncer de mama em amostras de tumores mamários (Tissue MicroArray e TCGA);
- Analisar o perfil mutacional e enriquecimento de vias de amostras com expressão elevada de *CXCL8*;
- Identificar se as linhagens celulares de câncer de mama e/ou o microambiente tumoral expressam *CXCL8* por análise *Single-cell*;
- Compreender a função da IL-8 em linhagens celulares de câncer de mama através da análise da proliferação, migração, invasão celular e formação de colônias após a depleção de *CXCL8* por siRNA e inibição farmacológica por SB225002;

5 DESENVOLVIMENTO

5.1 CAPÍTULO 1 - MUTANT P53 AND ERK1/2 MAPK COOPERATE WITH THE PRODUCTION OF TNBC INFLAMMATORY SECRETOME

¹Raquel Nascimento das Neves; ²Alexander James Roy Bishop; ^{1,2}Alfeu Zanotto-Filho

¹Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

² Greehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

Abstract

TP53 is the most commonly mutated gene in human cancer, with a particularly high occurrence of mutations in the triple-negative breast cancer (TNBC) subtype, affecting 80% of patients. In TNBC, *TP53* mutations not only lead to the loss of typical p53 functions but can also result in gain-of-function (GOF) mutations that activate various cellular mechanisms involved in tumor malignancy. In this study, we investigate the role of *TP53* GOF mutations and its impact on inflammatory response in TNBC cell lines. We found that the absence of p53 did not significantly affect cell viability. However, knockdown of *TP53* GOF mutations made the cells susceptible to treatment with MMS and cisplatin. The invasion assay revealed that depleting *TP53* GOF mutations reduced the invasiveness potential of TNBC cells, which was further supported by decreased cell migration. Moreover, *TP53* GOF mutations knockdown led to a decrease in the expression of several pro-inflammatory cytokines, including IL-8, IL-6, and CXCL2, while it did not affect other mediators known to be involved in breast cancer malignancy, such as PGE2 and MMP1. The latter were upregulated via ERK1/2 MAPK signaling pathway. This was confirmed in TNBC cells treated with the MEK1/2 inhibitors UO126 and sorafenib, which showed a decrease in IL-8 and CXCL2, as well as PGE2 and MMP1 production. Furthermore, combining *TP53* GOF mutations knockdown with MEK/ERK1/2 pathway inhibition resulted in a more pronounced inhibition of IL-8 and IL-6 and decreased cell invasion and migration compared to each treatment alone. Interestingly, *TP53* GOF mutations knockdown did not affect the phosphorylation status of MEK/ERK1/2 or NFκB complexes, nor did UO126 and sorafenib treatment and NFκB knockdown alter p53 immunoccontent. However, *TP53* GOF mutations knockdown decrease NFκB activity in the gene reporter assay. These findings indicate that *TP53* GOF mutations collaborates with the ERK1/2MAPK pathway to promote the inflammatory secretome, and can regulate the NFκB activity in the nucleus in TNBC cell models.

Keywords: Triple-negative breast cancer; p53 gain-of-function; tumor secretome; inflammation; ERK1/2 MAPK; pathway cooperation

Introduction

Breast cancer is the world's most prevalent cancer affecting women worldwide, leading to 2.3 million women diagnosed with breast cancer and 685,000 deaths globally in 2020 (SUNG *et al.*, 2021). Breast tumors display cellular and molecular heterogeneity, including receptor status, such as tumors with a positive expression for estrogen receptors (ER-positive), tumors with ERBB2 / HER2 amplification (Her2 positive), and triple-negative breast tumors (TNBC), which lack the expression of estrogen receptor α , progesterone receptor and HER2 (CURTIS *et al.*, 2012). Recent gene-expression profiling analyses identified five molecular subtypes, known as intrinsic subtypes, such as luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, and claudin-low (POMMIER *et al.*, 2020).

Breast cancer therapy has benefited from numerous advances in recent decades. Tumors with positive expression for estrogen receptors (ER-positive) - which correspond to 65-80% of diagnoses, depending on the studied cohort are treated with the anti-estrogen tamoxifen and have a favorable prognosis, especially when associated with low staging. Tumors with ERBB2/HER2 amplification (Her2 positive) improved their prognosis by using the monoclonal antibody Herceptin (WILSON *et al.*, 2017). On the other hand, breast tumors known as triple-negative, in addition to constituting the most invasive and metastatic tumor phenotype, lack identification of molecular targets with pharmacological potential (KWON *et al.*, 2017). Therefore, different factors interfere with breast cancer development and therapeutic processes and TNBC is still a major challenge in breast cancer clinics, therefore, the need to characterize new signaling pathways of this type of tumor therapy provides us with a fertile field of study and innovation in tumor therapy.

Another factor involved in breast cancer malignancy is the presence of genetic alterations. These molecular alterations are one of the earliest events that affect a large number of genes and may provide the initial oncogenic potential and help trigger clonal expansion of imminent breast cancer cells (HANAHAN; WEINBERG, 2011b). Among these genes, *ESR1*, *NF1* and *TP53* were revealed to be enriched in patients with metastatic breast cancer (MBC) compared with those in primary breast cancer (PBC) (CHA; LEE; WON, 2021). Among the potential targets for the therapy of TNBC is the tumor suppressor gene *TP53*, which encodes a multidomain phosphoprotein with 393 amino acids (BIANCHINI *et al.*, 2022) that acts as a transcription factor regulating several cellular processes to suppress tumor growth,

being essential for the process of cellular response to DNA damage (LIU *et al.*, 2016).

TP53 gene mutation is frequently found in malignant tumors, occurring in 30% of cases of breast tumors, regardless of subtype (YUE *et al.*, 2017). When breast tumors were sequenced and separated by molecular subtypes, it was observed that 80% of p53 mutations were concentrated in triple-negative/basal-like tumors, precisely the most aggressive subtype (CURTIS *et al.*, 2012). The most common mutations in human tumors are *missense* mutations (>70%), characterized by an amino acid exchange at a specific codon that leads to the synthesis of a stable mutant protein that accumulates in the nucleus of tumor cells (BROSH; ROTTER, 2009). Of these mutations, approximately 80% are clustered in the regions of the *TP53* gene that encode the DNA-binding domain, with several recurrent hotspot mutations observed. These mutations differ considerably in the shape and function of the translated protein, and affect amino acid residues that interact with DNA (i.e., R273H and R248Q mutations), or affect protein conformation (i.e., R175H and R249S), which indirectly also affects the ability to bind DNA (SABAPATHY; LANE, 2018c).

These proteins, in addition to losing the characteristic of tumor suppressor (classical loss of function), activate new oncogenic characteristics and promote the survival of tumor cells through cellular responses that are not associated with normal wild-type p53 functions, activating transcription factors and survival signaling cascades such as NFκB, proteasome, integrins and stimulation of the Warburg effect, contributing to increased angiogenesis, genomic instability, metastasis and metabolic changes, features that have been named as “p53 gain-of-function” (GOF) (LIU; ZHANG; FENG, 2014b). The study of the impacts of p53 GOF on tumor malignancy is quite recent. The various p53 mutations can activate different cellular mechanisms, such as inflammation in tumors, mainly through increased activation of NFκB, which regulates the transcription of inflammatory mediators (BARABUTIS; SCHALLY; SIEJKA, 2018). These molecules induce cells with mutations in the p53 protein show high expression of cytokines, which are directly involved in tumor progression, angiogenesis and metastasis (BELLAZZO; DI MININ; COLLAVIN, 2015).

In the last decade, the role of inflammatory mediators in the tumor microenvironment has been recognized as an important component. Inflammation is

important in the tumor promotion, metastatic progression, and immune evasion of tumor cells (ZHAO *et al.*, 2021). Initially, it was believed that such mediators were secreted only by immune cells that infiltrate tumors, however, today the understanding is that both tumor cells, stroma, and intratumoral immune cells are capable of secreting interleukins, chemokines, and prostaglandins, acting in paracrine signaling between different cell types in the tumor (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Considering the diversity of p53 GOF mutants, the type of mutation and its functional impact on tumor biology have been critical parameters in the search for drugs targeting individual mutations (SABAPATHY; LANE, 2018c). Although there is growing knowledge about the importance of the microenvironment and tumor metabolism, little progress has been made regarding its modulation to treat tumor processes. The understanding of the mechanisms involved in the promotion of tumor inflammation and the modulation of metabolic pathways in triple-negative breast tumors with different mutations in the p53 protein are important initial steps to direct the search for therapeutic strategies based on p53 mutants as a target. Therefore, here we explore the involvement of mutant p53 and contribution of other pathways in controlling cancer cells secretome, which can apply far beyond the context of breast cancer, given the vast frequency of p53 mutations in different tumor types.

Materials and methods

Cell culture and treatment

MDA-MB231, MCF7, Hs578T, BT474, SKBR3, and MDA-MB436 breast cancer cell lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection). Cell lines were grown in DMEM or RPMI culture media, supplemented with 10% inactivated FBS plus 1% of the antibiotic solution. Methyl Methanesulfonate (MMS) was from Sigma-Aldrich, and stored at -20° C. Sorafenib (from Santa Cruz Biotechnology) and UO126 (from Sigma-Aldrich) stock solutions were prepared in DMSO at 50 and 20 mM, respectively, and Cisplatin (Sigma-Aldrich) was prepared in ultrapure water at 8 mM and stored at 20°C.

Cell viability

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay was used to estimate cell viability changes caused by treatments and siRNA knockdown. Cells were seeded in 96-well plates and after 24h subjected to siRNA transfection for 24h. Cells were treated with MMS, Cisplatin, Sorafenib, or UO126 and after 72h the culture medium was removed, 100 μ L of MTT (0.5 mg / mL) was added to each well, incubated in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37° C for 30 minutes, and then formazan crystals were dissolved in 100 μ L of DMSO. The plate was shaken and read at 560-630 nm (A560-A630) (Multireader Infinite M200 Tecan). Data were expressed as a percentage (%) of cell viability compared to DMSO vehicle-treated controls.

siRNA-mediated knockdown

Small-interference RNA (siRNA) transfections were performed using Lipofectamine RNAi MAX Reagent following manufacturer instructions (Invitrogen). siRNA duplexes targeting human p53 #1 (#sc-29435), p53 #2 (#AM16708), and scrambled siRNA (#AM4611) were purchased from Santa Cruz Biotechnology and Ambion and incubated at 25-100 nM siRNA range for 24 h before treatments. Knockdown efficiency was confirmed by Western Blot.

Wound closure assay

MDA-MB231 cells were seeded into 24-well plates and after cells reached ~90% confluence FBS was reduced to 2% (overnight). The cell monolayers were then scratched with a 200 μ L pipette tip to create a wound, washed twice with PBS 1x to remove floating cells, and then incubated in DMEM with 2% FBS plus treatments. In p53 knockdown cells and scrambled control, 48 h siRNA transfection was carried out before wounds were performed. The healing was monitored at 0 and 24 h using a phase-contrast microscope (Olympus IX83) set at 100 \times magnification. The wound area pre- and post-treatment was quantified using ImageJ software and expressed as percentage wound closure. Complete serum starvation was not used due to the loss of MDA-MB231 cell viability following 24 h starvation.

Invasion assay

Cell lines and p53 siRNA knockdown effect on extracellular matrix (ECM) invasion potential of breast cancer cells was assessed using the QCM ECMatrix Cell Invasion Assay (ECM-554; Merck Millipore). Briefly, serum-free cells were trypsinized, centrifuged, and 250,000 cells in 50 μ L of this suspension were seeded onto 8 μ m pore size inserts coated with ECM. Then, 200 μ L of fresh medium was carefully added to the top chambers. In experiments with siRNA, p53-depleted cells and scrambled controls were maintained for 48 h post-transfection to allow efficient knockdown before trypsinization and seeding into transwell chambers. The bottom chambers consisted of DMEM supplemented with 20% FBS as a chemoattractant. Cells were allowed to invade for 24-48 h at 37 °C before assaying. Invaded cells were detached from the bottom side of the insert, lysed, and developed with CyQuant GR fluorescent dye for 15 min. Fluorescence was read at Ex/Em = 480/520 nm. The percentage of invading cells was compared to cell number standard curves.

Western blot

Protein lysates were prepared using Laemmli sample buffer 5x (TRIS 1,5M pH 6,8, SDS, glycerol, and bromophenol blue) with the addition of 10% of 2-mercaptoethanol to the buffer before mixing with the samples. Proteins were boiled for 5 minutes at 100°C for protein denaturation and separated by 10% SDS-PAGE (Mini-Protean, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and electro-transferred onto nitrocellulose membranes using a semidry system (Hoefer TE77, Amersham, Holliston, MA, USA). Membranes were stained with Ponceau S for loading control, rinsed, and blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20) for 1 h at room temperature. Primary antibodies included p-ERK1/2^{Thr202/Tyr204} (#4370), ERK1/2 (#9102), p-MEK1/2^{Ser217/221} (#3958), MEK1/2 (#4694), p53 (#9282) and β -Actin (D6A8) (#8457), were from Cell Signaling Technology and used at 1:1000 dilution (incubated overnight at 4°C). Secondary Antibody Conjugated to HRP included anti-rabbit or anti-mouse IgG (#70740) were also from Cell Signaling Technology and were used at 1:3000 dilution (incubated 2 h at room temperature) in TBS-T with 5% BSA. Protein bands were captured using LumiGlo chemiluminescent substrate (from Cell Signaling Technology #7003S) and ChemiDoc MP (Bio-Rad). ImageJ software was used to quantify protein bands, and protein immunocontent

was expressed as fold-change compared to the average band intensity of the control group per gel and pooled for statistical comparison.

ELISA and CBA

Quantification of IL-8, IL-6, CXCL2, MMP1, and PGE2 content in culture medium was assessed after 12-48 h of incubation using commercially available kits: Human IL-8 ELISA kit (Invitrogen, #KHC0081); Human IL-6 ELISA kit (Invitrogen, #BMS213-2); Human MIP2 ELISA Kit (CXCL2) (ab184862); RayBio-MMP1 Elisa Kit (RayBiotech, Inc); and Prostaglandin E2 EIA Kit Monoclonal (Cayman Chemical Company), respectively. Culture media were diluted up to 50 times as appropriate for each target and concentration values were normalized by 10^6 cells. IL-8 and IL-6 were also measured using the Cytometric Beads Array (CBA) (BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit, BD Biosciences; San Jose, CA, USA; cat #552364). Briefly, 25 μ L of capture beads mix were incubated with 50 μ L samples and 25 μ L PE detection reagent. The samples were incubated at room temperature for 2 h in the dark, washed, and centrifuged at $200\times g$ for 5 min per manufacturer's protocol. The supernatant was aspirated, and the beads re-suspended with 1 \times wash buffer. Fluorescence was read in a BD FACSCanto II (BD Biosciences) and calculated using the FCAP Array software v3.0 (BD Biosciences) using kit-provided standard curves as a reference. The samples were diluted 20x, and cytokine concentrations in 24 h cultures were expressed as ng/g adipose tissue per well.

Gene reporter assay

Prior to transfection, cells were cultured in 96-well plates and allowed to grow until they reached approximately 80% confluence. Once the cells were ready, we proceeded with the transfection process. To assess the influence of NF κ B-responsive firefly luciferase constructs, cells were transfected with a combination of these constructs from Stratagene, mixed in a 40:1 ratio with a constitutive CMV-Renilla luciferase construct from Qiagen. As negative controls, it was used mixtures of non-inducible firefly luciferase constructs combined with constitutively expressing Renilla luciferase constructs in the same 40:1 ratio. After a 24-hour period of transfection, cells were submitted to p53 siRNA knockdown and treated with either sorafenib or UO126 for 6 hours. Following these treatments, the activities of firefly

and renilla luciferases were measured using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System protocol from Promega. The results were expressed as fold-change by comparing firefly luciferase activity to the levels of renilla luciferase.

Immunofluorescence

MDA-MB231 cells were seeded in 24-well plate with coverslips and after cells reached ~90% confluence p53 siRNA knockdown was performed. TNF (1µg/mL) treatment was made for 30 minutes and then cells were fixed in paraformaldehyde 4% for 1 h at 4° C. The proteins were blocked in 5% BSA in TBS-T for 1 h, and then incubated with NFkB p65 (D14E12) antibody from Cell Signaling Technology used at 1:500 dilution in TBS-T with 5% BSA, for 2 h at 4° C. The coverslips were rinsed thoroughly with PBS 1x and incubated with HRP included anti-rabbit IgG (#70740) were also from Cell Signaling Technology and were used at 1:3000 dilution in TBS-T with 5% BSA, incubated 2 h at room temperature. For nuclear observations, the cells were stained with DAPI (1 µg/ml) for 15 min at room temperature and washed again with PBS 1x. The coverslips were then mounted on slides using Permount Mounting Medium. Three fields per sample were photographed at 200x in microscope (Olympus BX41, Japan).

Results

Mutant p53 role in cell proliferation, invasion, migration, and response to cellular damage in triple-negative breast cancer cells

To evaluate the role of *TP53* GOF mutation in cell proliferation, it was performed a knockdown with two different small interfering RNA (siRNA) duplexes targeting the *TP53* gene in MDA-MB231 and Hs578t cells, which are triple-negative/basal-like breast cancer cell lines, and in MCF-7, a luminal breast cancer cell line, which harbors the wild-type p53. The knockdown was confirmed by Western Blot, and as expected, loss of *TP53* by siRNA #1 depletion did not significantly impact the cell viability of these cell lines in the MTT assay compared with non-silenced cells. However, siRNA #2 showed a little, but significant reduction in cell viability (Figure 1A).

Interestingly, cell invasion, measured by the transwell assay, demonstrated that triple-negative/basal-like breast cancer cell lines such as MDA-MB231, Hs578t, and MDA-MB436 have an invasive phenotype when compared with BT4T4 and SKBR3 (HER2+) and MCF-7 (Luminal A), which did not migrate through the transwell chamber even after exposure to MDA-MB231 conditional media (Figure 2B). Furthermore, mutant p53 depletion decreased the invasiveness potential of MDA-MB231 and Hs578t cells after 24 h incubation (Figure 1B). This result was substantiated with wound closure assay, where we observed that MCF7 presented low migration potential when compared with MDA-MB231, and we also observed a decreased migration of MDA-MB231 p53 depleted cells in 24 h (Figure 1C). Additionally, mutant p53 knockdown made MDA-MB231 and Hs578T cells more susceptible to treatment with a genotoxic alkylating agent such as methyl-methane sulfonate (MMS) at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and Cisplatin at 40-60 μM at the MTT assay, while both treatments alone did not show such aggressive cytotoxicity (Figure 1D).

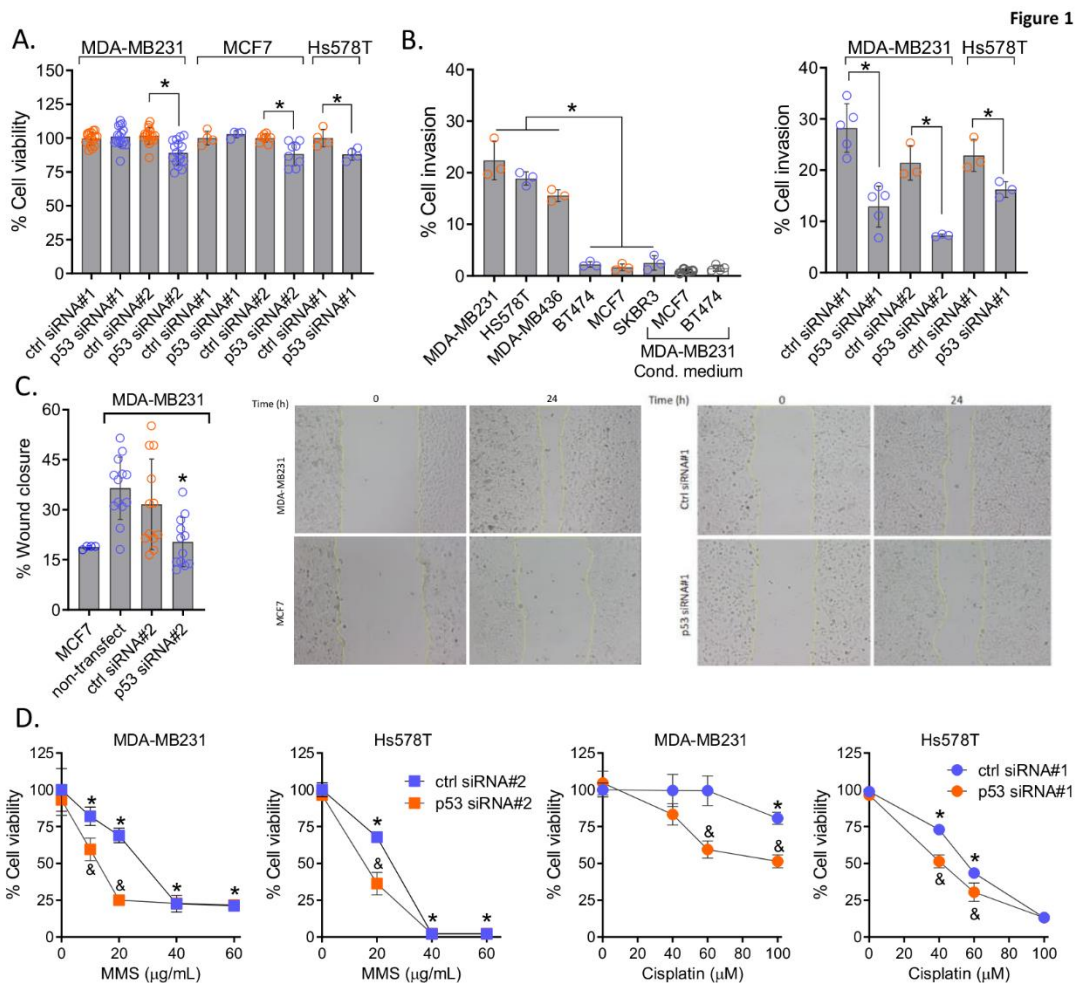


Figure 1. Mutant p53 role in cell proliferation, invasion, migration, and response to cellular damage in TBNC cells. (A) siRNA knockdown effect in MCF-7, MDA-MB231 and Hs578T breast

cancer cell lines proliferation. **(B)** Transwell assays of breast cancer cell lines panel, and showing the impact of p53 knockdown upon cell invasion in MDA-MB231 and Hs578T cells. **(C)** Wound closure assay of MCF7, MDA-MB231 and Hs578T cells and showing the impact of p53 knockdown upon cell migration **(D)** Effect of differing concentrations of MMS and Cisplatin alone or combined with p53 knockdown in MDA-MB231 and Hs578T cells after 72 h treatment as determined by MTT assay. Legends: Sfrn (Sorafenib); siRNA#1 - Santa Cruz Biotechnology, siRNA#2 – Ambion; * different from untreated/control or at indicated comparisons. & Different from untreated/control and treatment plus ctrl siRNA at same concentration. (2-way-ANOVA- Bonferroni for “A” and “D”; 1-way-ANOVA-Tukey for “B” and “C”; $p < 0.05$).

Mutant p53 regulates pro-inflammatory cytokines production

ELISA assay of breast cancer cells panel showed high levels of IL-8, IL-6, CXCL2, and MMP1 as determined in triple-negative/basal-like cell lines culture media, MDA-MB231, Hs578T, and MDA-MB436 (Figure 2A) when compared with BT4T4 and SKBR3 (HER2+) and MCF-7 (Luminal A). We analyze the expression of several constitutively expressed pro-inflammatory components known to be involved in breast cancer cells malignancy. We observed that MDA-MB231 expresses high levels of IL-8, IL-6, MMP1, CXCL2, and PGE2 (Figure 2B). Thus, we analyze the culture media of MDA-MB231 and Hs578t cells transfected with two sequences of siRNA targeting mutant p53, and we observed mutant p53 knockdown decreased the expression of IL-8 (Figure 2C), IL-6 (Figure 2D), and CXCL2 (Figure 2E), even after treatment with MMS 10 $\mu\text{g/mL}$, but not PGE2 (Figure 2F) and MMP1 (Figure 2G), which were not affected by p53 knockdown.

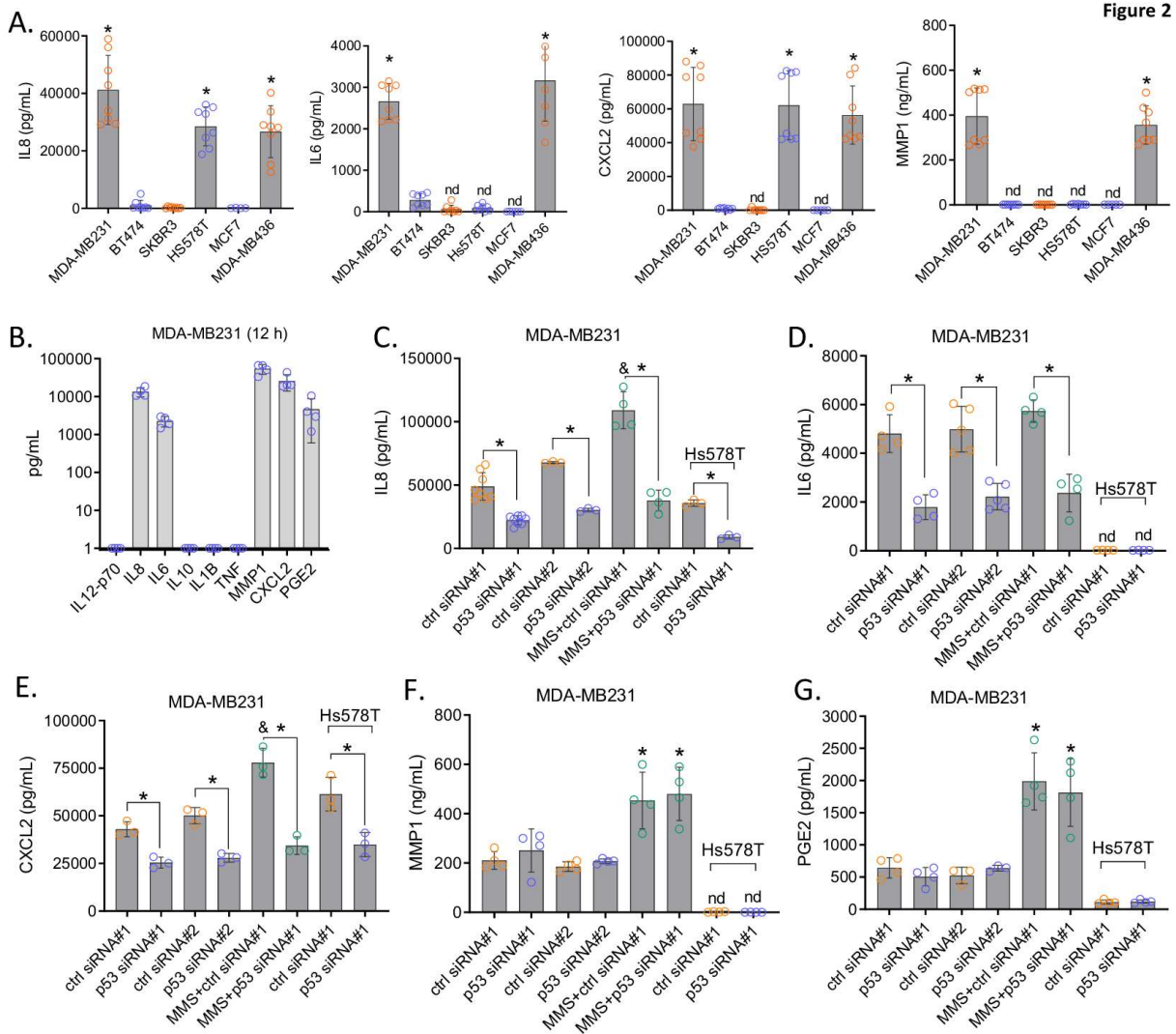


Figure 2. Mutant p53 regulates pro-inflammatory cytokines production. (A) ELISA assays showing basal IL-8, IL-6, CXCL2 and MMP1 levels as determined in the culture medium of breast cancer cell lines panel after 12 h treatment. **(B)** ELISA and CBA assays showing basal IL-12-p70, IL-8, IL-6, IL-10, IL-1B, TNF, MMP1, CXCL2 and PGE2 levels as determined in the culture medium of MDA-MB231 after 12 h treatment. **(C)** ELISA assays showing levels of IL-8 **(D)** IL-6 **(E)** CXCL2 **(F)** MMP1 and **(G)** PGE2 after MMS alone or combined with p53 knockdown in MDA-MB231 and Hs578T cells after 48 h treatment. Unless otherwise specified, MMS was used at 10 μ M. Legends: ND (not detected). Data are presented as mean \pm SD. * different from untreated controls; & different from control and from MMS-treated cells (1-way-ANOVA-Tukey; $p < 0.05$).

Concomitant inhibition of TP53 GOF mutant and MEK/ERK1/2 pathways reduced malignant phenotypes in TNBC cell models

Given triple-negative cells such as MDA-MB231, and Hs578T display higher levels of phosphorylated ERK1/2 (Figure 3B), we treated cells with MEK1/2 inhibitor UO126 and Sorafenib, at 15 μ M and 10 μ M, respectively, which decreased the PGE2, MMP1, IL-6, and IL-8 levels. Furthermore, combined mutant p53 knockdown with MEK/ERK1/2 pathway inhibition caused a more pronounced IL-8 and IL-6 inhibition when compared to either p53 knockdown or UO126/sorafenib alone,

whereas MMP1 and PGE2 levels were only reduced by MEK/ERK1/2 inhibitor treatments (Figure 3A). Interestingly, through Western Blot analysis, we observed the effect of UO126 and Sorafenib on decreasing p-ERK and p-MEK immunoccontent, however, neither mutant p53 knockdown impacted ERK1/2 and MEK1/2 phosphorylation status nor did UO126/sorafenib alter mutant p53 immunoccontent (Figure 3B). Functional cell assays showed that concomitant inhibition of mutant p53 and MEK/ERK1/2 pathways with UO126 at 15 μ M and Sorafenib at 10 μ M reduce MDA-MB231 and Hs578T cell proliferation (Figure 3C). The decrease in invasion potential was also observed in MDA-MB231 cells (Figure 3D), sustained by reduced migration potential in the wound closure assay (Figure 3E), indicating that *TP53* GOF mutation cooperates with the ERK1/2 MAPK signaling pathway to promote secretome production and malignant phenotypes in TNBC cells.

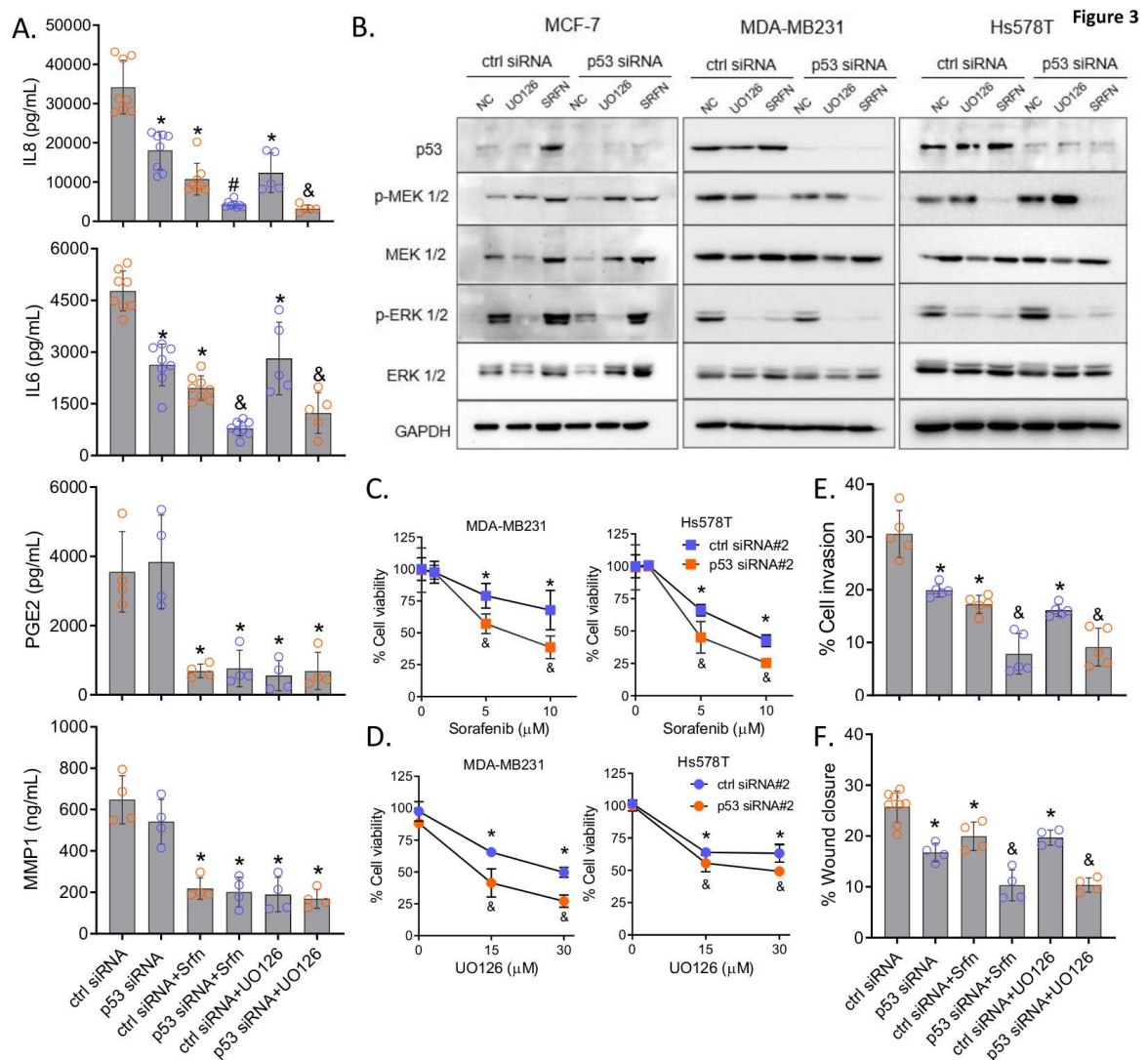


Figure 3. Concomitant inhibition of *TP53* GOF mutation and MEK/ERK1/2 pathways reduced malignant phenotypes in TNBC cells. (A) ELISA assays showing IL-8, IL-6, MMP1, CXCL2 and PGE2 levels as determined in the culture medium of MDA-MB231 after p53 knockdown and Sorafenib

and UO126 treatment. **(B)** Western Blot of p53, p-MEK, MEK, p-ERK, ERK, GAPDH immunocontent after p53 knockdown and Sorafenib and UO126 treatment. **(C)** Effect of differing concentrations of Sorafenib and **(D)** UO126 alone or combined with p53 knockdown in MDA-MB231 and Hs578T cells after 72 h treatment as determined by MTT assay. **(E)** Transwell assays showing the impact Sorafenib and UO126 alone or combined with p53 knockdown upon cell invasion in MDA-MB231. **(F)** Wound closure assay showing the impact of Sorafenib and UO126 alone or combined with p53 knockdown upon cell migration. Legends: Srfn (Sorafenib); siRNA#2 – Ambion; * different from untreated/control or at indicated comparisons. & Different from untreated/control and treatment plus ctrl siRNA at same concentration. (1-way-ANOVA-Tukey for “A”, “E” and “F”; 2-way-ANOVA-Bonferroni for “C” and “D”; $p < 0.05$).

TP53 GOF mutation decrease NFκB activity in TNBC cells

To investigate the role of NFκB in TNBC cell models harboring *TP53* GOF mutations, we assessed cell viability using MTT assay after siRNA-mediated knockdown of NFκB complexes and treatment with the κB kinase (IKK) inhibitor, BAY 11-7082. In MDA-MB231 cells, NFκB depletion did not significantly impact cell viability, while in Hs578T cells, a significant reduction was observed after 72 hours (Figure 4A). Moreover, treatment with BAY 11-7082 affected MDA-MB231 cell viability, especially at concentrations of 15 μM (Figure 4B). To investigate whether p53 knockdown could modulate NFκB activity at the protein level, we performed western blot analysis in MCF-7, MDA-MB231, and Hs578t cells. Mutant p53 knockdown did not affect the levels of p65 and RELB, and knockdown of p65 or RELB did not influence mutant p53 levels. Interestingly, inhibition of ERK1/2 MAPK with UO126 and sorafenib reduced RELB and p65 levels in Hs578t cells, suggesting a negative feedback mechanism within this pathway (Figure 4C).

To determine the nuclear translocation and activity of NFκB, we performed cell fractionation in MCF-7, MDA-MB231, and Hs578t cell extracts. Majority of NFκB immunocontent was localized in the cytoplasm, with a small amount present in the nucleus, whereas, as expected mutant p53 was accumulated in the nucleus of MDA-MB231 and Hs578T cells, when compared with wild-type p53 in MCF-7 cells (Figure 4D). Immunofluorescence analysis revealed that basal levels of p65 are mostly localized in the cytoplasm, therefore, it was not observed a reduction in p65 translocation after mutant p53 knockdown in MDA-MB231 cells, but treatment with TNFα induced its nuclear localization, thereby indicating that non-canonical pathway is responsive in the MDA-MB231 cell line (Figure 4E). Moreover, knockdown of the p65 significantly decreased the levels of IL-8, IL-6, and CXCL2 in the ELISA assay (Figure 4G). By western blotting, we observed elevated levels of ERK and MEK in MDA-MB231 and HS578t cells compared to MCF-7 cells. Interestingly, knockdown of

p65 and RELB could modulate the expression of these proteins, suggesting a regulatory role of NF κ B in the ERK1/2 MAPK pathway (Figure 4F). To determine if mutant p53 can modulate the NF κ B gene activity, we performed a reporter gene luciferase assay, and it was observed that p53 mutant depletion reduced the NF κ B activity. NF κ B inhibition was also triggered by UO126 and Sorafenib treatment, supporting that this is also a MEK1/2-ERK1/2 dependent activity (Figure 4H).

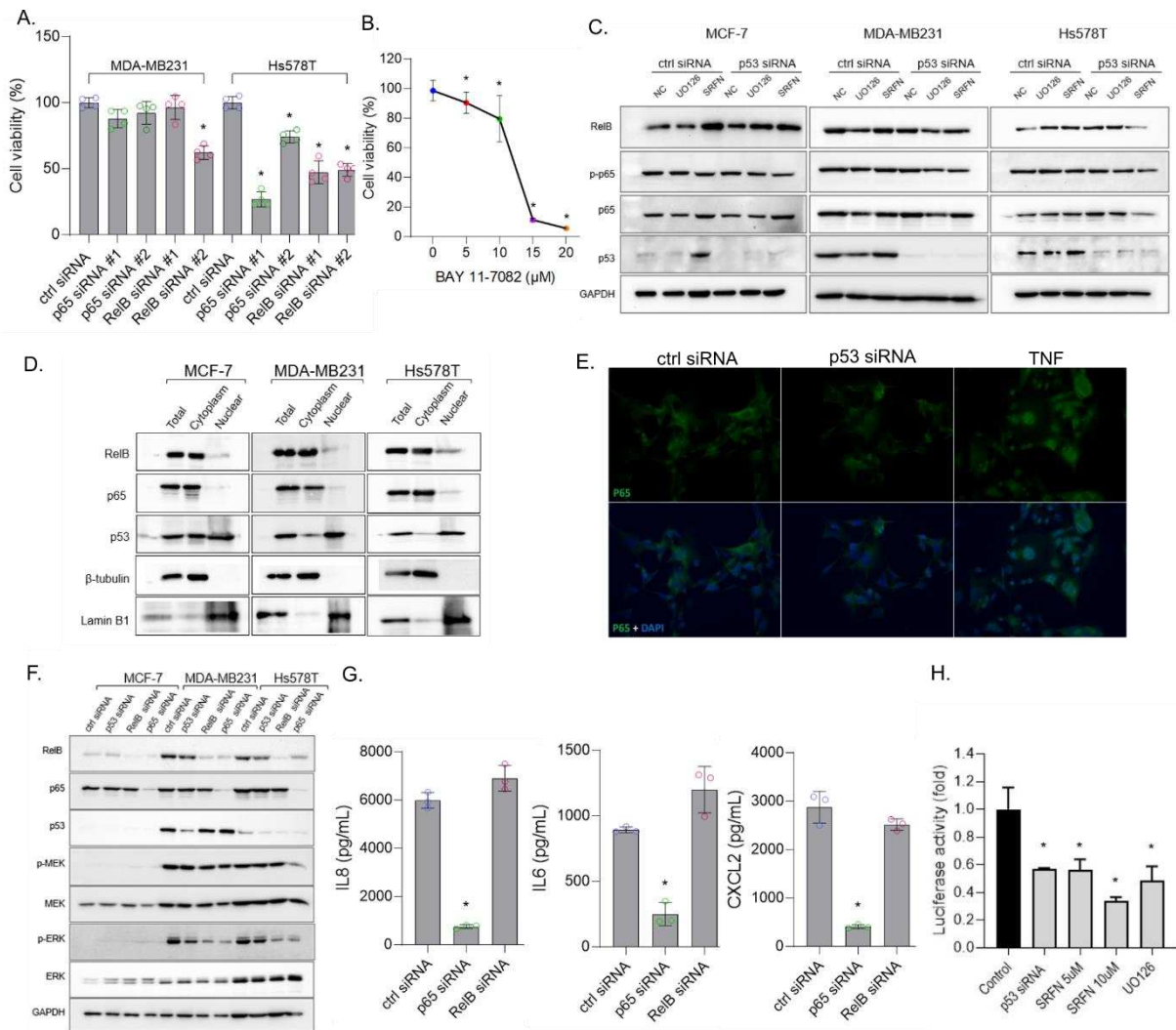


Figure 4. TP53 GOF mutation decreases NF κ B activity in TNBC cells. (A) siRNA knockdown effect in MDA-MB231 and Hs578T breast cancer cell lines proliferation; (B) Effect of differing concentrations of BAY 11-7082 in MDA-MB231 cells after 72 h treatment as determined by MTT assay; (C) Western Blot of RelB, p-p65, p65, p53 and GAPDH immunocontent after p53 knockdown and Sorafenib and UO126 treatment in MCF-7, MDA-MB231 and Hs578T cells; (D) Western Blot of basal RelB, p65, p53, β -tubulin and Lamin B1 immunocontent after cell fractionation; (E) Immunofluorescence with p65 antibody and DAPI (nuclei) after p53 knockdown and TNF treatment; (F) Western Blot of RelB, p65, p53, p-MEK, MEK, p-ERK, ERK and GAPDH immunocontent after p53, p65 and RelB knockdown in MCF-7, MDA-MB231 and Hs578T cells; (G) ELISA assays showing levels of IL-8, IL-6 and CXCL2 after p65 and RelB knockdown in MDA-MB231 cells after 48 h treatment; (H) Luciferase activity after p53 knockdown and UO126 and sorafenib treatment in MDA-MB231 cells determined by gene reporter assay. (1-way-ANOVA-Dunnet; $p < 0.05$).

Discussion

With the advent of large-scale screening of cancer genomes, hundreds of gene changes in tumors have been identified, clearly revealing that cancer is a complex disease caused by genetic and epigenetic changes in multiple genes (GU *et al.*, 2013). The behavior and status of p53 are fundamental for cancer development, progression, and the fate of many cancer patients because p53 plays many important roles in cancer and is considered a master regulator of intracellular functions (ALVARADO-ORTIZ *et al.*, 2021). Initially, we evaluate the role of p53 in triple-negative human breast cancer cells expressing mutant p53: MDA-MB231 and Hs578T. These cell lines express mutants with gain-of-function activities, MDA-MB231 and Hs578T cells harbors a p53 *missense* mutation in the residue R280K and V157F, respectively, both described to be associated with the tumor microenvironment and tumor inflammation, in triple-negative breast cancer through DAB2IP interaction and in non-small cell lung cancer exome release through miR-1246 (STEIN; ROTTER; ALONI-GRINSTEIN, 2019). In this study, we demonstrated that in breast cancer cells, the depletion of p53 mutant protein does not have major effects upon cell viability, but it can change the malignancy phenotypes such as invasion, migration, and response to DNA damage caused by MMS and cisplatin. These results are supported by studies showing that the R280K mutation can promote invasion and metastasis through protein and transcriptional targets interactions, such as KLF17 in invasive breast carcinoma cells (ALI; SHAH; AHMAD, 2014), and Pin1 in a mutant p53 mouse model and triple-negative breast cancer cells (GIRARDINI *et al.*, 2011).

Tumor progression is generally associated with immune system evasion, and loss-of-canonical function of wild-type *TP53* is a crucial point for the generation of an inflammatory microenvironment that benefits cancer cells (BLAGIH; BUCK; VOUSDEN, 2020). Among the pro-inflammatory cytokines expressed in tumor cells with *TP53* mutations are those which recruit leukocytes, such as macrophages, neutrophils, dendritic cells, and lymphocytes. For instance, IL-8 has been found to promote the proliferation of breast cancer cells (MOREIN; ERLICHMAN; BEN-BARUCH, 2020), CXCL2 was described as an important mediator of tumor growth (SHARON *et al.*, 2015), and high IL-6 serum and tumor levels have been associated with aggressiveness and poor outcome in patients (JIANG *et al.*, 2017). It has been described that expression of *CXCL5*, *CXCL8*, and *CXCL12* was elevated in cells

expressing oncogenic p53, and short hairpin RNA knockdown of mutant p53 in lung cancer cells, and MDA-MB-231 cells reduced the expression of several key targets, including several chemokines and other inflammatory mediators (YEUDALL *et al.*, 2012). In this manner, we evaluate the expression of proteins such as IL-8, IL-6, CXCL2, PGE2, and MMP1 whose constitutive expression is associated with the aggressive basal-like/triple-negative phenotype of breast cancer. After *TP53* GOF mutation knockdown, we observed that *TP53* depletion decreases the expression of IL-8, IL-6, and CXCL2 in MDA-MB231 cells, and IL-8 and CXCL2 in Hs578t cells, but did not affect PGE2 and MMP1 expression in both cell lines. This indicates that there are other mechanisms contributing to inflammatory secretome production in these breast cancer cells. In this manner, identifying and characterizing signaling pathways dictating these phenotypes will help to find new targets for triple-negative breast cancer treatment.

Individual tumors often have multiple functional changes affecting more than one pathway. Signaling pathways are altered somatically in cancer at varying frequencies and in varying combinations in different organs and tissues, indicative of complex interaction and pathway crosstalk (SANCHEZ-VEGA *et al.*, 2018). Understanding the extent, detailed mechanisms, and co-occurrence of oncogenic changes in these pathways is critical for the development of new therapeutic approaches (MITTAL *et al.*, 2009). Triple-negative breast cancer cells, such as MDA-MB231 and Hs578T, exhibit elevated levels of phosphorylated ERK1/2 and increased activity of KRAS/RAF1 compared to other breast cancer cell types, like MCF7 (Figure 3B). These differences are likely due to specific mutations in MDA-MB231, where KRAS carries the G13D mutation and *B-RAF* carries the G464V mutation, and in Hs578T, where the *HRAS* gene is mutated (KRAUS; YUASA; AARONSON, 1984). To address this, we employed two inhibitors in combination with *TP53* knockdown: UO126, a selective inhibitor of MEK1/2, and Sorafenib, a multi-kinase inhibitor that targets B-RAF (including the oncogenic V600E variant), CRAF, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-b, FLT-3, and c-KIT (FAVATA *et al.*, 1998; ZAFRAKAS; PAPASOZOMENOU; EMMANOUILIDES, 2016). By inhibiting the MEK/ERK1/2 pathway, we observed a reduction in the content of PGE2 and MMP1. Moreover, when combined with *TP53* knockdown, we observed a more pronounced inhibition of IL-8 and IL-6 compared to each treatment alone. These findings suggest that both the MEK/ERK1/2 pathway and *TP53* GOF mutation contribute to the expression of

the evaluated secretome components. Interestingly, western blot experiments revealed that neither *TP53* knockdown impacted MEK/ERK1/2 phosphorylation status nor did UO126/sorafenib alter p53 immunoccontent, indicating that these pathways independently cooperating for secretome production in our model.

It has been demonstrated that Sorafenib, an inhibitor of the RAS/MEK/ERK pathway, can reduce cell invasion in triple-negative cell models. Furthermore, the quest for novel compounds that target this pathway has shown promising results, leading to decreased cell proliferation, migration, and colony formation in MDA-MB231 and SKBR3 cells (HATZIDAKI *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2020; ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2018). Furthermore, inhibition of both signaling pathways made cells more susceptible to UO126 and Sorafenib treatment, and decreased invasion and migration potential of triple-negative breast cancer cells.

The transcription factor NF κ B plays an important role in multiple cancers (AGGARWAL; SUNG, 2011). NF κ B is known to be involved in crucial cellular processes such as cell survival, invasion, proliferation, metastasis, angiogenesis, and chemoresistance (TANIGUCHI; KARIN, 2018). To delve deeper into its role, we focused on two essential components of the NF κ B pathway: p65 and RelB. we performed knockdown experiments for p65 and RelB in MDA-MD231 and Hs578T cells. The results revealed that NF κ B depletion played a crucial role in cell survival, particularly in Hs578T cells. Furthermore, we sought to inhibit NF κ B activation by using Bay 11-7082, a chemical compound that limits NF κ B binding to DNA. As expected, we observed a similar effect in MDA-MB231 cells, confirming the importance of NF κ B in promoting cell proliferation in breast cancer cells, consistent with previous studies reporting the decreased proliferation and invasiveness of breast cancer cells upon NF κ B inhibition (SMITH; LYU; CAI, 2014).

To investigate the potential interaction between mutant p53 and p65 or RelB, we conducted western blot experiments in MCF-7, MDA-MB231, and Hs578T cells. Surprisingly, our results indicated that p53 knockdown did not have a significant impact on the immunoccontent of p65 or RelB (Figure 4C). However, it has been previously demonstrated that mutp53 exerts its influence upstream, leading to a shift in the balance between the activation of the NF κ B and ASK1/JNK pathways in response to TNF α in triple-negative cell lines. Mechanistically, a portion of mutp53 binds with DAB2IP in the cytoplasm, which interferes with the formation of TNF-induced signaling complexes responsible for activating the ASK1/JNK axis (DI MININ

et al., 2014). It is noteworthy that, under basal conditions without external stimuli, we did not observe the activation of p65 or RelB through their translocation to the nucleus after cell fractionation. Nevertheless, the protein levels detected in both Western Blot and Immunofluorescence analyses appear to be sufficient to trigger the high expression levels of pro-inflammatory cytokines observed in MDA-MB231 and Hs578T models.

Additionally, our study revealed that both MDA-MB231 and Hs578T cells exhibited elevated levels of MEK and ERK (Figure 4F). Intriguingly, upon p65 and RelB knockdown, there was a noticeable reduction in p-ERK immunoccontent. To further validate these findings, we conducted ELISA assays to quantify the levels of IL-8, IL-6, and CXCL2 cytokines. The results consistently demonstrated a significant decrease in cytokine production after p65 knockdown, supporting the notion that the cytokine production is predominantly regulated through the NF κ B canonical pathway. These findings shed light on the intricate crosstalk between NF κ B and ERK signaling cascades and emphasize the critical role of NF κ B in controlling the expression of pro-inflammatory cytokines in MDA-MB231 and Hs578T cells.

In order to explore the potential interaction between mutant p53 and NF κ B activity, we conducted a luciferase gene reporter assay. The results from this experiment revealed a significant decrease in NF κ B activity following p53 knockdown, and this effect was further augmented when cells were treated with sorafenib and UO126 (Figure 4H). Previous studies utilizing ChIP-seq, RNA-seq, and GRO-seq have already demonstrated a global overlap in the binding of p53 mutants and the master proinflammatory regulator NF κ B in colorectal cancer models. These interactions lead to alterations in enhancer and gene activation in response to chronic TNF α signaling (RAHNAMOUN *et al.*, 2017). However, it is important to note that this interaction has not yet been validated in breast cancer cells.

Conclusion

Taken together, our findings indicate that the inflammatory microenvironment generated by certain TNBC cells plays a role in promoting malignant characteristics, including invasion and migration, while also potentially affecting the response to DNA damage. Additionally, TP53 gain-of-function (GOF) mutations promote expression of inflammatory secretome components in cooperation with the ERK1/2 MAPK and NF κ B signaling pathway in TNBC cells. Understanding the mechanisms underlying

tumor promotion associated with p53 mutant gain of function is a crucial first step in guiding the search for novel therapeutic strategies and the development of targeted drugs specifically for mutant p53 in breast cancer.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance code 001.

Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC).

5.2 CAPÍTULO 2 - MOLECULAR PORTRAIT OF IL-8 IN BREAST CANCER: REVISITING AN OLD FOE

¹Raquel Nascimento das Neves; ¹Marcelo Falchetti; ¹Barbara dos Santos,
¹Guilherme Nicácio Vieira, ²Alexander James Roy Bishop; ^{1,2}Alfeu Zanotto-Filho

¹ Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

² Greehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

Abstract

The intricate interplay between tumor-secreted cytokines and immune cells plays a pivotal role in cancer biology. In breast cancer, Interleukin-8 (*CXCL8*), a chemokine, has emerged as a key player in promoting malignant growth of mammary cells. In this study, we comprehensively investigated the expression profile of IL-8 and its functional significance in breast cancer. We carried out a scope review of current literature combined with comprehensive evaluation of large breast cancer 'omics' datasets. In breast cancer cell lines, we employed cell viability, migration and invasion assays to evaluate the role of IL-8 in cell malignancy. We quantified *CXCL8* levels using ELISA and conducted bioinformatics analyses using TCGA, GTEx, and CCLE datasets. Immunohistochemistry (IHC) on tissue microarray slides was performed to elucidate the expression profile of *CXCL8* in breast cancer subtypes. Our mRNA profile analysis and IHC revealed widespread expression of *CXCL8* across all types of cells, displaying significant variation within samples from the same tissue. Functional enrichment and mutational analysis demonstrated an augmented inflammatory response and a diminished estrogen response, which appear to be hallmark gene sets associated with higher *CXCL8* levels in tumors. Notably, *TP53* gene mutations exhibited the most significant enrichment between the top and bottom *CXCL8*-expressing groups in breast tumors. Moreover, triple-negative (basal-like and claudin-low) tumors show an augmented expression of *CXCL8* when compared to luminal A/B cancer subtypes. ELISA assays further confirmed elevated *CXCL8* levels in basal/claudin-low cell lines compared to HER2+ and Luminal A/B cell lines, accompanied by increased invasiveness. To investigate the functional relevance of *CXCL8*, we performed a *CXCL8* knockdown in the MDA-MB231 cell line. The results demonstrated that *CXCL8* depletion significantly reduced viability, invasion, and migration potential, underscoring the essential role of IL-8 in tumor malignancy. Collectively, our findings suggest that *CXCL8* produced by certain subtypes of breast cancer contributes to malignant phenotypes. In summary, the *CXCL8* signaling pathway represents a promising target for novel therapeutic approaches in triple-negative (basal-like/claudin-low) breast cancer.

Keywords: Interleukin-8; triple-negative; breast cancer.

Interleukin-8 (IL-8): an overview

Cytokines play key roles in many diseases, in which they can exercise different functions. In cancer, cytokines can play an antitumoral effect through pro-inflammatory activity, increasing cell recruitment in the tumor microenvironment and cell cytotoxicity. On the other hand, they can play a pro-tumoral activity when released by tumor cells and adjacent immune cells in the tumoral microenvironment, and even cytokines can play both roles (BERRAONDO *et al.*, 2019).

Interleukin-8 (IL-8), also known as chemokine *CXCL8*, is an 8.4 kDa protein, belonging to the CXC subfamily of chemokines, characterized as a pro-inflammatory cytokine that plays a crucial role in the recruitment and activation of neutrophils, which are important immune cells involved in the initial response to infection and injury (CHEN, S. jie *et al.*, 2018). IL-8 is produced by a variety of cell types, including epithelial cells, macrophages, endothelial cells, and fibroblasts. IL-8 binds to two receptors on the surface of target cells, IL-8 receptor alpha (IL-8RA/CXCR1) and IL-8 receptor beta (IL-8RB/CXCR2), to mediate its effects. Besides neutrophils, IL-8 also attracts other immune cells, such as T cells, natural killer cells, and monocytes to sites of inflammation (RUSSO *et al.*, 2014). IL-8 dysregulation has been implicated in several human diseases, including atherosclerosis, cancer, inflammatory bowel disease, infection, sepsis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), psoriasis, and rheumatoid arthritis. In these conditions, IL-8 can contribute to chronic inflammation, tissue damage, and disease progression. Therefore, targeting IL-8 and its receptors is a promising strategy for developing new therapies for these diseases (JIANG *et al.*, 2022).

IL-8 expression in breast cancer

IL-8 is overexpressed in several human solid tumors, and integrative bioinformatics analysis showed that mRNA expression of *CXCL8* is significantly up-regulated in breast cancer samples in multiple datasets (CHEN, E. *et al.*, 2018). This overexpression has been linked to a tumor-promoting role in modulating the survival and proliferation of tumor cells through autocrine and/or paracrine signaling (NAJDAGHI; RAZI; REZAEI, 2020). IL-8 biological activity in tumors and in the tumor microenvironment can contribute to tumor progression through several mechanisms, including the regulation of angiogenesis, cancer cell growth and survival, tumor cell motility, and leukocyte infiltration. Additionally, IL-8 can modify immune responses in

the tumor microenvironment, leading to an association with poor prognosis in some cancers (SINGH *et al.*, 2013).

To determine the *CXCL8* mRNA expression profile in healthy tissues, tumors, and cancer cell lines, we used three datasets, and the presence and distribution of gene transcripts indicate that a variety of healthy tissues, tumors, and cell lines expresses *CXCL8*, including the breast tissue, tumors, and cell lines, suggesting that *CXCL8* is expressed in breast tissue in and out of cancer microenvironment (Figure 1A, 1B and 1C). To determine the IL-8 expression in breast tissues, we performed IHC-staining to detect IL-8 protein expression in a human tissue microarray containing 75 tissue samples with duplicate slices (BR1503c US Biomax). IL-8 detection by IHC was possible in 67 samples where it was observed positive staining, classified as 1+, 2+, or 3+ in all types of tissues (Figure 1D). Normal, tumor adjacent breast tissues showed strong IL-8 staining, which is mostly confined to mammary ducts' cells. Intraductal and invasive carcinomas also showed extensive IL-8 staining with cancer cells. We also noted staining of some stromal cells in both normal and cancerous tissues (Figure 1D). The same pattern was observed *in vitro* by Ma *et al.*, 2017, where *CXCL8* levels were measured by ELISA in samples isolated from patients with ductal carcinoma and control subjects, and the serum IL-8 levels were observed both in healthy patients and in the ductal carcinoma patients.

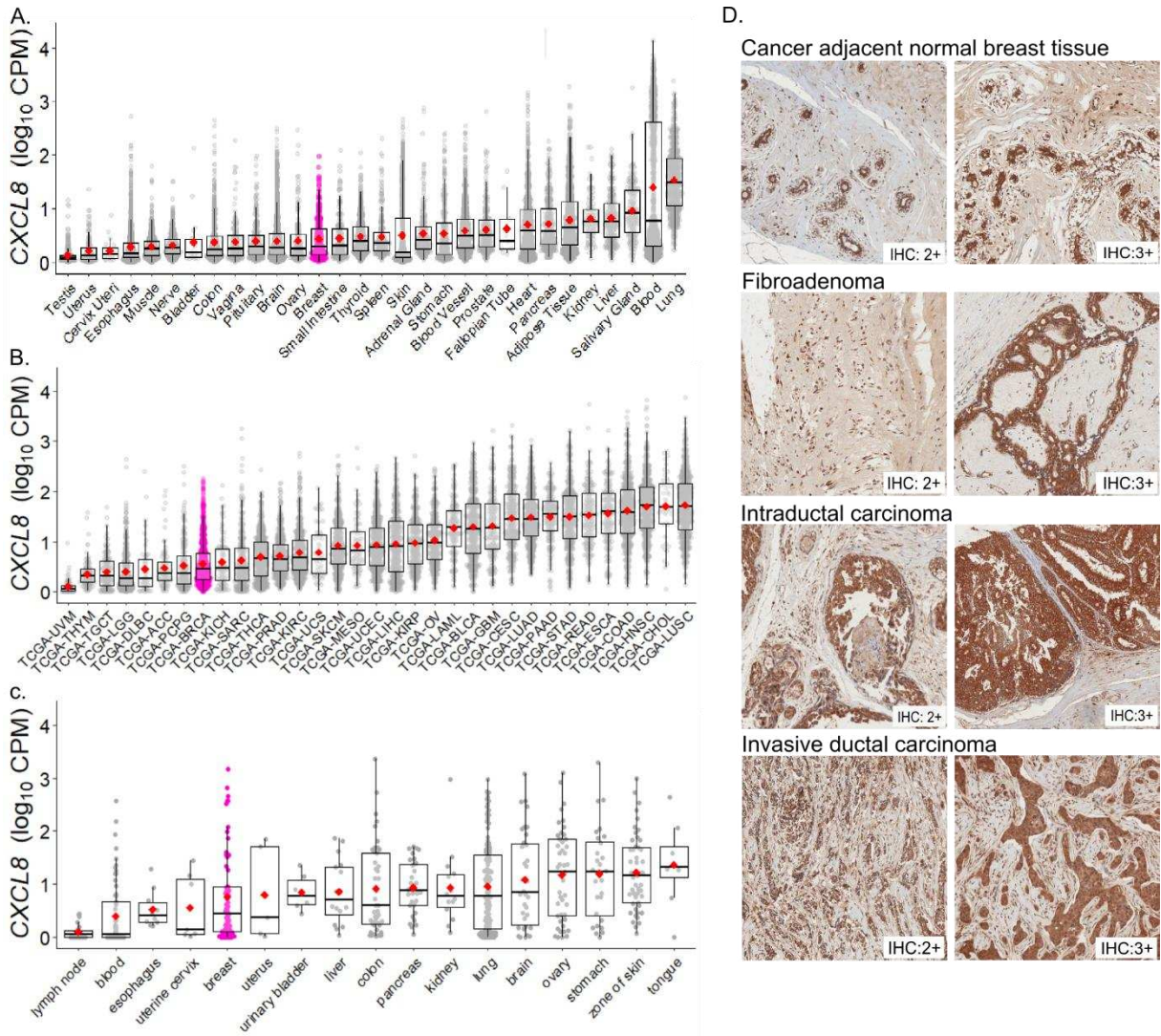


Figure 1. CXCL8 is expressed in healthy tissues, tumors and cancer cell lines (A) CXCL8 expression in Genotype-Tissue Expression (GTEx) dataset; **(B)** CXCL8 expression in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset; **(C)** CXCL8 expression in E-MTAB 2706 cell line panel; **(D)** IHC staining in human tissue microarray (BR1503c US Biomax) for CXCL8 detection in cancer adjacent normal breast tissue, fibroadenoma, intraductal carcinoma and invasive ductal carcinoma.

IL-8 and hormonal signaling

Estrogen and progesterone are steroid hormones that play critical roles in mammary gland development, particularly during puberty and pregnancy. Both hormones have been shown to modulate the expression of cytokines and chemokines in the mammary gland (REED; SCHWERTFEGER, 2010). Studies have suggested that estrogen and progesterone can have differing effects on the cytokine profile in mammary glands at the pubertal stage versus the adult stage. Specifically, in pubertal female mice treated with only estrogen or progesterone, there is an induction of the expression of several pro-inflammatory genes for chemokines and

cytokines including genes encoding *IL17B* and *TNF* (AUPPERLEE *et al.*, 2014). In contrast, in adult mice, recent findings demonstrate that the cytokine microenvironment of the murine mammary gland fluctuates over the estrous cycle, with the estrus phase skewed to a pro-inflammatory environment through increased protein secretion of CSF1, IFNG, and TNF (DASARI *et al.*, 2014).

Breast cancer is a complex disease that can be influenced by various factors, including hormones. Estrogen and progesterone are two hormones that play a crucial role in breast cancer development, growth, and treatment. Understanding the complex interplay between hormones, immune function, and tissue composition is critical for developing effective breast cancer prevention and treatment strategies (HYNES; WATSON, 2010). To determine if there is a factor that can be correlated with the positive skewness in a protein level, first, we assessed whether levels of IL-8 protein expression were associated with any specific parameter analyzed on tissue microarray slides. The results showed no association between levels of IL-8 and levels of Estrogen Receptor (ER) ($p>0.1139$), Progesterone Receptor (PR) ($p>0.3834$), HER2 ($p>0.2405$), Marker of Proliferation Ki-67 ($p>0.4388$), Tumor Protein p53 ($p>0.4047$), Tumor stage ($p>0.8457$), Tumor grade ($p>0.5316$), Pathology diagnosis ($p>0.3563$) and breast cancer histological subtype ($p>0.2533$) as shown in Table 1.

Breast Tissue Array Type	IL-8		p-value
	Medium	High	
<u>Molecular markers</u>			
ER – (n=44)	10	34	0.1139
ER + (n=23)	1	22	
PR – (n=51)	10	41	0.3834
PR + (n=16)	1	15	
HER2 – (n=63)	9	54	0.2405
HER2 + (n=4)	2	2	
Ki67 – (n= 50)	10	40	0.4388
Ki67 + (n=17)	1	16	
<u>Tumor Stage</u>			
I (n=5)	1	4	0.8457
Ila (n=28)	4	24	
Ilb (n=14)	1	13	
Illa (n=8)	2	6	

IIIb (n=3)	1	2	
<u>Tumor Grade</u>			
1 (n=4)	0	4	
2 (n=46)	7	39	0.5316
3 (n=7)	1	6	
<u>Pathology Diagnosis</u>			
Cystosarcoma phyllodes (n=2)	0	2	
Intraductal carcinoma (n=6)	2	4	0.3563
Invasive ductal carcinoma (n=59)	9	50	
<u>Histological Subtype</u>			
Luminal A (n=22)	1	21	
Luminal B (n=2)	0	2	
Her2+ (n=12)	4	8	0.2533
Triple-negative (n=31)	6	25	

Table 1. IL-8 scores analyzed by immunohistochemistry (IHC) using BR1503 (US Biomax) tissue microarray (TMA) slides; Pearson's Chi-squared test; ER – Estrogen receptor, PR – Progesterone receptor, HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2.

Since breast cancer is mainly classified by expression of ER, PR and HER2 and protein levels weren't correlated with any parameter, we examined the relationship between *CXCL8* mRNA expression and the presence of common breast cancer receptors (ER, PR and HER2) classified by IHC or tumor stage and pathology using TCGA dataset. When tumors and cell lines were grouped according to ER, PR and HER2 by IHC staining, *CXCL8* expression was significantly high in ER-negative ($p < 0.001$) (Figure 2A) PR-negative ($p < 0.001$) (Figure 2B), HER2-positive samples ($p < 0.0243$) (Figure 2C) and accordantly to the pathology diagnosis ($p < 0.0089$) (Figure 2D) but it was not significant different in tumor stage classification ($p < 0.2463$) (Figure 2E). Consistent findings were replicated in additional publicly available datasets that included gene expression data from primary breast tumors. Upon categorizing the tumors into ER-negative and ER-positive groups, it was evident that *CXCL8* mRNA was significantly higher in ER-negative tumors (ACETO *et al.*, 2012). Moreover, IL-8 levels from patients diagnosed with ductal carcinoma exhibited positive correlation with clinical disease stage (an effect not observed in the TCGA cohort as afore described), lymph node metastasis, as well as ER and HER2 antigen expression (MA, Y. *et al.*, 2017).

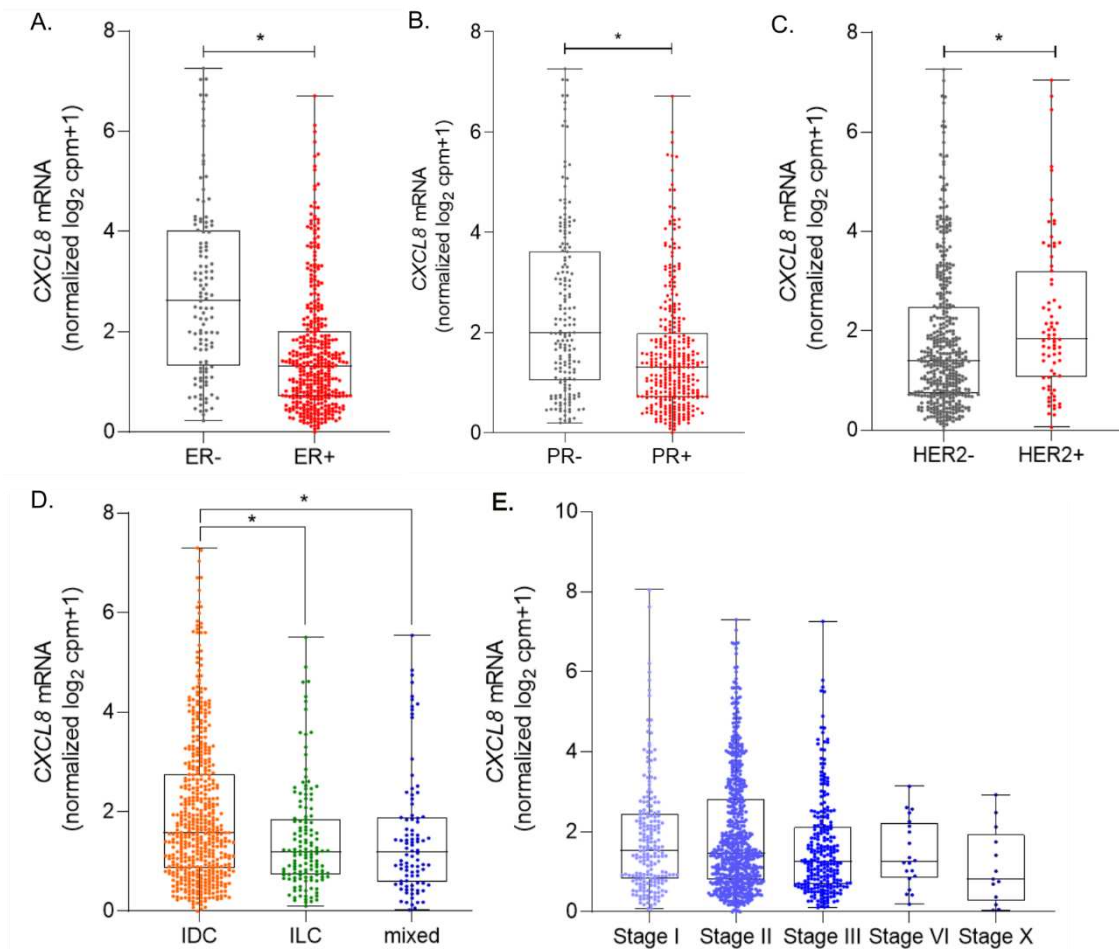


Figure 2. CXCL8 increased expression in ER-, PR-, HER2+ samples and in invasive ductal carcinoma. CXCL8 mRNA expression in tumors classified by IHC for (A) ER ($p < 0.001$), (B) PR ($p < 0.001$), (C) HER2 ($p < 0.0243$) status, (D) pathology diagnosis ($p < 0.0089$) and (E) tumor stage classification ($p < 0.2463$) in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. * $p < 0.05$, T-test for “A”, “B” and “C” 1-way-ANOVA-Tukey for “D” and “E”. ER – Estrogen receptor, PR – Progesterone receptor, HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2, IDC – Invasive ductal carcinoma, ILC – Invasive lobular carcinoma.

IL-8 pathway in molecular subtypes of breast cancer.

Tumor heterogeneity is a major challenge in breast cancer treatment, both within individual patients (intra-patient heterogeneity) and between different patients with the same type of cancer (inter-patient heterogeneity) (KOREN; BENTIRES-ALJ, 2015). Such heterogeneity exists on genetic and phenotypic levels. These genetic and phenotypic differences can lead to the presence of aggressive tumor clones with enhanced survival, invasion, and colonization abilities. The molecular and cellular programs that underlie these differences can vary greatly between different cancer types and subtypes (HANAHAN; WEINBERG, 2011c).

Breast tumors are a heterogeneous disease, displaying a range of biological and clinical behaviors. This heterogeneity can be attributed to various factors, including receptor statuses such as ER-positive, HER2-positive, and triple-negative

tumors (CURTIS, C., 2012). Molecular classification of breast cancer is critical for understanding the underlying biology of the disease, predicting patient outcomes, and guiding treatment decisions. The PAM50 classification, which identifies the intrinsic subtypes of breast cancer based on gene-expression profiling, has been widely used to classify breast tumors into luminal A, luminal B, HER2-enriched, and basal-like breast tumors (PRAT; PEROU, 2011). However, the emergence of the claudin-low subtype has added another layer of complexity to the molecular classification of breast cancer. These tumors are characterized by low expression of cell-cell adhesion molecules, high expression of mesenchymal markers, and stem-cell-like features. They are associated with poor prognosis, resistance to therapy, and a high likelihood of recurrence (PRAT *et al.*, 2010). Some of them have benefited from numerous advances in recent decades but different factors interfere with processes involved in breast cancer development and therapeutics.

We examined the *CXCL8* expression among breast cancer molecular subtypes using the TCGA dataset. The breast cancer molecular subtypes are first thing branched into two arms, luminal and basal, as they present expression profiles that are very much alike to the cells of the luminal-epithelial and basal-epithelial tissues of the breast. The central distinction between these two groups is the expression of the ER in luminal cancers. To do this, first, we reclassified the datasets samples using the Claudin-low molecular subtype signature based on a gene list that identifies a set of core tumors described by Fougner *et al.*, 2020. In the TCGA set, 6 % (74) of the samples previously classified as Normal-like (50), Luminal A (16), Basal-like (7), and one non-classified/undetermined were designated as Claudin-low (Figure 3A). These samples had high mRNA expression of *ALDH1A1*, *ITGA6*, *ITGB1*, *MME*, *SNAI1*, *SNAI2*, *THY1*, *TWIST1*, *TWIST2*, *VIM*, *ZEB1*, *ZEB2* and low mRNA expression of *CDH1*, *CLDN3*, *CLDN4*, *CLDN7*, *EPCAM*, *MUC1*, and *OCN* as previously demonstrated (FOUGNER *et al.*, 2020) (Figure 3A). In breast cancer tumor data (n = 1206 samples classified in TCGA), the subtypes Basal-like, Claudin-low, and HER2-enriched showed higher levels of *CXCL8* mRNA expression than the Luminal subtypes even though Claudin-low showed lower levels than Basal-like and HER2-enriched (Figure 3B). Notably, the expression levels of *CXCL8* receptors, *CXCR1* and *CXCR2*, showed no significant variation across the molecular subtypes (Figures 3C and 3D). This suggests that while the ligand (*CXCL8*) is expressed differently among the molecular subtypes, there is no alteration in the expression of

its corresponding receptors, indicating that IL-8 levels could dictate the magnitude of IL-8/CXCR1/2 pathway activation.

A.

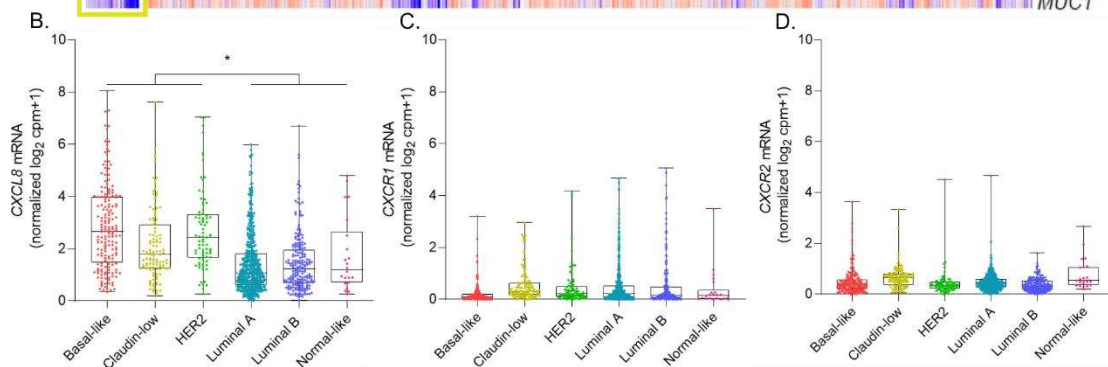
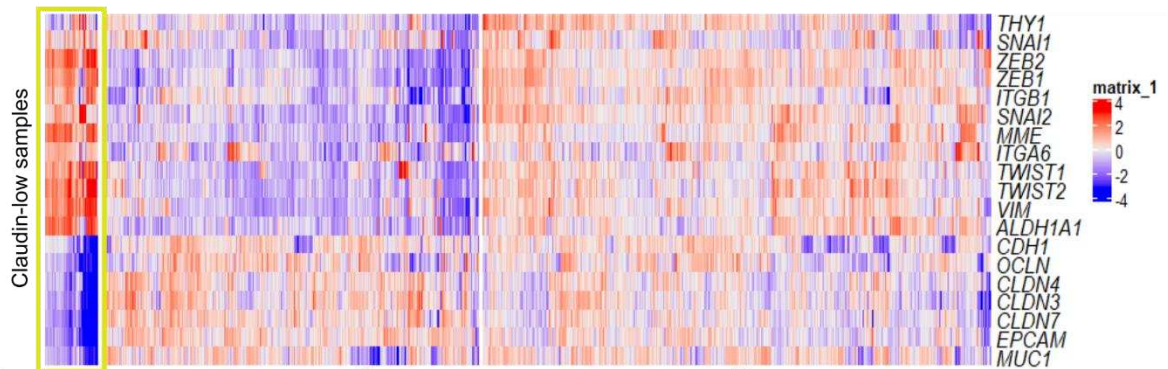


Figure 3. *CXCL8* exhibits elevated expression in basal-like, claudin-low and HER2 tumors. (A) Heatmap using the Claudin-low molecular subtype signature **(B) *CXCL8* (C) *CXCR1* and (D) *CXCR2*** mRNA expression in tumors classified by molecular subtype in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. * $p < 0,05$ (1-way-ANOVA-Tukey).

IL-8 association with pathways and genetic alterations in breast tumors

In our results from figures 1B and 1C, while breast cancer is not the tissue that expresses this cytokine the most, we observed that there is a positive skewness in the *CXCL8* expression distribution in breast samples in all datasets, possibly indicating a heterogeneous expression of *CXCL8* in subsets of tumors and cell lines.

Next, we analyzed the functional enrichment and mutational differences between samples with the 25 % top versus bottom *CXCL8* expression values in the TCGA dataset. Thus, we used the 306 samples above the third quartile and the 306 below the first quartile (Figure 4A, red and blue groups/points). The log₁₀ CPM *CXCL8* values of the top-values group ranged from 0.76 to 2.24 (a 1.48 difference/delta) while of the bottom-values group ranged from 0 to 0.24 (a 0.24 difference), a 6.16 times greater distribution and with more heterogeneous values. In Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), five hallmarks gene sets were enriched with up-regulated genes, i) TFNa signaling via NFkB, ii) hypoxia, iii) epithelial-

mesenchymal transition, iv) inflammatory response, and v) KRAS signaling, and two hallmarks were enriched with down-regulated genes, both associated with estrogen response (Figure 4B). Since an increased inflammatory and a decreased estrogen response seem to be the hallmark gene sets in common in tumors with higher levels of *CXCL8*, we analyzed the gene rank related to these terms among the universe of analyzed genes via GSEA and they are both associated with *CXCL8* top and bottom groups ranked gene sets (Figure 4C).

As for the presence of non-silent mutations in tumors, we performed enrichment analysis of 15,180 gene mutations using Fisher exact test for proportions to identify genes with the greatest variation between top and bottom *CXCL8* expression groups, and the only one with a difference greater than 10 % was the *TP53* gene, present in 41.7 % of samples from the top-expressed and 10.8 % from the bottom-expressed *CXCL8* group (Figure 4D). Interestingly, *TP53* gene mutations are a genetic hallmark of basal-like tumors, and HER2-enriched to some extent, which is keeping with the herein observed upregulation of *CXCL8* expression in the basal-like and Her2 intrinsic subtypes (Figure 3B). Studies have demonstrated that *TP53* mutations play a role in promoting chronic inflammation and immune suppression within the tumor microenvironment, thereby contributing to cancer development and progression (SHI; JIANG, 2021). Upon analyzing the TCGA data, we observed that samples containing p53 hotspot mutations exhibited higher levels of *CXCL8* compared to samples with wild-type p53 (Figure 4E). Furthermore, these effects were observed across various types of *TP53* alterations, including the most frequent *missense*, as well as *inframe*, and *truncating* mutations (Figure 4F). Regarding the known *TP53* hotspot mutations in breast cancer, the loss of arginine in 273 and 175 residues showed higher expression of *CXCL8* when compared to p53 wild-type samples (Figure 4G). It has been hypothesized that *TP53* mutations may activate the NF κ B pathway, which, is a crucial signaling pathway involved in regulating immune responses and inflammation, often disrupted in cancer, and in turn, can stimulate the expression of IL-8 (RAHNAMOUN *et al.*, 2017), which is in keeping with the NF κ B pathway enrichment observed in GSEA analysis of pathways associated with *CXCL8*-high tumors (Figure 4B).

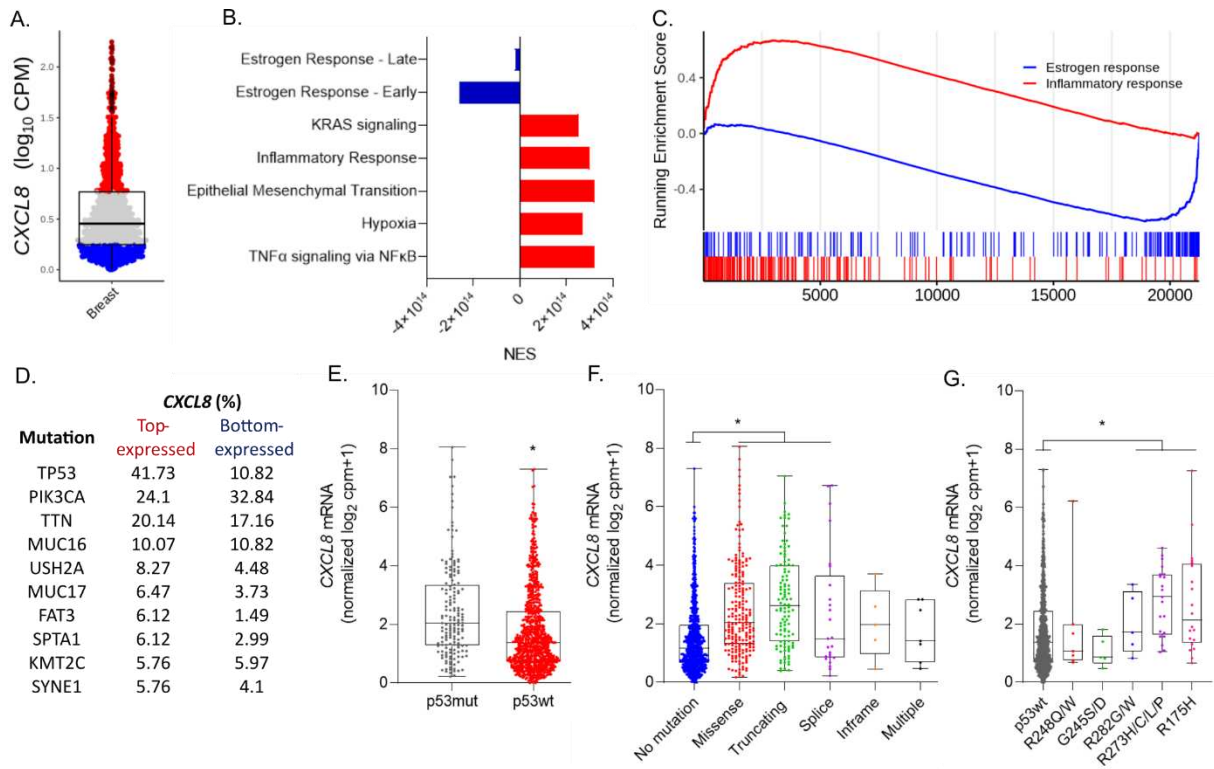


Figure 4. Functional enrichment and mutational differences in breast cancer. (A) Samples with the 25 % top versus bottom *CXCL8* expression values; (B) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), NES: normalized enrichment score; (C) *CXCL8* top and bottom groups ranked gene sets; (D) Enrichment analysis of 15,180 gene mutations; (E) *CXCL8* expression in p53 mutant versus p53 wild-type samples; (F) *CXCL8* expression in different types of p53 mutations; (G) *CXCL8* expression in p53 hotspot mutations. Samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. * $p < 0,05$ (Fisher exact test for “B”, T-test for “E”, 1-way-ANOVA-Dunnet for “F” and “G”).

IL-8 in the breast tumor microenvironment

IL-8 is primarily secreted by myeloid cells such as macrophages and neutrophils, as well as other cell types such as endothelial cells and fibroblasts (QAZI; TANG; QAZI, 2011). Under physiological conditions, IL-8 plays an important role in the immune response to infections and tissue damage. IL-8 helps to attract these cells to the site of infection or tissue damage, where they can help to clear out pathogens and damaged tissue (PAN *et al.*, 2020).

In addition to recruiting immune cells to the site of a tumor, high levels of IL-8 can also contribute to the development of an immunosuppressive and pro-tumorigenic environment. This is because IL-8 can attract immune cells such as neutrophils and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) to the tumor microenvironment via the IL-8/CXCR1/CXCR2 axis (DAVID *et al.*, 2016). Neutrophils and MDSCs that are attracted to the tumor microenvironment can then secrete growth factors and cytokines that promote tumor growth and survival. These cells can

also remodel the extracellular matrix and induce angiogenesis, which helps to supply the tumor with the nutrients and oxygen it needs to grow (ACHARYYA *et al.*, 2012).

In addition to its paracrine effects on the tumor microenvironment, IL-8 can also act in an autocrine fashion on cancer cells themselves. Tumor-derived IL-8 can facilitate various oncogenic signaling pathways, including angiogenesis, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (FERNANDO *et al.*, 2011). Furthermore, the microenvironment surrounding cancer cells can have a significant impact on their exposure to IL-8 and its effects. Cancer cells located in the periphery of the tumor bulk are often in closer contact with fibroblasts, which can secrete IL-8 and contribute to its effects on cancer cell behavior. This can lead to further tumor heterogeneity, as cancer cells in different parts of the tumor may be exposed to different levels of IL-8 and other cytokines (DOMINGUEZ *et al.*, 2017).

To identify whether breast cancer cells and/or the tumor microenvironment express *CXCL8* we reanalyzed a sequencing study of individual triple-negative breast cancer cells. Using the original classification as published by Wu *et al.*, 2021, the only cell types in which *CXCL8* gene mRNA was detected were, in decreasing order, myeloid (28.3 % cells), epithelial basal cycling (cancer tissue, 23.9 % cells), epithelial luminal (normal breast tissue, 20.9 % cells), epithelial basal (cancer tissue, 7.4 % cells) e myoepithelial (5.7 % cells) (Figure 5A). Our next step was to identify which cell types in the myeloid cluster express *CXCL8* transcript. The clustering of the myeloid population resulted in 11 clusters (0 - 10) (Figure 5B). Our classifier's assessment in the training group resulted in a 0.86 Cohen's kappa and a 0.95 Area Under the Precision-Recall Curve. The myeloid types in which *CXCL8* gene mRNA was detected were, in decreasing order, monocytes (34.6 %), macrophages (26.7 %), conventional dendritic cells - cDC2 (18.3 %), and - cDC1 (9.3 %) in addition to below the threshold (BT) score cells (31.9%) (Figure 5C). As for the classification of the clusters, 2 clusters were classified as mostly monocytes, 5 as mostly macrophages, 1 as mostly conventional dendritic cells cDC2, and 2 (clusters 8 and 9) as mostly below the threshold (BT) score. Curiously, the highest *CXCL8* values cluster was 8, and it has 74.7 % cells classified as below the threshold score, 16.1 % monocytes, and 9.1 % of macrophages. This cluster is classified as CD68- and its top-5 markers were, in decreasing order of *p*-value, *CMTM2* (with an average log2 fold-change of 4.09), *CXCR2*, an IL-8 receptor (Fold-change: 3.51), *S100A8* (Fold-

change: 3.59), *G0S2* (Fold-change: 3.43) and *FCGR3B*, or CD16 (Fold-change: 3.60).

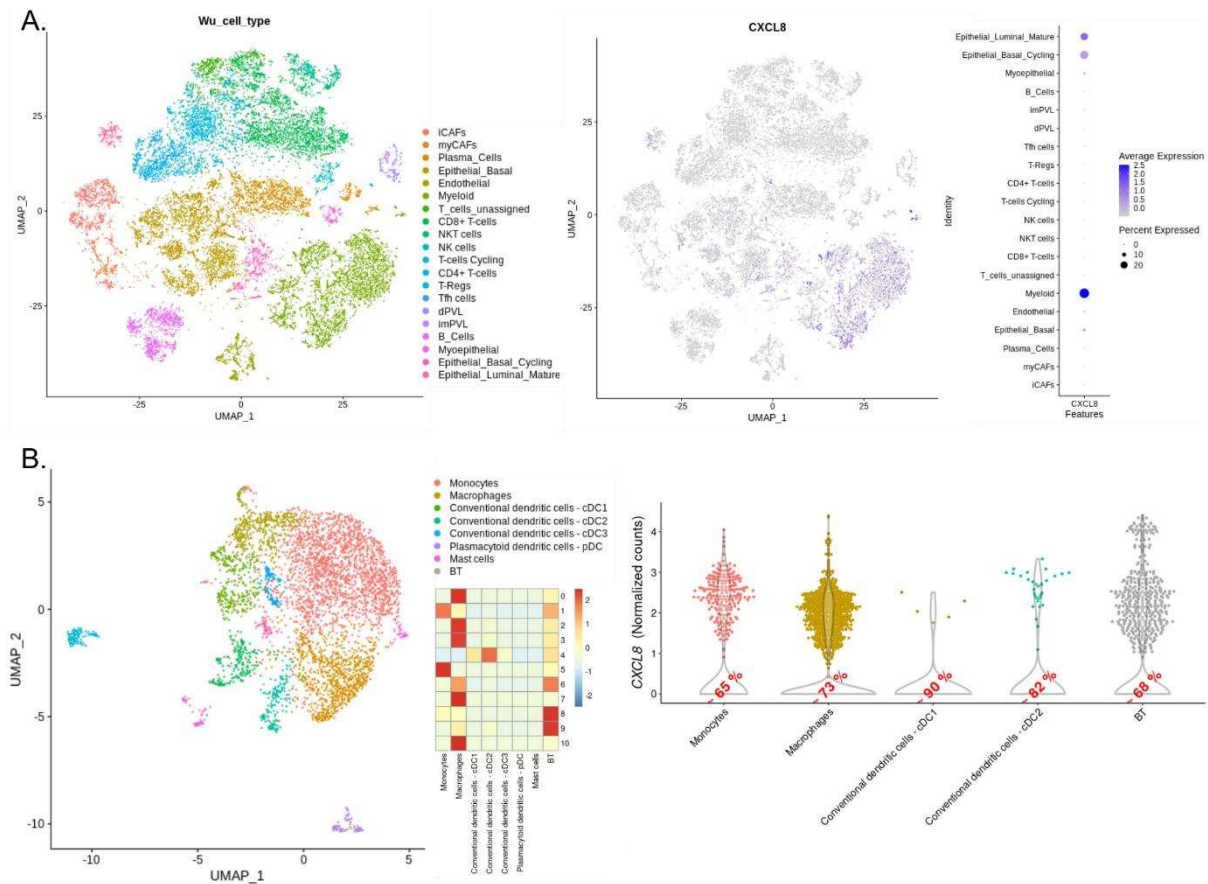


Figure 5. Single cell analysis of IL8 expressing cell types in the breast cancer microenvironment. (A) UMAP representation of the different cell types identified in breast tumors based on Wu *et al.*, 2021 (left), and the expression of CXCL8 mRNA within each cell type (right). **(B)** Identification of different cell types in the myeloid cluster (left) and expression of CXCL8 per cell type (right).

Targeting the IL-8 pathway in breast cancer

When examining the expression of *CXCL8* in breast cancer cell lines through ELISA analysis of serum samples from six different breast cancer cell lines, elevated levels of IL-8 were detected in the serum of BT-20, Hs578t, and MDA-MB231 cell lines, which belong to the basal/ Claudin-low subtype known for its aggressive phenotype. Conversely, the SKBR3, BT-474, MCF-7, and cell lines, classified as HER2+ and luminal A subtypes, respectively (PRAT *et al.*, 2013), exhibited low levels of IL-8 (Figure 6A). This pattern has been consistently observed in other studies as well. For instance, LIUBOMIRSKI *et al.*, 2019 demonstrated significantly higher levels of this chemokine in basal patients compared to luminal-A patients in the TCGA breast cancer dataset. Additionally, ACETO *et al.*, 2012 reported that high expression

of IL-8 was prevalent in HER2-enriched and basal breast cancers, according to the Gene Expression-based Outcome of Breast Cancer Online (GOBO) platform. Interestingly, the cell lines expressing higher levels of *CXCL8* also displayed greater invasion potential, as determined by transwell chamber assay (Figure 6B).

Because IL-8 and its receptors CXCR1/2 are essential for tumor development, it is intuitive that targeting this pathway may offer opportunities to cancer treatment (RUSSO *et al.*, 2014). During almost three decades, a variety of *CXCL8*-releasing inhibitors, small-molecule CXCR1/2 inhibitors, and neutralizing antibodies against *CXCL8* and CXCR1/2 have been reported. Several preclinical studies suggest that a combination of CXCR1/2 inhibitors along with other targeted therapies, chemotherapies, and immunotherapy may be effective in treating select cancers. Currently, several of these inhibitors are in advanced clinical trials for COPD, asthma, and metastatic breast cancer (HA; DEBNATH; NEAMATI, 2017).

To assess the IL-8 role in triple-negative breast cancer, we investigated its function in two claudin-low cell lines, namely MDA-MB231 and Hs578t. Our findings revealed that knocking down the *CXCL8* gene using siRNA reduced the invasion potential of the MDA-MB231 cell line. However, in the HS578T cell line, no significant difference was observed between the effects of scrambled siRNA and *CXCL8* siRNA on invasion (Figure 6C). Additionally, we evaluated the migration potential using a wound closure assay, which demonstrated that *CXCL8* inhibition, through siRNA-mediated knockdown or after SB225002 treatment at 5 and 10 μ M significantly decreased the migration potential of MDA-MB231 cells (Figure 6D).

A few years ago, it was explored an IL-8-specific antibody to target IL-8 signaling in a preclinical model of claudin-low TNBC. The anti-IL-8 antibody, termed HuMax-IL-8 was explored both in vitro and in vivo with xenografts of claudin-low breast cancer, such as MDA-MB231 where the administration of HuMax-IL-8 enhances the susceptibility of claudin-low TNBC cells to lysis mediated by immune effector NK and antigen-specific T cells in vitro (DOMINGUEZ *et al.*, 2017). HuMax-IL-8 was evaluated in the clinic, including in a recently completed phase Ib clinical trial (NCT02536469) conducted in patients with metastatic or unresectable, locally advanced malignant solid tumors. The results concluded that HuMax-IL-8 is safe and well-tolerated (BILUSIC *et al.*, 2019).

Another clinical study that had preliminary results at phase 1 published, concluded that co-treatment with HuMax-IL-8 (now known as BMS-986253) plus

nivolumab demonstrated a safety profile and a significant reduction of serum IL-8 levels, with tumor reduction for early-stage colon cancer (NCT03026140 identifier in clinicaltrials.gov). A few other clinical trials are still in progress, including an evaluation in co-treatment with HuMax-IL-8 and nivolumab for pancreatic adenocarcinoma (NCT02451982 identifier in clinicaltrials.gov), one study for advanced stage melanoma using a co-treatment with BMS-986253 with nivolumab or with nivolumab and ipilimumab compared with placebo plus nivolumab (NCT03400332 identifier at clinicaltrials.gov), a clinical trial evaluating the nivolumab plus BMS-986253 in head and neck cancer (NCT04848116 identifier at clinicaltrials.gov), and clinical trials in hormone-sensitive prostate tumor (NCT03689699 identifier at clinicaltrials.gov) (MARTINEZ *et al.*, 2020).

Several small molecule antagonists of CXCR1 and CXCR2 are currently being tested. The SCH563705 (Merck) has particularly high binding affinities to CXCR1 and CXCR2 and proved effective at inhibiting primary human breast CSC activity *ex vivo* (SINGH *et al.*, 2013). Other drugs, such as reparixin, SCH479833 (Merck), and SCH527123 (Merck) have demonstrated anti-tumor effects in xenograft models of breast cancer (GINESTIER *et al.*, 2010) colorectal cancer (NING *et al.*, 2012) and melanoma (SINGH *et al.*, 2009). Reparixin is a non-competitive CXCR1 and CXCR2 dual inhibitor designed using molecular modeling studies with CXCR1, and it is structurally different from the earlier classes of antagonists. Based on recent evidence that CXCR1/2 inhibition can inhibit breast CSC self-renewal and metastases *in vivo*, clinical trials are underway to determine the safety and efficacy of reparixin in combination with chemotherapy agents in patients with advanced breast cancer (KORKAYA; LIU; WICHA, 2011). So far, there are three completed clinical trials involving breast cancer (NCT01861054, NCT02370238, NCT02001974 identifiers at clinicaltrials.gov). The phase two study (NCT02001974 identifier) had the results published in 2021. It evaluated the efficacy of co-treatment of paclitaxel plus reparixin compared to paclitaxel alone in metastatic triple-negative breast cancer. The main result evaluated was progression-free survival (PFS), and there was no difference between the treatment group and the placebo group. Noteworthy, the safety of reparixin was evaluated and severe adverse effects also weren't present between groups (GOLDSTEIN *et al.*, 2020). The value of reparixin in combination with other drugs for triple-negative breast cancers, or other tumor types is still unclear. A few other molecules are also in clinical trials as AZD5069, danirixin (GSK1325756),

SB656933, all CXCR2 selective inhibitors. This selectivity benefit is still unclear and it needs to be more in-depth to compare with non-selective CXCR inhibitors (GONZALEZ-APARICIO; ALFARO, 2020)

In our experiments, utilizing SRB proliferation assay, we observed that SB225002 treatment in a dose-dependent manner and CXCL8 siRNA-mediated knockdown significantly affected MDA-MB231 cell proliferation as shown in Figure 6E and 6F. We also evaluated cell death using propidium iodide staining, and it was evident that cells treated with SB225002 at concentrations as low as 12.5 μ M began to exhibit signs of cell death after 48 hours of treatment (Figure 6G). Moreover, the clonogenic assay revealed that the treatment groups failed to form any colonies compared to the MDA-MB231 control group, indicating a significant inhibition of colony formation (Figure 6H).

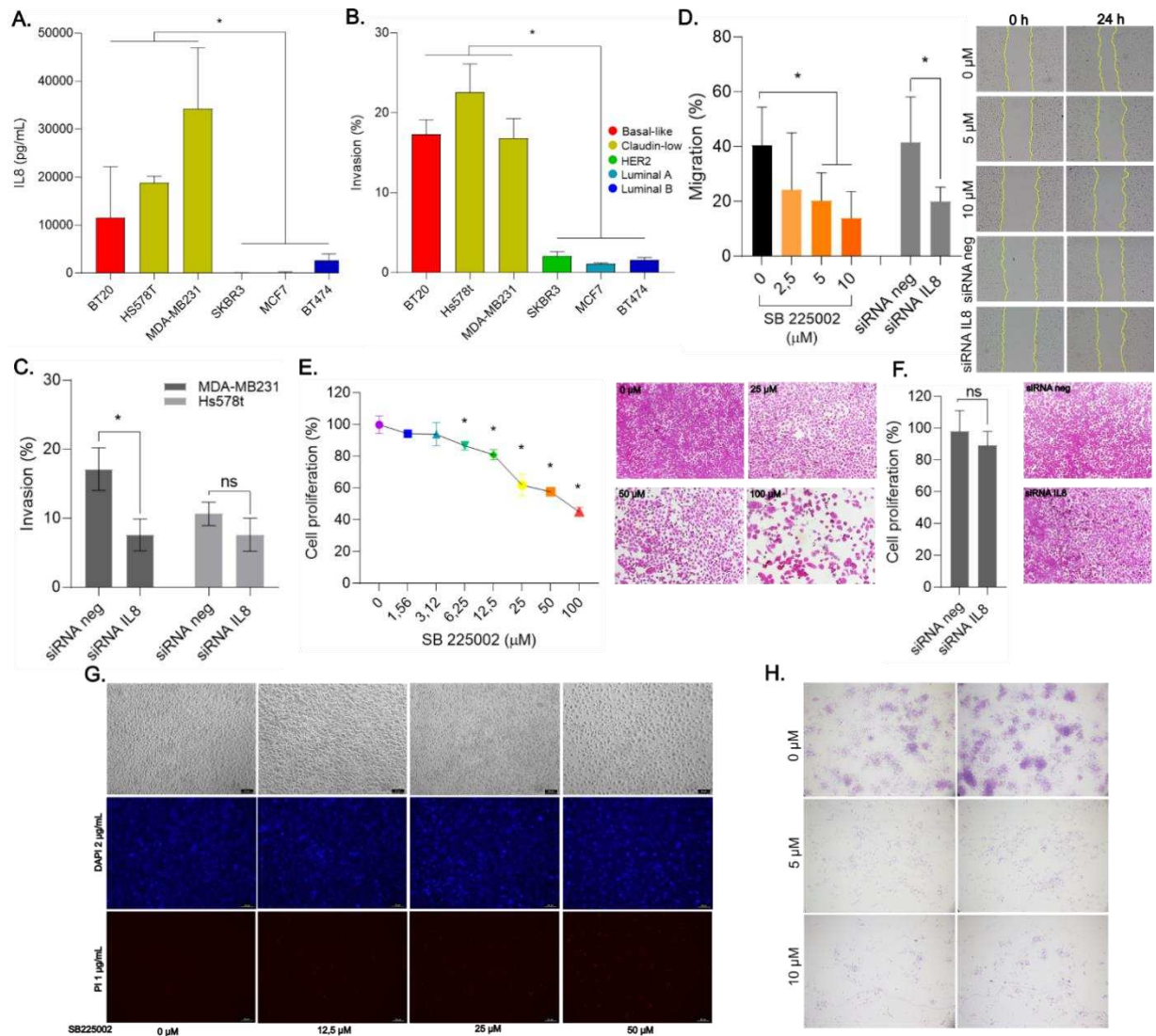


Figure 6. IL-8 role in triple-negative breast cancer. (A) IL-8 levels measured by ELISA in breast cancer cell lines supernatant; **(B)** Transwell assay of breast cancer cell lines panel; **(C)** Transwell assay showing the impact of IL-8 knockdown upon cell invasion in MDA-MB231 and

Hs578T cells; **(D)** Wound closure assay of MDA-MB231 cells showing the impact of *CXCL8* knockdown and IL-8 inhibition upon cell migration; **(E)** Effect of SB225002 and **(F)** *CXCL8* knockdown in MDA-MB231 cells after 72 h treatment as determined by SRB assay; **(G)** Propidium iodide and DAPI staining in MDA-MB231 cells treated with SB225002 after 24h; **(H)** Clonogenic assay in MDA-MB231 cells after treatment with SB225002. * - different from untreated/control or at indicated comparisons. ns – non-significant. (1-way-ANOVA-Tukey for “A” and “B”; 2-way-ANOVA- Bonferroni for “C”; 1-way-ANOVA-Dunnet and t-test for “D”, “E” and “F”; $p < 0.05$).

Perspectives and directions

The data presented herein show that IL-8 pathway drives pivotal tumor malignance phenotypes, especially cancer cell migration, invasion, and metastasis. IL-8-CXCR1/2 pathway is upregulated in triple-negative, ER-negative breast cancers, offering an opportunity for development of a targeted therapy for the most challenging breast cancer subtype. In preclinical studies, blocking IL-8 signaling has been shown to reduce tumor growth, inhibit angiogenesis, and enhance the response to chemotherapy and immunotherapy. In addition, while there is consistent data from in vitro and preclinical models, and a variety of synthesized IL-8 receptor antagonists and antibodies is available for testing, clinical data remains limited, and therefore clinical trials are of utmost importance to reveal the real-world potential of IL-8-CXCR1/2 pathway as a target in cancer. This review reported decades of cumulating evidence for the involvement of IL-8 in breast cancer. Here, we also added analysis from large tumor datasets to provide a comprehensive, expanded characterization of this cytokine in different breast cancer tumors, cell lines and their subtypes. IL-8 is an old foe that deserves to be revised and revived to the list of potential breast cancer targets. Overall, these findings contribute to our understanding of the role of IL-8 in triple negative breast cancer, providing a foundation for the development of targeted therapeutic strategies aimed at inhibiting invasion, migration, proliferation, and enhancing cell death in this aggressive subtype of breast cancer.

Materials and methods

Datasets search, import, and pre-process

The expression, with gene counts, and annotations matrices of healthy tissue samples were obtained from the Genotype-Tissue Expression - GTEx project, the cancers samples were obtained from The Cancer Genome Atlas - TCGA project, and cancer cell line (CCL) samples were obtained from the Cancer Cell Line

Encyclopedia - CCLE. GTEx data (V8, 05-2017) were obtained from gtexportal.org/home/datasets, CCLE data (counts expression matrix 20180929 and metadata - cell line annotations 20181226) from portals.broadinstitute.org/ccle/data and the TCGA data were obtained by applying functions from the *TCGAbiolinks* package. The data was normalized using the TMM method (trimmed mean of M-values) and computed the CPM (counts per million) by applying functions from the *edgeR* package.

CXCL8 mRNA expression analysis

To identify the IL-8 (gene symbol: *CXCL8*) expression profile in healthy tissue, tumors, and cancer cell lines panels, the CPM values were transformed into \log_{10} of CPM + 1 and 'binned' each sample according to one of the datasets metadata/variables. As it is predicted that different groups (e.g., tissues, cancer types) will demand distinct levels of gene activity, the inferred gene activity-normalized expression was calculated as described by Levings *et al.*, 2018. The IL-8 in breast cancer tumors was also explored for their Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) status assessed by immunohistochemistry (IHC), molecular subtype, pathology diagnosis and tumor stages. The tumor dataset contained the molecular subtypes triple-negative/basal-like, HER2-enriched, luminal A, luminal B, and normal-like (only in TCGA data). Since the claudin-low subtype is emerging as a meaningful breast cancer molecular subtype, some samples were reclassified into the Claudin-low subtype. To identify the claudin-low samples it was applied an unsupervised machine learning algorithm, K-Means clustering (K = 3), using the ComplexHeatmap package. The Shapiro-Wilk test was applied to analyze the normality of the data, Wilcoxon Rank Sum Test to compare two, and Kruskal-Wallis Rank Sum Test followed by Pairwise Wilcoxon Rank Sum Test with Benjamini–Hochberg corrections for multiple comparisons to compare more than two samples.

To identify transcriptional differences in breast cancers with high and low relative expression of *CXCL8*, it was performed a differential expression and functional enrichment analysis between cancer samples with the 25 % top and bottom expression values. First, the determination of which genes have sufficient counts to be retained in statistical analysis was made, then, it was used the trimmed-mean of M-values (TMM) normalization method to adjust the library sizes among

samples, computed appropriate observation-level weights using Voom, and adjusted linear models to each gene. Later, Bayes' empirical moderation was performed to obtain variability estimations between genes. These steps were made using *edgeR* and *limma* R package functions. Thresholds were applied to obtain differentially expressed genes (DEG) as follows: i) Benjamini-Hochberg procedure adjusted p -value ≤ 0.05 for the t -test (25 % top vs. bottom *CXCL8* expression values) and ii) positive absolute fold-change ≥ 2 . The gene ontology analysis via over-representation test (gene enrichment analysis, GEA) and gene set enrichment analysis (GSEA) were made by applying functions from the *clusterProfiler* package and using the collection H - Hallmark gene sets from the Molecular Signatures Database (MSigDB, v7.1) as background.

Single-cell RNA sequencing analysis

The count data, metadata with the designated cell type, and coordinates were downloaded for the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) dimensionality reduction UMAP of the Wu *et al.*, 2021 study on the singlecell.broadinstitute.org/ platform. The count data was normalized using the "LogNormalize" global-scaling normalization method, multiplied by a 10,000 scale factor, and log-transformed. In the complete set, it was investigated the proportion of cells, by cell type, in which *CXCL8* expression was detected (normalized counts > 0). In the myeloid subset (defined as the CD68+ cluster, by Wu *et al.*, 20XX) it was used a 95 G2/M and S phase markers expression profile to define the cell cycle phase, scaled the counts, and removed unwanted sources of variation from technical (X) and biological (cell cycle phase) variables. Principal Component Analysis was performed using all genes and determined the dimensionality of the myeloid dataset as defined by i) The point where the principal components only contribute 5% of the standard deviation and the principal components cumulatively contribute 90% of the standard deviation. ii) The point where the percent change in variation between the consecutive PCs is less than 0.1%, in our case, it was 18 dimensions. Myeloid cells were clustered using a resolution, or granularity, parameter of 0.4 and used UMAP to cluster portrayal in a lower-dimensional space. The top-5 positive cluster markers against all other cells were identified by differential expression.

To designate a myeloid cell subtype in the Wu *et al.*, 2021 dataset cells, a classification model was developed based on the transcriptional profile of myeloid

breast cancer cells (GSE114727) using the singleCellNet package. To do this, counts matrices were used as inputs. A training group (GSE114727) was set up using 50 samples of each myeloid cell subtype and “trained” using 200 classification genes and 100 gene pairs per category. To lower the false positives, it was established that cells with the 25 % lowest score values would not be classified. In the myeloid set, the proportion of cells were investigated, by cell type, as described.

Tissue microarray immunohistochemistry

The association between protein levels of IL-8 and Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), HER2, Marker of Proliferation Ki-67 and Tumor Protein p53 and breast tumor clinical stage, tumor grade and pathology diagnosis in patients with breast cancer were analyzed by immunohistochemistry (IHC) using BR1503 (US Biomax) tissue microarray (TMA) slides. The slides contained 3 cases of adjacent normal breast tissue and breast fibroadenoma (type benign), 2 breast cystosarcoma phyllodes, 7 breast intraductal carcinoma, and 60 breast invasive ductal carcinoma (each sample with duplicate slices, totaling 150 slices). A specific primary antibody against IL-8 (#E5F5Q) was used for IHC with a 2-step protocol.

Two evaluators withheld clinical data and analyzed the IL-8, ER, PR, HER2, and p53 immunoreactivity under an optical microscope. For quantification, all stains were evaluated at $\times 200$ magnification, counting three areas for each slice. The immunoreactivity was scored according to the intensity of cellular staining and the proportion of stained tumor cells. The intensity of cellular staining was scored as 0 (no staining), 1 (weak staining, light-yellow), 2 (moderate staining, brownish-yellow), and 3 (strong staining, brown). The proportions of stained cells were classified as 0 (0 % positive cells), 1 (1 % positive cells), 2 (2 - 10 % positive cells), 3 (11 - 33 % positive cells), 4 (34 - 66 % positive cells) and 5 (≥ 67 % positive cells). The sum of the intensity of cellular staining and the proportion of stained cells scores defines the level of IL-8, ER, PR, HER2, and p53 abundance. According to the final staining score, 0 - 2 was defined as low protein content (0 and 1 for HER2), while 3 - 8 as high expression for ER, PR, and p53, 3 - 5 as medium, and 6 - 8 as high for IL-8. For the molecular subtype, samples with protein content > 0 for ER, PR, without HER2 and Ki-67 proportion < 14 were classified as Luminal A-like, and those with the same receptor protein content but with Ki-67 proportion > 14 were classified as Luminal B-like; Samples with the protein content of ER, PR, and HER2 were classified as

Luminal B-like (HER2-positive); Samples without ER and PR but with HER2 content as HER2-positive and those without expression of ER, PR, and HER2 were classified as triple-negative.

Cell culture conditions

MDA-MB231, Hs578T, SKBR3, BT20, BT474 and MCF7 breast cancer cell lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection). Cell lines were grown in DMEM (Sigma-Aldrich; cat #D5796), supplemented with 10% FBS plus 1 × antibiotic: antimycotic solution (Sigma-Aldrich; cat#A5955) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

ELISA assay

ELISA was performed to determine the level of IL-8 protein in cell supernatants. Quantification of IL-8 content in culture medium was assessed using the Human IL-8 Elisa kit (Pierce Biotechnology). Culture media were diluted up to 50 times as appropriate for each target and concentration values were normalized by 10⁶ cells. ELISA was performed according to the manufacturer's instructions.

Invasion assay

Extracellular matrix (ECM) invasion potential of breast cancer cells was estimated using the QCMTM 24-Well Cell Invasion Assay Fluorometric (Millipore) according to Zanotto-Filho *et al* (2018). Serum-starved cells were trypsinized, centrifuged, and resuspended to 5000 cells/mL, and 50 mL of this suspension (250,000 cells) was seeded onto 8 mm pore-size inserts coated with ECM in serum-free conditions. Afterward, 200 mL of serum-free conditioned or fresh medium was added to the top chambers. The bottom chambers consisted of 250 mL of CM/fresh medium plus 250 mL of DMEM supplemented with 20% FBS as a chemoattractant. Cells were allowed to migrate for 24 and 48 h at 37 °C before the assay. Invaded cells were detached from the bottom side of the insert, lysed, and incubated with CyQuant GR fluorescent Dye for 15 min. Fluorescence was read at Ex/Em ¼ 480/520 nm. The percentage of invading cells was compared to cell number standard curves.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay. MDA-MB231 cells ($1 \cdot 10^4$ cells/well) were seeded in 96-well plates and treated with IL-8 inhibitor SB225002 (Sigma-Aldrich) ($100 \mu\text{M} - 1.5 \mu\text{M}$) or subjected to siRNA-mediated depletion of *CXCL8* (100 nM) when cell confluence reached approximately 50-60%. The cells were cultured in the presence of 10% FBS for 72 hours. Subsequently, the medium containing the treatment was removed, and the cells were fixed with 10% trichloroacetic acid at 4°C for 1 hour. After the fixation, the dye was added, and the cells were further incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. The cells were then dissolved with 1% acetic acid. The absorbance at 510 nm was measured using a microplate reader (Multireader Infinite M200 Tecan). The data were expressed as a percentage (%) of cell proliferation compared to DMSO/vehicle-treated controls.

siRNA-mediated knockdown

Small-interference RNA (siRNA) transfections were performed using Lipofectamine RNAi MAX Reagent following manufacturer instructions (Invitrogen). siRNA duplexes targeting human *CXCL8* (#sc-29435) and scrambled siRNA (#AM4611) were purchased from Santa Cruz Biotechnology and Ambion, respectively, and incubated at 100 nM for 24 h before treatments.

Wound closure assay

MDA-MB231 cells ($5 \cdot 10^4$ cells/well) were seeded into 24-well plates and when cells reached $\sim 90\%$ confluence, FBS was reduced to 1% (overnight). The cell monolayers were then scratched with a $200 \mu\text{L}$ pipette tip to create a wound, washed twice with PBS to remove floating cells, and then incubated in DMEM with 1% FBS plus siRNA transfection or IL-8 inhibitor SB225002 (Sigma-Aldrich) treatments. The closure was monitored at 0 and 24 h using a phase-contrast microscope (Olympus IX83). The wound area pre- and post-treatment was quantified using ImageJ software and expressed as a percentage of wound closure. Complete serum starvation was not used due to the loss of MDA-MB231 cell viability following 24 h starvation.

Clonogenic assay

MDA-MB231 cells ($3 \cdot 10^2$ cells/well) were seeded into 12-well plates, after 96h the cells were treated twice with 12,5 - 50 μ M IL-8 inhibitor SB225002, with an interval of 96h between each treatment. At the end of the second treatment (12 days) the colonies were fixed and stained. Each well was washed with 1x PBS, stained and fixed with Cell Stain (20294, Merck) for 15 min. Subsequently, the plates were submerged three times in H₂O to remove the dye and leftovers to dry at room temperature. Colony counts were performed using a stereomicroscope, considering colonies with more than 50 cells as colonies.

Propidium iodide staining

MDA-MB231 cells ($1 \cdot 10^5$ cells/well) were seeded into 12-well plates and when cells reached ~90% confluence, were treated with IL-8 inhibitor SB225002 (Sigma-Aldrich) (12,5 μ M – 50 μ M). The cells were cultured in the presence of 10% FBS for 48 hours. Subsequently, the medium containing the treatment was removed, and 1 μ g/mL of propidium iodide solution was incubated at 37°C for 1 hour. The cells were then washed with 1x PBS and 2 μ g/mL of DAPI and incubated in the dark for 15 minutes.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance code 001.

Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC).

6 COLABORAÇÕES

1. Rosângela Mayer Gonçalves, Marina Delgobo, Jonathan Paulo Agnes, Raquel Nascimento das Neves, Marcelo Falchetti, Tuany Casagrande, Ana Paula Vargas Garcia, Thaynan Cunha Vieira, Nauana Somensi, Maciel Alencar Bruxel, Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes, Alex Rafacho, André Báfica, Daniel Pens Gelain, José Cláudio Fonseca Moreira, Geovanni Dantas Cassali, Alexander James Roy Bishop, Alfeu Zanotto-Filho, **COX-2 promotes mammary adipose tissue inflammation, local estrogen biosynthesis, and carcinogenesis in high-sugar/fat diet treated mice**, *Cancer Letters*, Volume 502, 2021, Pages 44-57, ISSN 0304-3835, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.003>.
2. Marina Delgobo, Rosângela Mayer Gonçalves, Marco Antônio Delazeri, Marcelo Falchetti, Alessandro Zandoná, Raquel Nascimento das Neves, Karoline Almeida, Adriane Cristina Fagundes, Daniel Pens Gelain, João Isidro Fracasso, Guilherme Baroni de Macêdo, Leonardo Priori, Nicklas Bassani, Alexander James Roy Bishop, Cassiano Mateus Forcelini, José Cláudio Fonseca Moreira, Alfeu Zanotto-Filho, **Thioredoxin reductase-1 levels are associated with NRF2 pathway activation and tumor recurrence in non-small cell lung cancer**, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 177, 2021, Pages 58-71, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.020>.
3. Jonathan Paulo Agnes; Vitória Wibbelt Dos Santos; Raquel Nascimento das Neves; Rosângela Mayer Gonçalves; Marina Delgobo; Carolina Saibro Girardi; Débora Denardin Lückemeyer; Marcella De Amorim Ferreira; Sérgio José Macedo-Júnior; Samantha Cristiane Lopes; Fernando Spiller; Daniel Pens Gelain; José Cláudio Fonseca Moreira; Rui Daniel Prediger; Juliano Ferreira; Alfeu Zanotto-Filho. **Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress And Inflammation**. *Journal Of Pain*, V. 22, P. 996-1013, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.03.142>.
4. Marcelo Falchetti, Marina Delgobo, Helena Zancanaro, Karoline Almeida, Raquel Nascimento das Neves, Barbara dos Santos, Natália Stefanos, Alexander Bishop, Maria Claudia Santos-Silva, Alfeu Zanotto-Filho, **Omics-based identification of a NRF2-related auranofin resistance signature in cancer: insights into drug repurposing**, *Computers in Biology and Medicine*, v. 152, p. 106347, 2023. [10.1016/j.combiomed.2022.106347](https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.106347).

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo abordou a complexa relação entre IL-8, células imunes, e mutações GOF em *TP53* no câncer de mama. Em relação às mutações GOF em *TP53*, foi observado que a sua depleção tornou as linhagens celulares de TNBC mais suscetíveis ao tratamento com MMS e cisplatina, além de diminuir a invasão, migração e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo CXCL2, IL-8 e IL-6 em linhagens celulares de TNBC. Esses efeitos não afetaram moléculas associadas à malignidade do câncer de mama reguladas pela via de sinalização ERK1/2 MAPK. No entanto, a combinação da redução das mutações GOF em *TP53* com a inibição da via MEK/ERK1/2 resultou em uma inibição mais acentuada de IL-8 e IL-6, além de reduzir a invasão e migração celular em comparação com os tratamentos isolados. Embora a redução das mutações GOF do *TP53* não tenha afetado diretamente a atividade do NFκB ou a fosforilação do MEK/ERK1/2, ela diminuiu a atividade do NFκB no núcleo, sugerindo seu papel na regulação da atividade do NFκB em modelos de linhagens celulares de TNBC. Foi observada uma expressão ampla de *CXCL8* em diferentes tipos de linhagens celulares, com variações significativas dentro do mesmo tecido tumoral. Os resultados revelaram uma associação entre níveis elevados de *CXCL8* e uma resposta inflamatória aumentada, bem como uma diminuição na resposta ao estrogênio em tumores de mama. Além disso, linhagens celulares basais/claudin-low exibiram níveis mais altos de *CXCL8* e maior invasividade. A depleção de *CXCL8* resultou em uma diminuição significativa na viabilidade, invasão e migração de linhagens celulares de câncer de mama, destacando o papel fundamental dessa citocina na malignidade tumoral. Esses achados proporcionam informações importantes sobre a interação entre a IL-8, mutações GOF em *TP53* e resposta inflamatória no câncer de mama, destacando alvos terapêuticos e estratégias potenciais para melhorar a eficácia do tratamento desse tipo de câncer.

REFERÊNCIAS

- ACETO, Nicola *et al.* Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion. *Breast Cancer Research*, [s. l.], v. 14, n. 5, 2012.
- ACHARYYA, Swarnali *et al.* A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 165–178, 2012.
- ADNANE, Lila *et al.* Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a Dual-Action Inhibitor That Targets RAF/MEK/ERK Pathway in Tumor Cells and Tyrosine Kinases VEGFR/PDGFR in Tumor Vasculature. [S. l.]: Academic Press Inc., 2006.
- AGGARWAL, Bharat B.; SUNG, Bokyung. NF- κ B in cancer: A matter of life and death. *Cancer Discovery*, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 469–471, 2011.
- ALEXANDROVA, E. M. *et al.* Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature*, [s. l.], v. 523, n. 7560, p. 352–356, 2015.
- ALI, Amjad; SHAH, Abdus Saboor; AHMAD, Ayaz. Gain-of-function of mutant p53: Mutant p53 enhances cancer progression by inhibiting KLF17 expression in invasive breast carcinoma cells. *Cancer Letters*, [s. l.], v. 354, n. 1, p. 87–96, 2014.
- ALVARADO-ORTIZ, Eduardo *et al.* Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2021.
- ANDERSON, Kristin N.; SCHWAB, Richard B.; MARTINEZ, Maria Elena. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: A review of the literature. [S. l.]: Springer New York LLC, 2014.
- AUBREY, Brandon J. *et al.* How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.
- AUPPERLEE, Mark D. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling is a key mediator of hormone-induced leukocyte infiltration in the pubertal female mammary gland. *Endocrinology*, [s. l.], v. 155, n. 6, p. 2301–2313, 2014.
- BAGHBAN, Roghayyeh *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2020.
- BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet*, [s. l.], v. 357, n. 9255, p. 539–545, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600040460>. Acesso em: 24 ago. 2022.
- BARABUTIS, Nektarios; SCHALLY, Andrew V.; SIEJKA, Agnieszka. P53, GHRH, inflammation and cancer. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.
- BARCHIESI, Giacomo *et al.* Emerging Role of PARP Inhibitors in Metastatic Triple Negative Breast Cancer. Current Scenario and Future Perspectives. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2021.

BARTHOLOMEUSZ, Chandra *et al.* High ERK Protein Expression Levels Correlate with Shorter Survival in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *The Oncologist*, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 766–774, 2012.

BASU, Ashis K. DNA damage, mutagenesis and cancer. [S. l.]: MDPI AG, 2018.

BECKERMAN, R.; PRIVES, C. Transcriptional Regulation by P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [s. l.], v. 2, n. 8, p. a000935–a000935, 2010. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a000935>.

BELLAZZO, Arianna; DI MININ, Giulio; COLLAVIN, Licio. Cytoplasmic gain-of-function mutant p53 contributes to inflammation-associated cancer. *Molecular and Cellular Oncology*, [s. l.], v. 2, n. 4, 2015.

BERNARD, Philip S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 2009.

BERRAONDO, Pedro *et al.* Cytokines in clinical cancer immunotherapy. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.

BIANCHINI, Giampaolo *et al.* Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options, evolving needs. [S. l.]: Nature Research, 2022.

BILUSIC, Marijo *et al.* Phase i trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2019.

BLAGIH, Julianna; BUCK, Michael D.; VOUSDEN, Karen H. P53, cancer and the immune response. [S. l.]: NLM (Medline), 2020.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018a.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018b. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>.

BROSH, Ran; ROTTER, Varda. When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer*, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 701–713, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2693>.

BYKOV, Vladimir J.N. *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine*, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 282–288, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm0302-282>.

CANDEIAS, M *et al.* Drugs Targeting p53 Mutations with FDA Approval and in Clinical Trials. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers15020429>.

CAPACI, Valeria *et al.* Mutant p53 induces Golgi tubulo-vesiculation driving a prometastatic secretome. *Nature Communications*, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.

CARGNELLO, Marie; ROUX, Philippe P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00031-10>.

CERSOSIMO, Robert J. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors for the management of advanced or metastatic breast cancer in women. [S. l.]: Oxford University Press, 2019.

CHA, Jong Ho *et al.* Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. [S. l.]: Cell Press, 2019.

CHA, Soojin; LEE, Esak; WON, Hong Hee. Comprehensive characterization of distinct genetic alterations in metastatic breast cancer across various metastatic sites. *npj Breast Cancer*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2021.

CHEN, Erbao *et al.* Identification of Potential Therapeutic Targets among CXC Chemokines in Breast Tumor Microenvironment Using Integrative Bioinformatics Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 1731–1746, 2018.

CHEN, Shao jie *et al.* Tumor-driven like macrophages induced by conditioned media from pancreatic ductal adenocarcinoma promote tumor metastasis via secreting IL-8. *Cancer Medicine*, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 5679–5690, 2018.

CHEN, Edward P; SMYTH, Emer M. COX-2 and PGE 2-dependent immunomodulation in breast cancer. [s. l.], 2011.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. [S. l.: s. n.], 2002.

CRUZ-BERMÚDEZ, Alberto *et al.* The role of metabolism in tumor immune evasion: Novel approaches to improve immunotherapy. [S. l.]: MDPI AG, 2021.

CURTIS, Christina *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, [s. l.], v. 486, n. 7403, p. 346–352, 2012.

CURTIS, C., *et al.* The Cancer Genome Atlas Network. *Nature*, [s. l.], v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

DAI, Xiaofeng *et al.* Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. [S. l.]: Ivyspring International Publisher, 2016.

DASARI, Pallave *et al.* Hormonal regulation of the cytokine microenvironment in the mammary gland. *Journal of Reproductive Immunology*, [s. l.], v. 106, p. 58–66, 2014.

DAVID, Justin M. *et al.* The IL-8/IL-8R axis: A double agent in tumor immune resistance. [S. l.]: MDPI AG, 2016.

- DAVIS LYNN, Brittny C. *et al.* Black-white breast cancer incidence trends: Effects of ethnicity. *Journal of the National Cancer Institute*, [s. l.], v. 110, n. 11, 2018.
- DI MININ, Giulio *et al.* Mutant p53 Reprograms TNF Signaling in Cancer Cells through Interaction with the Tumor Suppressor DAB2IP. *Molecular Cell*, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 617–629, 2014.
- DIWAKAR, Bastihalli T. *et al.* The Regulation of Pathways of Inflammation and Resolution in Immune Cells and Cancer Stem Cells by Selenium. *Em: ADVANCES IN CANCER RESEARCH*. [S. l.]: Academic Press Inc., 2017. v. 136, p. 153–172.
- DOMINGUEZ, Charli *et al.* Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. *JCI Insight*, [s. l.], v. 2, n. 21, 2017.
- DUBSKY, P. *et al.* The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2-breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, [s. l.], v. 109, n. 12, p. 2959–2964, 2013.
- EBERT, Peter J.R. *et al.* MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity*, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 609–621, 2016.
- FAVATA, Margaret F. *et al.* Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, [s. l.], v. 273, n. 29, p. 18623–18632, 1998.
- FENG, Yixiao *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. [S. l.]: Chongqing University, 2018.
- FERNANDO, Romaine I. *et al.* IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Research*, [s. l.], v. 71, n. 15, p. 5296–5306, 2011.
- FORBES, Simon A. *et al.* COSMIC: Mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 39, n. SUPPL. 1, 2011.
- FOUGNER, Christian *et al.* Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nature Communications*, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.
- FREED-PASTOR, William A. *et al.* Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*, [s. l.], v. 148, n. 1–2, p. 244–258, 2012.
- GAIDDON, C. *et al.* A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain. *Molecular and Cellular Biology*, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1874–1887, 2001.
- GINESTIER, Christophe *et al.* CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *Journal of Clinical Investigation*, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 485–497, 2010.

GIRARDINI, Javier E. *et al.* A Pin1/Mutant p53 Axis Promotes Aggressiveness in Breast Cancer. *Cancer Cell*, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 79–91, 2011.

GOLDSTEIN, Lori J. *et al.* A window-of-opportunity trial of the CXCR1/2 inhibitor reparixin in operable HER-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, [s. l.], v. 22, n. 1, 2020.

GONZALEZ-APARICIO, Manuela; ALFARO, Carlos. Significance of the IL-8 pathway for immunotherapy. [S. l.]: Bellwether Publishing, Ltd., 2020.

GRETEN, Florian R.; GRIVENNIKOV, Sergei I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. [S. l.]: Cell Press, 2019.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. [S. l.: s. n.], 2010.

GU, Yunyan *et al.* Network analysis of genomic alteration profiles reveals co-altered functional modules and driver genes for glioblastoma. *Molecular BioSystems*, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 467–477, 2013.

HA, Helen; DEBNATH, Bikash; NEAMATI, Nouri. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. [S. l.]: Ivyspring International Publisher, 2017.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. [S. l.]: American Association for Cancer Research Inc., 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. [S. l.: s. n.], 2011b.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. [S. l.: s. n.], 2011c.

HATZIDAKI, Eleana *et al.* Novel small molecule decreases cell proliferation, migration, clone formation, and gene expression through ERK inhibition in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 618–627, 2019.

HIRAI, Hiroshi *et al.* Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Molecular Cancer Therapeutics*, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 2992–3000, 2009.

HYNES, Nancy E.; WATSON, Christine J. Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. [S. l.: s. n.], 2010.

INCA. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. [S. l.: s. n.], 2023.

JIANG, Mengmeng *et al.* Interleukin-6 trans-signaling pathway promotes immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells via suppression of suppressor of cytokine signaling 3 in breast cancer. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 8, n. DEC, 2017.

JIANG, Huning *et al.* Targeting IL8 as a sequential therapy strategy to overcome chemotherapy resistance in advanced gastric cancer. *Cell Death Discovery*, [s. l.], v. 8, n. 1, 2022.

KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W. Putting p53 in Context. [S. l.]: Cell Press, 2017.

KIRCHBERGER, Michael Constantin *et al.* MEK inhibition may increase survival of NRAS-mutated melanoma patients treated with checkpoint blockade: Results of a retrospective multicentre analysis of 364 patients. *European Journal of Cancer*, [s. l.], v. 98, p. 10–16, 2018.

KOBOLDT, Daniel C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, [s. l.], v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

KOREN, Shany; BENTIREN-ALJ, Mohamed. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. [S. l.]: Cell Press, 2015.

KORKAYA, Hasan; LIU, Suling; WICHA, Max S. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. [S. l.: s. n.], 2011.

KRAUS, Matthias H; YUASA, Yasuhito; AARONSON, Stuart A. A position 12-activated H-ras oncogene in all HS578T mammary carcinosarcoma cells but not normal mammary cells of the same patient (DNA transfection/molecular cloning/point mutation/somatic activation) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. [S. l.: s. n.], 1984.

KWON, Jeanny *et al.* A prognostic model for patients with triple-negative breast cancer: Importance of the modified nottingham prognostic index and age. *Journal of Breast Cancer*, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 65–73, 2017.

LABANI-MOTLAGH, Alireza; ASHJA-MAHDAVI, Mehrnosh; LOSKOG, Angelica. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020.

LEROY, Bernard; ANDERSON, Martha; SOUSSI, Thierry. TP53 mutations in human cancer: Database reassessment and prospects for the next decade. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc., 2014.

LI, Hui *et al.* Targeting the oncogenic p53 mutants in colorectal cancer and other solid tumors. [S. l.]: MDPI AG, 2019.

LIANG, Yayun *et al.* Combined treatment with p53-activating drug APR-246 and a phosphatidylserine-targeting antibody, 2aG4, inhibits growth of human triple-negative breast cancer xenografts. *Cancer Reports and Reviews*, [s. l.], v. 4, n. 2, 2020.

LIN, Shu *et al.* Intrinsic adriamycin resistance in p53-mutated breast cancer is related to the miR-30c/FANCF/REV1-mediated DNA damage response. *Cell Death and Disease*, [s. l.], v. 10, n. 9, 2019.

LIU, Yu *et al.* Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. *Nature*, [s. l.], v. 531, n. 7595, p. 471–475, 2016.

LIU, Juan; ZHANG, Cen; FENG, Zhaohui. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 170–179, 2014a.

LIU, Juan; ZHANG, Cen; FENG, Zhaohui. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. [S. l.: s. n.], 2014b.

LIUBOMIRSKI, Yulia *et al.* Tumor-stroma-inflammation networks promote pro-metastatic chemokines and aggressiveness characteristics in triple-negative breast cancer. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 10, n. APR, 2019.

LOI, Sherene *et al.* RAS/MAPK activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: Therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *Clinical Cancer Research*, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1499–1509, 2016.

MA, Cynthia X. *et al.* A phase II trial of neoadjuvant MK-2206, an AKT inhibitor, with anastrozole in clinical stage II or III PIK3CA-mutant ER-positive and HER2-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, [s. l.], v. 23, n. 22, p. 6823–6832, 2017.

MA, Yunfeng *et al.* IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 421–426, 2017.

MAI, Phuong L. *et al.* Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer*, [s. l.], v. 122, n. 23, p. 3673–3681, 2016.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Cancer-related inflammation. [S. l.: s. n.], 2008.

MARTINEZ, Elizabeth *et al.* 392 Phase 1 study of CI-8993 anti-VISTA antibody in patients with advanced solid tumor malignancies. *Em:* , 2020. *Anais [...]*. [S. l.]: BMJ, 2020. p. A238–A239.

MCCUBREY, James A.; LAHAIR, Michelle M.; FRANKLIN, Richard A. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of the MAP Kinase Signaling Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, [s. l.], v. 8, n. 9–10, p. 1775–1789, 2006. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2006.8.1775>.

MITTAL, Suruchi *et al.* Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Molecular Cancer*, [s. l.], v. 8, 2009.

MOREIN, Dina; ERLICHMAN, Nofar; BEN-BARUCH, Adit. Beyond Cell Motility: The Expanding Roles of Chemokines and Their Receptors in Malignancy. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020.

MULLER, Patricia A.J. *et al.* Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell*, [s. l.], v. 139, n. 7, p. 1327–1341, 2009.

NAJDAGHI, Soroush; RAZI, Sepideh; REZAEI, Nima. An overview of the role of interleukin-8 in colorectal cancer. [S. l.]: Academic Press, 2020.

NANDA, Rita *et al.* Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: Phase Ib keynote-012 study. *Journal of Clinical Oncology*, [s. l.], v. 34, n. 21, p. 2460–2467, 2016.

NILAND, Stephan; RISCANEVO, Andrea Ximena; EBLE, Johannes Andreas. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. [S. l.]: MDPI, 2022.

NING, Yan *et al.* The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models. *Molecular Cancer Therapeutics*, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1353–1364, 2012.

ORIGANTI, S. *et al.* Synthetic lethality of Chk1 inhibition combined with p53 and/or p21 loss during a DNA damage response in normal and tumor cells. *Oncogene*, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 577–588, 2013.

PALANIKUMAR, L. *et al.* Protein mimetic amyloid inhibitor potently abrogates cancer-associated mutant p53 aggregation and restores tumor suppressor function. *Nature Communications*, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021.

PAN, Yueyun *et al.* Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020.

PARRALES, Alejandro; IWAKUMA, Tomoo. Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2015.

PITOLLI, Consuelo *et al.* P53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms. [S. l.]: MDPI AG, 2019.

POMMIER, Roxane M. *et al.* Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution. *Nature Communications*, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.

PRAT, Aleix *et al.* Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Research and Treatment*, [s. l.], v. 142, n. 2, p. 237–255, 2013.

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

PRAT, Aleix; PEROU, Charles M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2011.

PUA, Lesley Jia Wei *et al.* Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma. [S. l.]: MDPI, 2022.

QAZI, Basit Saleem; TANG, Kai; QAZI, Asma. Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. *International Journal of Inflammation*, [s. l.], v. 2011, p. 1–13, 2011.

RAHNAMOUN, Homa *et al.* Mutant p53 shapes the enhancer landscape of cancer cells in response to chronic immune signaling. *Nature Communications*, [s. l.], v. 8, n. 1, 2017.

RAKHA, Emad A *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 207, 2010. Disponível em: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2607>. Acesso em: 2 ago. 2023.

RANGEL, Luciana P. *et al.* P53 reactivation with induction of massive apoptosis-1 (PRIMA-1) inhibits amyloid aggregation of mutant p53 in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, [s. l.], v. 294, n. 10, p. 3670–3682, 2019.

REAPER, Philip M. *et al.* Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nature Chemical Biology*, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 428–430, 2011.

REED, Johanna R.; SCHWERTFEGER, Kathryn L. Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. [S. l.: s. n.], 2010.

RUSSO, Remo C. *et al.* The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. [S. l.]: Expert Reviews Ltd., 2014.

SABAPATHY, Kanaga; LANE, David P. Therapeutic targeting of p53: All mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 13–30, 2018a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.151>.

SABAPATHY, Kanaga; LANE, David P. Therapeutic targeting of p53: All mutants are equal, but some mutants are more equal than others. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018b.

SABAPATHY, Kanaga; LANE, David P. Therapeutic targeting of p53: All mutants are equal, but some mutants are more equal than others. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018c.

SANCHEZ-VEGA, Francisco *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, [s. l.], v. 173, n. 2, p. 321-337.e10, 2018.

SANTARPIA, Libero; LIPPMAN, Scott M.; EL-NAGGAR, Adel K. Targeting the MAPKRASRAF signaling pathway in cancer therapy. [S. l.: s. n.], 2012.

SCHETTER, Aaron J.; HEEGAARD, Niels H.H.; HARRIS, Curtis C. Inflammation and cancer: Interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. [S. l.: s. n.], 2009.

SHARON, Yoray *et al.* Tumor-derived osteopontin reprograms normal mammary fibroblasts to promote inflammation and tumor growth in breast cancer. *Cancer Research*, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 963–973, 2015.

SHI, Di; JIANG, Peng. A Different Facet of p53 Function: Regulation of Immunity and Inflammation During Tumor Development. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2021.

SINGH, Jagdeep K *et al.* Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Research*, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 210, 2013. Disponível em: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3436>.

SINGH, Seema *et al.* Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 2380–2386, 2009.

SMITH, Shannon M.; LYU, Yi Lisa; CAI, Li. NF- κ B affects proliferation and invasiveness of breast cancer cells by regulating CD44 expression. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 9, n. 9, 2014.

SONG, Yanlin *et al.* Targeting RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials. [S. l.]: KeAi Communications Co., 2023.

SOUSSI, Thierry; MAY, Pierre. Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution: A Second Look. *J. Mol. Biol.* [S. l.: s. n.], 1996.

STEIN, Yan; ROTTER, Varda; ALONI-GRINSTEIN, Ronit. Gain-of-function mutant p53: All the roads lead to tumorigenesis. [S. l.]: MDPI AG, 2019.

STIEWE, Thorsten; HARAN, Tali E. How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance. *Drug Resistance Updates*, [s. l.], v. 38, p. 27–43, 2018.

STOKOE, David *et al.* Activation of Raf as a Result of Recruitment to the Plasma Membrane. *Science*, [s. l.], v. 264, n. 5164, p. 1463–1467, 1994. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7811320>.

SUN, Xuan *et al.* CCL2-driven inflammation increases mammary gland stromal density and cancer susceptibility in a transgenic mouse model. *Breast Cancer Research*, [s. l.], v. 19, n. 1, 2017.

SUN, Shao Cong. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2017.

SUN, Woo Young; LEE, Yu Kyung; KOO, Ja Seung. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *Journal of Translational Medicine*, [s. l.], v. 14, n. 1, 2016.

SUN, Chong; MEZZADRA, Riccardo; SCHUMACHER, Ton N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. [S. l.]: Cell Press, 2018.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAN, Puay Hoon *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2020.

TANIGUCHI, Koji; KARIN, Michael. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.

TENTORI, Lucio; GRAZIANI, Grazia. Chemopotential by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacological Research*, [s. l.], v. 52, n. 1 SPEC. ISS., p. 25–33, 2005.

TSANG, Julia Y S; TSE, Gary M. Molecular Classification of Breast Cancer. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: www.anatomicpathology.com. .

TUNG, Nadine; GARBER, Judy E. PARP inhibition in breast cancer: progress made and future hopes. [S. l.]: Nature Research, 2022.

TURNER, Kevin M. *et al.* Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. [S. l.]: American Physiological Society, 2021.

URSO, Loredana *et al.* Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment. [S. l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2016.

VOLODKO, Nataliya *et al.* Low infiltration of tumor-associated macrophages in high c-Myb-expressing breast tumors. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

WANG, Ji *et al.* Matrix metalloproteinase-1 expression in breast carcinoma: a marker for unfavorable prognosis. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: www.impactjournals.com/oncotarget. .

WANG, Qi Min *et al.* MMP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancer tissues and the knockdown of MMP-1 expression inhibits tumor cell malignant behaviors in vitro. *Oncology Letters*, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 1732–1740, 2019.

WANG, Dingzhi; DUBOIS, Raymond N. Eicosanoids and cancer. [S. l.: s. n.], 2010.

WIDMANN, Christian *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. [S. l.: s. n.], 1999. Disponível em: www.physiology.org/journal/physrev. .

WILHELM, Scott *et al.* Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2006.

WILSON, Florence R. *et al.* Herceptin® (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: Protocol for a systematic review and cumulative network meta-analysis. *Systematic Reviews*, [s. l.], v. 6, n. 1, 2017.

WU, Sunny Z. *et al.* A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nature Genetics*, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 1334–1347, 2021.

XIA, Yifeng; SHEN, Shen; VERMA, Inder M. NF- κ B, an active player in human cancers. [S. l.: s. n.], 2014.

XIAO, Gu *et al.* Gain-of-function mutant p53 R273H interacts with replicating DNA and PARP1 in breast cancer. *Cancer Research*, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 394–405, 2020.

XU, Nana *et al.* Shionone suppresses the growth, migration and invasion of human breast cancer cells via induction of apoptosis and inhibition of MEK/ERK and STAT3 signalling pathways. *JBUON*, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 1821–1826, 2020.

YEUDALL, W. Andrew *et al.* Gain-of-function mutant p53 upregulates CXC chemokines and enhances cell migration. *Carcinogenesis*, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 442–451, 2012.

YIN, Li *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2020.

YUAN, Jimin *et al.* The MAPK and AMPK signalings: Interplay and implication in targeted cancer therapy. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2020a.

YUAN, Jimin *et al.* The MAPK and AMPK signalings: Interplay and implication in targeted cancer therapy. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2020b.

YUE, Xuetian *et al.* Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. [S. l.]: Academic Press, 2017.

ZAFRAKAS, Menelaos; PAPASOZOMENOU, Panayiota; EMMANOUILIDES, Christos. Sorafenib in breast cancer treatment: A systematic review and overview of clinical trials. *World Journal of Clinical Oncology*, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 331–336, 2016.

ZANOTTO-FILHO, Alfeu *et al.* Sorafenib improves alkylating therapy by blocking induced inflammation, invasion and angiogenesis in breast cancer cells. *Cancer Letters*, [s. l.], v. 425, p. 101–115, 2018.

ZHAO, Huakan *et al.* Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. [S. l.]: Springer Nature, 2021.