

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

FELIPE GARCIA NISHIMURA

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE ANÁLOGOS DE
CURCUMINA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

RIBEIRÃO PRETO

2023

FELIPE GARCIA NISHIMURA

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE ANÁLOGOS DE
CURCUMINA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada à Universidade de Ribeirão Preto
UNAERP, como requisito para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

N724c NISHIMURA, Felipe Garcia, 1995-
Caracterização do efeito anticâncer de análogos de curcumina em
linhagens de câncer de mama / Felipe Garcia Nishimura. – Ribeirão
Preto, 2023.
87 f. : il. color.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Lucia Fachin.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Doutorado em Bioecnologia, 2023.

1. Células MCF-7. 2. Neoplasias de mama triplo negativas.
3. Curcumina. II. Título.

CDD 660

FELIPE GARCIA NISHIMURA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE ANÁLOGOS DE
CURCUMINA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 26 de outubro de 2023

Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO

Data: 06/11/2023 13:55:11-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto
Presidente/Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente



MOZART DE AZEVEDO MARINS

Data: 30/10/2023 15:39:43-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente



RENE DE OLIVEIRA BELEBONI

Data: 01/11/2023 13:36:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Prof. Dr. Brian Bandy
Universidade de Saskatchewan

Valeria

Valente:19504484875

Date: 2023.10.31

11:23:08-03'00'

Profa. Dra. Valéria Valente
Universidade Estadual Paulista – UNESP

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha família pelo apoio incondicional e pela educação que me proporcionaram e continuam a oferecer. Nem todos têm a sorte de ter o apoio para seguir uma carreira acadêmica, e por isso sou imensamente grato.

Além disso, quero estender meus agradecimentos especiais a alguns parentes, em particular, ao tio Celso e à tia Rita, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim em todas as minhas conquistas. Também não posso deixar de mencionar os Tchucas Brothers, com quem compartilhei momentos de descontração que foram essenciais ao longo dessa jornada.

Um agradecimento mais que especial vai para Ana, minha sogra, que desde o início me apoiou e incentivou com seu carinho e apoio.

Para Thais, minha noiva, quero expressar minha profunda gratidão pelo companheirismo, apoio, suporte, carinho e amor incondicionais. Ela é a pessoa que mais sabe sobre tudo o que passei, seja nos momentos bons, ruins, de ansiedade ou frustrações. Sempre ao meu lado, ela me faz acreditar que sou capaz de alcançar tudo o que almejo.

Não posso deixar de agradecer também à minha orientadora, professora Ana Lucia, que me proporcionou inúmeras oportunidades, desde a bolsa de treinamento técnico até a bolsa de doutorado sanduíche. Além dela, quero estender meus agradecimentos ao professor Mozart, parceiro para além das obrigações laboratoriais. A ambos devo todas as oportunidades, experiências, conquistas e, talvez o mais importante, todo o conhecimento que adquiri nos últimos anos. Suas amizades e companheirismo também são inestimáveis.

Agradeço especialmente o professor Brian, que além de supervisor no meu estagio no Canadá, se tornou um grande amigo e parceiro.

Agradeço de coração a todos que compartilharam o laboratório comigo, desde aqueles que me ensinaram quando eu ainda não tinha experiência até os alunos de Iniciação Científica, tanto aqueles que orientei quanto aqueles que não orientei. Entre eles, quero fazer um agradecimento especial a Guilherme, que compartilhou conhecimento, discutiu meus dados, me ajudou a refletir e sempre esteve disponível para aprender, além de acreditar no meu potencial e me ajudar a acreditar em mim mesmo.

Do fundo do meu coração, agradeço a todos por fazerem parte da minha jornada. Obrigado!

Há de vir o tempo no qual uma pesquisa diligente durante longos períodos revelará coisas que hoje estão ocultas. A duração de uma vida, mesmo que toda dedica ao céu, não seria suficiente para a investigação de um tempo de um tema tão vasto [...]. E por isso esse conhecimento só se desdobrará ao longo de sucessivas eras. Virá um tempo no qual nossos descendentes ficarão espantados com o fato de que não sabíamos de coisas que para eles serão tão evidentes [...]. Muitas descobertas estão reservadas para épocas ainda por vir, quando a lembrança sobre nós estará apagada. Nosso universo é um caso lamentavelmente ínfimo, a menos que encerre coisas que cada época terá de investigar [...]. A natureza não revela seus mistérios de uma só vez.

Sêneca

O universo é conhecível, alegavam os antigos jônios, porque ele demonstra ter uma ordenação interna: há regularidades na natureza que permitem que seus segredos sejam descobertos. A natureza não é de todo imprevisível; existem regras às quais até ela tem de obedecer.

Carl Sagan

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte globalmente, com o câncer de mama sendo um dos tipos mais comuns e letais. Apesar de ser um tipo de câncer com melhor prognóstico, os tratamentos ainda são muito agressivos e inespecíficos. Por isso, há muitas pesquisas que buscam novas moléculas com atividades antitumorais, principalmente as moléculas de origem natural. A curcumina tem sido utilizada popularmente por apresentar atividade antioxidante e antitumoral. Entretanto a baixa biodisponibilidade da curcumina tem levado os pesquisadores a sintetizarem moléculas análogas. Este estudo avaliou o potencial antitumoral de moléculas análogas à curcumina em linhagens de câncer de mama responsiva (MCF-7) e não responsiva a hormônios (BT-20). O análogo NC2603 se destacou, demonstrando alta atividade citotóxica com valores de IC₅₀ de 3,5 µM para a linhagem BT-20 e 5,6 µM para a linhagem MCF-7. Além disso, induziu apoptose em 63% das células da linhagem BT-20 e inibiu a migração de mais de 50% das células na concentração de 0,75µM. A análise do transcriptoma revelou a expressão diferencial de milhares de genes após o tratamento com NC2603. Alguns genes foram relacionados à supressão da migração celular, podendo ser o mecanismo pelo qual o análogo NC2603 agiu na linhagem BT-20. Na linhagem MCF-7, foram identificados genes associados ao ciclo celular, indicando um possível efeito de arrasto no ciclo celular, confirmado posteriormente por citometria de fluxo. Surpreendentemente, o análogo NC2603, ao contrário do esperado, induziu a produção de espécies reativas de oxigênio em um estudo conduzido na Universidade de Saskatchewan, Canadá, o que pode explicar sua citotoxicidade contra células de adenocarcinoma colorretal Caco-2. Em resumo, o análogo NC2603 demonstrou atividades antitumorais significativas, afetando a proliferação, morte e migração celular, bem como influenciando a expressão de genes envolvidos nessas vias. Esses resultados fornecem insights valiosos para o desenvolvimento de novos compostos e estratégias terapêuticas direcionadas ao câncer de mama e outras formas de câncer.

Palavras-chave: MCF-7; BT-20; Luminal-A; Triplo-negativo; Curcumina; Análogos-de-curcumina.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading global causes of death, with breast cancer being one of the most common and lethal types. Despite having a better prognosis compared to other cancers, treatments are still highly aggressive and non-specific. Therefore, extensive research is being conducted to identify new molecules with antitumor activities, particularly natural origin molecules. Curcumin has been widely used due to its antioxidant and antitumor properties. However, the low bioavailability of curcumin has prompted researchers to synthesize analog molecules. This study evaluated the antitumor potential of curcumin analog molecules in breast cancer cells lines responsive (MCF-7) and non-responsive (BT-20) to hormones. The analog NC2603 stood out, demonstrating high cytotoxic activity with IC₅₀ values of 3.5 μ M for the BT-20 cell line and 5.6 μ M for the MCF-7 cell line. Additionally, it induced apoptosis in 63% of BT-20 cells and inhibited the migration of over 50% of cells in a concentration of 0.75 μ M. Transcriptome analysis revealed differential gene expression in thousands of genes after treatment with NC2603. Among these genes, some were related to the suppression of cell migration, potentially explaining the mechanism by which NC2603 acted in the BT-20 cell line. In the MCF-7 cell line, genes associated with the cell cycle were identified, indicating a possible cell cycle arrest effect, later confirmed by flow cytometry. Surprisingly, NC2603 analog, contrary to expectations, induced the production of reactive oxygen species in a foreign study at the University of Saskatchewan, Canada, which may explain its cytotoxicity against colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells. In summary, NC2603 analog demonstrated significant antitumor activities, affecting cell proliferation, apoptosis, and migration, while also influencing the expression of genes involved in these pathways. These results provide valuable insights for the development of new compounds and targeted therapeutic strategies for breast cancer and other cancer types.

Keywords: MCF-7; BT-20; Luminal-A; Triple-negative; Curcumin; Curcumin-analogues.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	CÂNCER	10
1.2	CÂNCER DE MAMA.....	11
1.3	TRATAMENTOS CONTRA O CÂNCER	14
1.4	CURCUMINA.....	15
1.5	RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DOS ANALOGOS A CURCUMINA	16
1.6	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGENIO	18
2	HIPÓTESE	21
3	JUSTIFICATIVA.....	21
4	OBJETIVOS.....	22
4.1	OBJETIVO GERAL.....	22
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1	ANÁLOGOS A CURCUMINA	23
5.2	CULTIVO CELULAR.....	25
5.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	25
5.4	ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR	26
5.5	ENSAIOS DE APOPTOSE.....	28
5.5.1	Citometria de fluxo	28
5.5.2	Quantificação de Caspase-3/7	28
5.6	CICLO CELULAR.....	29
5.7	SEQUENCIAMENTO	29
5.7.1	Tratamento	29
5.7.2	Extração de RNA.....	30
5.7.3	Biblioteca de cDNA.....	30
5.7.4	Qualidade e integridade das amostras	30
5.7.5	RNA-seq.....	31

5.7.6	Análise de dados	31
5.8	VALIDAÇÃO POR RT-qPCR	33
5.9	ESPECIES REATIVAS DE OXIGENIO	35
5.9.1	Cultivo celular	35
5.9.2	Ensaio de viabilidade celular	36
5.9.3	Avaliação de espécies reativas de oxigênio	36
5.9.4	Avaliação de superóxido	37
5.9.5	Potencial de membrana	37
5.9.5.1	JC-1	37
5.9.5.2	TMRE	38
5.9.6	Normalização dos dados	38
5.9.7	Obtenção de imagens	39
5.10	TESTES ESTATISTICOS	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	POTENCIAL CITOTOXICO DO ANALOGO NC2603 EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES	40
6.2	MODULAÇÃO DE GENES ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM O ANALOGO NC2603	45
6.3	INDUÇÃO DE APOPTOSE: POSSÍVEL MECANISMO PARA CITOTOXICIDADE DO ANÁLOGO NC2603	53
6.4	POTENCIAL ANTIMETASTATICO DO ANALOGO NC2603	58
6.5	POSSIVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ANALOGO NC2603 NA LINHAGEM BT-20: VIAS DE INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR	61
6.6	POSSIVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ANALOGO NC2603 NA LINHAGEM MCF-7: INDUÇÃO DE ARRASTO DE CICLO CELULAR	64
6.7	ARRASTO DE CICLO CELULAR EM FASE G1 CAUSADO PELO ANALOGO NC2603 NA LINHAGEM MCF-7	67
6.8	INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO: POSSIVEL MECANISMO DE AÇÃO PARA CITOTOXICIDADE DO ANALOGO NC2603	69
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer compreende um espectro diversificado de mais de cem patologias, todas caracterizadas por um processo de crescimento celular desordenado e incontrolável (DeVita et al., 2018; Pecorino, 2012). Notavelmente, apesar de sua etiologia estar intrinsecamente ligada a alterações no material genético (DNA), apenas uma parcela de 5-10% dos fatores causadores de câncer são de natureza hereditária, enquanto os restantes 90-95% derivam de fatores exógenos. Estes últimos englobam variáveis comportamentais, como tabagismo e alcoolismo, bem como exposições ambientais a agentes químicos e radiação ultravioleta, entre outros (INCA, 2021; NIH, 2017; Oncoguia, 2015). Esses fatores desencadeiam mutações somáticas no material genético, incluindo substituições nucleotídicas, inserções, deleções, translocações cromossômicas e até mesmo dimerização de fitas, como observado em casos de exposição à radiação UVB (Pecorino, 2012).

Em grande parte dos cenários, essas mutações instigam a produção de proteínas disfuncionais ou truncadas, provocando assim comportamentos celulares inadequados, notadamente o crescimento e a replicação descontrolados. Deve-se também mencionar que existem instâncias nas quais esses fatores externos atuam de maneira indireta no genoma, influenciando a regulação epigenética das células envolvidas no processo oncogênico (DeVita et al., 2018; Trichopoulos et al., 1996).

Os processos subjacentes ao câncer estão estritamente relacionados a modificações genéticas que impactam profundamente o funcionamento das células. As alterações nos genes desempenham um papel crucial nesse contexto, com o potencial de dar origem a células cancerosas. Proto-oncogenes, que são genes normais, podem se tornar oncogenes através de mutações ou um aumento significativo nos níveis de expressão, desencadeando assim o processo carcinogênico. De forma complementar, os genes supressores de tumores, quando inativados ou quando experimentam uma diminuição na expressão, também contribuem para o desenvolvimento do câncer (Alberts et al., 2017).

É notável que modificações em determinados genes são responsáveis por induzir marcas distintivas nas células tumorais, conhecidas como "*hallmarks of cancer*" (pilares do câncer) (Hanahan & Weinberg, 2011). Entre essas marcas, a evasão da morte celular sobressai

como uma das mais preeminentes. Mutações e variações na expressão de genes associados ao reparo do DNA e à apoptose (morte celular programada) podem favorecer a replicação de células danificadas, perpetuando assim o acúmulo de erros genéticos. O gene TP53, apelidado de "guardião do genoma humano", exemplifica um desses genes chaves (Fett-Conte & Salles, 2002).

À medida que os sistemas de manutenção da integridade genômica falham e mutações adicionais se acumulam, outras características do câncer podem emergir. Estas incluem a evasão do sistema imunológico, autonomia na sinalização de crescimento, resistência a sinais inibitórios, potencial replicativo ilimitado, estímulo à angiogênese e a capacidade de migrar e invadir tecidos circundantes (metástase). Esses fenômenos combinados são os principais determinantes que conferem ao câncer o status de um desafio de saúde global e uma enfermidade notoriamente intratável.

Conforme dados epidemiológicos mais recentes disponibilizados pela respeitável Organização Mundial de Saúde (OMS), o ano de 2020 testemunhou uma estimativa alarmante de aproximadamente 18 milhões de novos casos de câncer e cerca de 10 milhões de óbitos relacionados a essa enfermidade, ressalvando-se que essa contagem exclui os casos de câncer de pele não melanoma (WHO, 2020).

Ao longo de décadas, o câncer tem persistido como a segunda principal causa de mortalidade global (Roser & Ritchie, 2015). Conforme dados epidemiológicos mais recentes apresentados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2020 foram estimados aproximadamente 18 milhões de novos casos de câncer e cerca 10 milhões de mortes (com exceção dos casos de câncer de pele não melanomas que não foram contabilizados) (WHO, 2020).

Os tipos de câncer mais prevalentes incluem o câncer de mama, o câncer colorretal, o câncer de próstata e o câncer de pele não melanoma. Por outro lado, entre as variedades que mais contribuem para a carga global de mortalidade, destacam-se o câncer de pulmão, o câncer colorretal, que superou o câncer de estômago em 2015, e o câncer de mama.

1.2 CÂNCER DE MAMA

Embora ostente um dos prognósticos mais favoráveis dentre os cânceres e apresente uma prevalência acentuada no gênero feminino, exceção feita a raros casos no sexo masculino

(W. F. Anderson et al., 2010; Fentiman et al., 2006; Yalaza et al., 2016) o câncer de mama destaca-se devido à sua notável incidência. No decorrer do ano de 2020, essa patologia foi responsável por aproximadamente 12,5% dos novos diagnósticos e contribuiu com 7% das fatalidades relacionadas ao câncer.

Assim como em outros tipos de câncer, o câncer de mama apresenta fatores de risco significativos. Um dos determinantes mais preeminentes é a presença de casos de câncer na história familiar (hereditariedade), com cerca de um quarto dos diagnósticos de câncer de mama associados a antecedentes familiares da doença, em que mutações em genes cruciais, como BRCA1 e BRCA2, reconhecidos como genes supressores tumorais, podem ter sido herdados (Brewer et al., 2017; Y.-S. Sun et al., 2017).

Outro fator de risco de suma relevância reside no estilo de vida adotado pelo indivíduo. Comportamentos como o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, tabagismo e a adoção de dietas inadequadas demonstram uma associação inequívoca com o desenvolvimento do câncer (Brewer et al., 2017; Catsburg et al., 2015; Knight et al., 2017; Makarem et al., 2013). Importa salientar que alguns fatores podem interagir sinergicamente, como é o caso das influências hormonais, a idade e os fatores reprodutivos. Eventos como a menarca precoce, a menopausa tardia e a ocorrência da primeira gravidez em idade avançada estão intrinsecamente ligadas às modulações hormonais, que, quando desreguladas, acarretam um considerável risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias (Dall & Britt, 2017; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group et al., 2013; Horn & Vatten, 2017; Washbrook, 2006).

O câncer de mama pode ser submetido a uma classificação histológica e molecular (tabela 1). Estas categorizações são delineadas com base na presença ou ausência de receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR), do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), e no nível de expressão da proteína reguladora da divisão celular KI-67 (Gomes Do Nascimento & Otoni, 2020; Holliday & Speirs, 2011; Soliman & Yussif, 2016).

O prognóstico e a resposta a diferentes modalidades de tratamento estão intrinsecamente relacionados ao perfil de receptores. Células tumorais classificadas como luminal A e luminal B demonstram prognósticos mais favoráveis, uma vez que apresentam pelo menos um dos receptores e tendem a responder de forma mais eficaz aos tratamentos disponíveis. Por outro lado, as variantes denominadas triplo negativas (também conhecidas como basal e claudín-low) exibem um comportamento mais agressivo e constituem um desafio

terapêutico mais substancial (Badve et al., 2011; Harris et al., 2006; Holliday & Speirs, 2011; Thike et al., 2010).

TABELA 1 - Classificações moleculares do câncer de mama e seus respectivos perfis de expressão de receptores hormonais.

Subtipos Moleculares	Luminal B		HER2+	TN	
	Luminal A	(HER2-)			(HER2+)
Biomarcadores	ER+	ER+	ER+	ER-	ER+
	PR+	PR-	PR-/+	PR-	PR+
	HER2-	HER2-	HER2+	HER2+	HER2-
	Ki67 baixo	Ki67 alto	Ki67 baixo/alto	Ki67 alto	Ki67 alto
Frequência (%)	40-50	20-30		15-20	10-20
Prognóstico	Bom	Intermediário		Ruim	Ruim
Resposta a Terapias	Hormonioterapia	Hormonioterapia Quimioterapia	Hormonioterapia Quimioterapia Terapia Alvo	Terapia Alvo Quimioterapia	Quimioterapia Inibidores de PARP

Fonte: Traduzido e adaptado de (Barzaman et al., 2020)

Os avanços nos tratamentos, como quimioterapia, intervenções cirúrgicas, terapia hormonal e radioterapia, têm contribuído para uma melhoria constante na taxa de sobrevivência dos pacientes afetados (Howard-Anderson et al., 2012). No entanto, é necessário enfatizar que a detecção precoce da doença, quando as células ainda não adquiriram características malignas, constitui um fator crítico para o sucesso terapêutico e, conseqüentemente, aumenta substancialmente as perspectivas de cura (INCA, 2016).

1.3 TRATAMENTOS CONTRA O CÂNCER

Os tratamentos empregados na abordagem do câncer podem ser categorizados em duas modalidades principais: tratamentos locais, que incluem cirurgia e radioterapia, e tratamentos sistêmicos, como quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. A cirurgia, em sua essência, consiste na excisão do tumor por meio de procedimento cirúrgico, frequentemente complementada por intervenções sistêmicas. Por outro lado, a radioterapia envolve a administração de partículas que interagem com o material biológico, induzindo a ionização, seja nas moléculas constituintes das células ou na água presente no ambiente. Entretanto, é crucial observar que um dos principais desafios associados à radioterapia é a ocorrência de danos ao DNA, o qual absorve essa energia e, conseqüentemente, é ionizado (DeVita et al., 2018).

No âmbito dos tratamentos sistêmicos, faz-se uso de medicamentos genericamente denominados quimioterápicos, com variações nos alvos terapêuticos (Saúde, 2019). A quimioterapia é fundamentalmente caracterizada pela administração de agentes químicos com o propósito de combater diversas patologias, abrangendo não apenas o câncer, mas também outras enfermidades que se beneficiam desses compostos. Além disso, os quimioterápicos podem ser de origem tanto sintética quanto natural, e pesquisas atuais têm evidenciado que compostos naturais possuem potencial eficácia, às vezes superior aos sintéticos. Um exemplo adicional de tratamento é a imunoterapia, que direciona as drogas para o sistema imunológico do paciente afetado por neoplasias (Alam et al., 2018; DeVita et al., 2018).

Na imunoterapia, os alvos terapêuticos englobam antígenos, citocinas e receptores que são modulados com o propósito de estimular o sistema imunológico do paciente (Oiseth & Aziz, 2017). Por outro lado, na hormonioterapia, os alvos visados são os hormônios e seus correspondentes receptores hormonais, que são regulados por agentes farmacológicos como o tamoxifeno, endoxifeno, toremifeno, entre outros (DeVita et al., 2018).

Na quimioterapia convencional, as drogas podem influenciar a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, inibindo a atividade de proteínas fundamentais para o funcionamento celular, além de atuarem por meio de outros mecanismos de ação (Chabner & Roberts, 2005; DeVita et al., 2018). Neste contexto, diversas categorias de quimioterápicos se destacam, sendo classificadas como agentes alquilantes (como cisplatina, busulfan,

carboplatina e ciclofosfamida), antimetabólitos (a exemplo de 6-mercaptopurina, metotrexato e floxuridina) e antibióticos antitumorais (incluindo doxorrubicina e epirrubicina), entre outras (Alam et al., 2018; Chabner & Roberts, 2005; DeVita et al., 2018; C.-Y. Huang et al., 2017; Oncoguia, 2018). Adicionalmente, uma classe de quimioterápicos distintos compreende os inibidores mitóticos, que, em sua maioria, possuem origem natural, tais como paclitaxel, vimblastina e vincristina (*Chemotherapy for Breast Cancer | American Cancer Society*, n.d.; Haque et al., 2018; Marupudi et al., 2007; L. Yang et al., 2015).

Apesar dos avanços nos tratamentos das neoplasias, várias drogas antitumorais, incluindo aquelas mencionadas anteriormente, ainda carecem de especificidade, resultando em impactos não apenas nas células malignas, mas também nas células normais, desencadeando, assim, efeitos colaterais indesejados. A maioria desses efeitos colaterais engloba sintomas como náuseas, vômitos, diarreias e disfunções respiratórias. Um exemplo ilustrativo é a doxorrubicina, cuja administração resultou, anos após sua descoberta, na observação de problemas cardíacos em uma parcela significativa dos pacientes, levando-a a ser caracterizada como cardiotoxica (Chatterjee et al., 2010; McGowan et al., 2017; Saltiel & McGuire, 1983).

Em decorrência dessas limitações, atualmente, diversos grupos de pesquisa em todo o mundo se dedicam na busca de novos agentes terapêuticos mais seletivos e específicos, principalmente de origem natural. Esses compostos visam mitigar os efeitos adversos inerentes a esses tratamentos, ao mesmo tempo em que buscam potencializar a eficácia terapêutica em comparação com os fármacos já em uso.

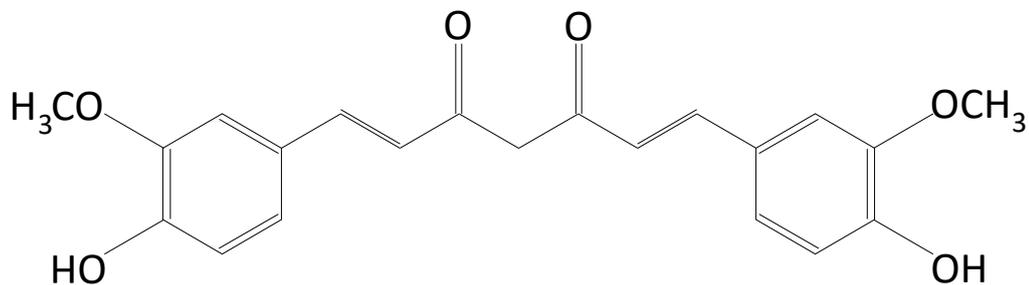
1.4 CURCUMINA

A *Curcuma longa*, também conhecida como cúrcuma ou açafrão-da-terra, é utilizada mundialmente como condimento, predominantemente na forma de pó, utilizado como corante por possuir uma coloração amarela forte. A cúrcuma abriga quantidades variáveis de constituintes, contendo entre 25-50% de amido, 4-10% de proteínas, 2-7% de fibras e cinzas, além de conter óleos essenciais (NAGHETINI, 2006). Adicionalmente, esta especiaria possui uma série de compostos, com destaque para os curcuminoides, que predominam em sua composição (Sueth-Santiago et al., 2015). Estes curcuminoides pertencem à classe dos polifenóis, objeto de intensas pesquisas devido às suas múltiplas atividades biológicas, abrangendo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticâncer, bem como seu potencial

estudo em tratamentos para a doença de Alzheimer e na redução dos riscos associados a enfermidades cardiovasculares (Qin et al., 2017; Sahebkar et al., 2016).

A curcumina (Figura 1) é um polifenol insolúvel em água, caracterizado por um elevado ponto de fusão e pela presença de tautomeria cetoenólica, o que implica que, dependendo do ambiente em que o composto se encontra, ele pode existir tanto na forma diceto quanto na forma enol (A. Goel et al., 2008).

FIGURA 1 – Estrutura molecular da curcumina



Fonte: autoria própria.

1.5 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DOS ANALOGOS A CURCUMINA

As propriedades medicinais da curcumina estão intrinsecamente relacionadas à sua estrutura molecular. Por exemplo, sua notável atividade antioxidante é atribuída aos grupos fenólicos e à extensa conjugação presente na molécula. A conjugação molecular proporciona a capacidade de gerar hidrogênios radicalares devido à presença de grupos hidrogenados, resultando na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs). Adicionalmente, a curcumina demonstra a capacidade de induzir apoptose, um processo que pode ser explicado pela sua natureza lipofílica. Tal característica possibilita a permeabilização rápida da membrana celular, mimetizando eventos observados durante o processo de apoptose (Jaruga et al., 1998; Noorafshan & Ashkani-Esfahani, 2013; Sueth-Santiago et al., 2015).

A estrutura da curcumina é passível de diversas modificações, que variam desde a simples substituição de hidrogênio por grupos metila até a introdução de anéis adicionais e cadeias carbônicas suplementares. Portanto, inúmeros grupos de pesquisa se dedicam a realizar modificações na estrutura da curcumina com o propósito de aprimorar suas propriedades farmacológicas. Além disso, tais modificações visam resolver algumas limitações associadas

ao uso da curcumina, como sua instabilidade em ambientes com pH superior a 7, sua baixa biodisponibilidade e sua reduzida solubilidade (Zheng et al., 2017).

Um exemplar de amplificação da atividade biológica dos compostos derivados da curcumina pode ser evidenciado por meio de alterações conformacionais na molécula. Estas modificações envolvem a introdução de uma maior flexibilidade molecular, alcançada pela remoção das ligações duplas mediante a adição de átomos de hidrogênio, bem como a restrição conformacional, que confere maior rigidez à molécula. Ambos os processos influenciam a capacidade de ancoragem da molécula em sítios receptores, podendo ampliar ou restringir tais interações (Jovanovic et al., 1999; Sueth-Santiago et al., 2015; Sugiyama et al., 1996; Youssef et al., 2007).

Estas modificações conformacionais ocorrem na região diceto da molécula, onde ligações duplas entre átomos de carbono estão presentes em ambos os lados. Vale ressaltar que existem duas categorias de curcuminas, nomeadamente as fenólicas e as β -dicetonas, que correspondem às regiões onde as substituições e adições de grupos funcionais ocorrem (Zheng et al., 2017).

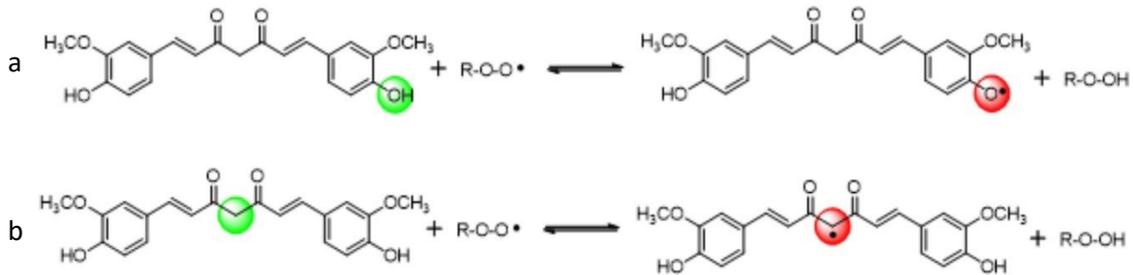
No contexto do câncer, a curcumina e seus análogos podem exercer uma série de efeitos em várias frentes e em diferentes alvos. Estes compostos têm a capacidade de inibir a ativação de fatores de transcrição, reprimir a ativação de múltiplas quinases que contribuem para o processo de tumorigênese, suprimir a expressão de genes que promovem a metástase, bem como regular genes envolvidos nos processos de apoptose, invasão celular e adesão. Além disso, eles também têm a capacidade de modular as atividades de enzimas essenciais para o crescimento tumoral (A. Goel et al., 2008).

A atividade antioxidante de diversos compostos está ligada à sua capacidade de combate ao câncer, uma vez que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem induzir danos de múltiplas maneiras. Um desses mecanismos envolve a lesão dos tecidos, o que resulta na liberação subsequente de EROs. Ademais, danos diretos ao DNA representam uma forma substancialmente grave de agressão, que pode culminar em mutações e, conseqüentemente, no desenvolvimento do câncer (Barrera, 2012; Kumari et al., 2018).

A curcumina, por si só, exibe uma considerável atividade antioxidante, fundamentada nas características de suas porções fenólicas e da porção diceto. As porções fenólicas (Figura 2 a) do composto apresentam grupos hidroxila que demonstram prontidão em perder hidrogênio, permitindo, assim, a neutralização de radicais livres. Por outro lado, a porção diceto (Figura 2

b) possui um carbono central que conecta os dois grupos cetona, cada um com dois hidrogênios. A remoção de um desses hidrogênios é facilitada pela presença de dois oxigênios, que induzem um momento dipolar e intensificam a eletronegatividade nessa região, resultando na facilidade de saída de um dos hidrogênios do referido carbono central (Sueth-Santiago et al., 2015).

FIGURA 2: Representação do modelo de atividade antioxidante da curcumina. Em a) é representado o modelo da porção fenólica, e b) o modelo da porção diceto.



Fonte: (Sueth-Santiago et al., 2015)

1.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGENIO

As mitocôndrias representam organelas de extrema importância no contexto celular, desempenhando funções primordiais em diversos domínios da biologia e fisiologia celulares. Elas são cruciais para a regulação do estado redox, a indução de apoptose, o transporte de metabólitos e proteínas originárias do citosol, o metabolismo de lipídios e aminoácidos, bem como a determinação do destino celular. Além disso, as mitocôndrias servem como a principal fonte de produção de adenosina trifosfato (ATP), o combustível energético primordial para a maioria dos processos metabólicos. Esse processo de síntese de ATP ocorre por meio do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), também conhecido como Cadeia de Transporte de Elétrons (ETC – electron transport chain) (Alberts et al., 2017; Annesley & Fisher, 2019; Figueira et al., 2013; Larosa & Remacle, 2018).

A ETC é o sistema global e o caminho cíclico pelo qual os elétrons são transportados nas mitocôndrias. O transporte de elétrons ocorre em complexos multi-enzimáticos presentes nas membranas internas das mitocôndrias (Complexos I-IV), e os elétrons são transportados entre cofatores, O₂ e substratos, como o NADH ou o succinato, através desses complexos (Murphy, 2009; Perry et al., 2011).

As reações de oxirredução que ocorrem na ETC geram energia suficiente para mover prótons (H⁺) contra o gradiente de concentração (para fora da membrana interna das

mitocôndrias). Como a membrana é relativamente impermeável, é gerado um gradiente eletroquímico de prótons (ΔpH) (Creed & McKenzie, 2019). Uma vez estabelecido um gradiente de cargas, é também gerado um potencial elétrico transmembranar, conhecido como potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) (Perry et al., 2011; Solaini et al., 2007). Tanto o ΔpH quanto o $\Delta\psi\text{m}$ definem a força próton-motriz (Δp), a força que impulsiona os prótons de volta para a matriz para serem utilizados na síntese de ATP, no transporte de metabólitos e na homeostase de íons. (Alberts et al., 2017; Cottet-Rousselle et al., 2011).

A força próton-motriz pode ser calculada usando a equação de Nernst ($\Delta\text{p} = \Delta\psi\text{m} - 2.3 (RT/F) \Delta\text{pH}$). Geralmente, $\Delta\text{p} = 180 \text{ mV}$ em células saudáveis, assumindo para isso $\Delta\psi\text{m} = 150 \text{ mV}$, $\Delta\text{pH} = -0,5$ U e $T = 37^\circ\text{C}$ (Alberts et al., 2017; Cottet-Rousselle et al., 2011; Perry et al., 2011).

As mitocôndrias também são a principal fonte de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), subprodutos do processo da ETC. É conhecido que, em certas condições fisiológicas, as EROs desempenham importantes papéis regulatórios, como na proliferação e diferenciação celular (Figueira et al., 2013; Mittler, 2017). O superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) é a ERO mais comum gerado nas células (Zorov et al., 2014) Além disso, sabe-se que o superóxido pode dar origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ao radical hidroxila ($\cdot\text{HO}$), que também são EROs. (Bouchez & Devin, 2019; Zorov et al., 2014).

Apesar dos papéis regulatórios e fisiológicos das EROs, elas também podem danificar as células de várias maneiras (Larosa & Remacle, 2018). O radical hidroxila ($\cdot\text{HO}$), por exemplo, é altamente reativo e é responsável por danificar proteínas, DNA e lipídios, levando à morte celular (Cheung & Vousden, 2022; Zorov et al., 2014). No entanto, as mitocôndrias possuem seus próprios mecanismos antioxidantes para controlar a produção de EROs. O superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por superóxido dismutases (SODs), e o H_2O_2 , por sua vez, pode ser convertido em água por meio da ação da catalase (CAT), peroxirredoxinas (PRDXs) e glutathiona peroxidases (GPXs) (Cheung & Vousden, 2022).

A superprodução de EROs é controlada por esses mecanismos e pode beneficiar alguns processos celulares, como mencionado anteriormente. A superprodução (estresse) que beneficia as células é conhecida como eustresse oxidativo (Jaganjac et al., 2022; Mailloux, 2020). Por outro lado, o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, ou um desequilíbrio no estado redox quando os mecanismos antioxidantes falham e a superprodução de EROs danifica as células, é chamado de estresse oxidativo, o qual pode estar relacionado à osteoporose,

aterosclerose, Alzheimer e envelhecimento (Cabello-Verrugio et al., 2017; Z. Chen & Zhong, 2014; Kattoor et al., 2017; Kimball et al., 2021) No câncer, devido às suas altas taxas metabólicas, também ocorre um alto nível de estresse oxidativo que está relacionado à iniciação, promoção e progressão de tumores (Gorrini et al., 2013; Klaunig, 2019).

Uma das características mais notáveis da curcumina reside em sua proeminente atividade antioxidante, que tem sido objeto de investigação científica abrangente. A capacidade antioxidante da curcumina está intrinsecamente relacionada à sua habilidade de neutralizar EROs por meio da doação de hidrogênio radicalar. Além disso, ela demonstra a capacidade de estimular as enzimas antioxidantes endógenas do organismo, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase, amplificando, assim, o sistema de defesa antioxidante do corpo.

As EROs podem acelerar o processo de envelhecimento ao induzir estresse oxidativo nas células. Por meio da neutralização dessas espécies reativas, a curcumina contribui para salvaguardar as células contra os danos associados ao envelhecimento. Conseqüentemente, a curcumina é amplamente consumida com a intenção de combater os efeitos do envelhecimento, devido às suas notáveis propriedades antioxidantes.

Moléculas sintéticas análogas à curcumina também são submetidas a testes de suas atividades antioxidantes (Abrahams et al., 2019; H. Zhou et al., 2021). As modificações na estrutura molecular visam potencializar a eficácia da ação antioxidante, ao mesmo tempo em que contribuem para um aprofundamento no entendimento do mecanismo subjacente a essa atividade.

2 HIPÓTESE

Acredita-se que os compostos análogos à curcumina exibam uma atividade aprimorada no contexto do câncer de mama, mediante a supressão da viabilidade celular, a indução de apoptose, a inibição da migração celular e a modulação da expressão de genes envolvidos nos processos de tumorigênese.

3 JUSTIFICATIVA

Dado que o câncer representa uma das mais prementes questões de saúde globais, a busca por tratamentos cada vez mais eficazes e menos agressivos é imperativa. Nesse contexto, diversos compostos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de servirem como modalidades terapêuticas.

Entre esses compostos, os análogos de origem natural merecem destaque, pois são concebidos com a finalidade de potencializar os efeitos e a biodisponibilidade dos compostos naturais correspondentes. Além disso, há a crença de que esses análogos podem atenuar os efeitos colaterais das drogas antitumorais, tornando-se opções terapêuticas menos agressivas em comparação às utilizadas atualmente.

A curcumina, o principal composto natural encontrado na cúrcuma, que é amplamente empregada como condimento, também é reconhecida popularmente por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e diuréticas, entre outras. Dentre essas propriedades, destaca-se o efeito antitumoral, objeto de estudos em diversos grupos de pesquisa, que têm revelado resultados promissores. No entanto, apesar dos benefícios, a curcumina enfrenta desafios relacionados ao seu metabolismo hepático de primeira passagem, rápida clivagem em moléculas menos bioativas e potencial modificação em sua estrutura química dependendo do pH. Isso a torna uma molécula caracterizada por baixa biodisponibilidade. Diante dessas limitações, os compostos análogos emergem como uma resposta às necessidades e hipóteses para aprimorar moléculas bioativas, como a curcumina.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anticâncer de compostos análogos a curcumina em linhagens de câncer de mama responsiva e não responsiva a hormônios (MCF-7 e BT-20 respectivamente).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

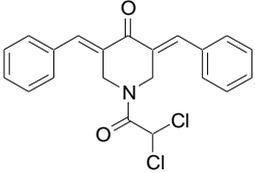
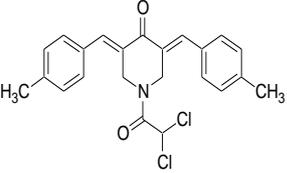
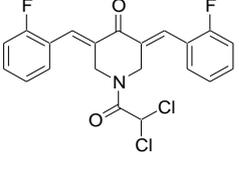
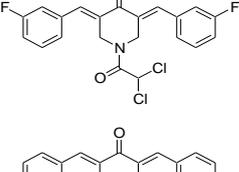
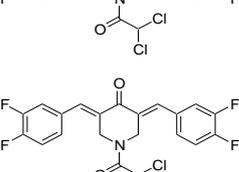
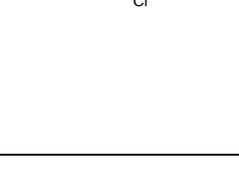
- Avaliar a viabilidade celular de linhagens tumorais de câncer frente ao tratamento com compostos análogos a curcumina;
- Selecionar um composto com maior capacidade de citotóxica das linhagens tumorais;
- Avaliar o efeito antimigratório causado pelo composto selecionado em linhagens tumorais;
- Avaliar o efeito de indução de apoptose causado pelo composto selecionado em linhagens tumorais;
- Avaliar o transcriptoma das duas linhagens tumorais após tratamento com o composto selecionado;
- Validar os dados de transcriptoma por RT-qPCR
- Avaliar a atividade antioxidante do composto mais efetivo na University of Saskatchewan do Canadá.

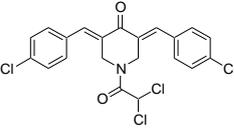
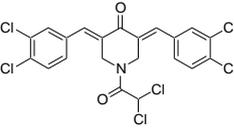
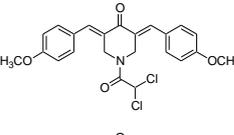
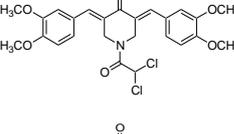
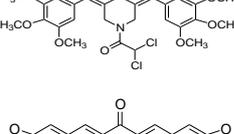
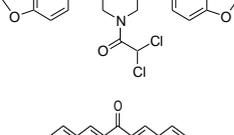
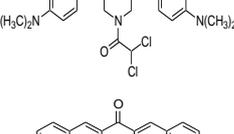
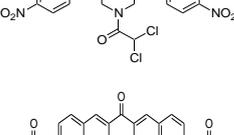
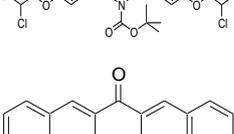
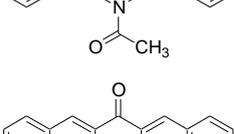
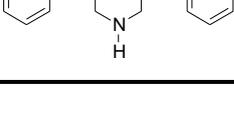
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANÁLOGOS A CURCUMINA

Foram testados 18 compostos análogos a curcumina (cetonas alfa beta insaturadas conjugadas) cedidos pelo prof. Jonathan Dimmock da University of Saskatchewan do Canadá.

Tabela 2: Compostos análogos a curcumina

#NC	ESTRUTURA	PESO MOLECULAR
2603		386.27
2604		414.32
2605		422.25
2606		422.25
2607		422.25
2608		458.23

#NC	ESTRUTURA	PESO MOLECULAR
2609		455.16
2610		524.05
2611		446.32
2612		506.37
2613		566.43
2614		474.29
2615		472.41
2616		476.27
2617		629.31
2624		317.38
1831		275.34

5.2 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas as linhagens celulares de câncer de mama BT-20 (Triplo negativo, ER⁻,PR⁻,HER2⁻) e MCF-7 (Luminal A, ER⁺,PR⁺, HER2⁻). Além dessas, ainda foi utilizada a linhagem não tumoral de queratinócito HaCat. Os cultivos das linhagens foram conduzidos no laboratório de cultura de células da Unidade de Biotecnologia, sob a supervisão da Professora Doutora Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Inicialmente as linhagens, que são mantidas em nitrogênio líquido em um meio contendo 900 µL de soro fetal bovino (SFB) e 100 µL de DMSO (utilizado como crio preservador), foram descongeladas. Para isso, a suspensão de células do estoque é centrifugada para que haja a precipitação das células para retirada do meio contendo DMSO (citotóxico para células).

As linhagens foram mantidas em meio de cultura RPMI (RPMI-1640, Sigma-Aldrich Cat. R6504), tamponado com HEPES e bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), incluindo a combinação dos antibióticos penicilina e estreptomicina (100 I.U./mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), Canamicina (50 µg/ml), ciprofloxacino (1 µg/ml) e anfotericina (1 µg/ml) e incubadas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Para realização dos ensaios, as linhagens foram cultivadas até no mínimo a terceira passagem e no máximo sexta passagem. Para o processo de passagem, inicialmente foi retirado todo meio da garrafa e essa foi lavada com solução de sais de Hank. Após a lavagem, foi inserida solução de tripsina-EDTA (0,25% em solução de Hank) nas garrafas, que foram mantidas incubadas a 37°C até que as células se desprendessem do fundo da garrafa. A suspensão resultante foi centrifugada por 5 minutos a uma velocidade de 894 G, e o pellet resultante foi suspenso em meio de cultura e distribuído nas garrafas previamente preparadas para o cultivo celular.

5.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos utilizando a técnica colorimétrica da redução do sal MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazolium brometo) em cristais de

formazan, com o propósito de triar e selecionar o composto com o mais eficaz efeito inibitório, que posteriormente foi empregado em ensaios adicionais (Komoto et al., 2023).

As linhagens celulares foram subcultivadas em placas de cultura de 96 poços, com densidades de 1×10^5 células/mL ou 2×10^4 célula/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C com 5% de CO_2 por um período de 24 horas para permitir a aderência celular. Após esse período, o meio de cultura foi removido e substituído por meio fresco contendo os análogos para tratamento, sendo que um controle positivo foi estabelecido com o quimioterápico comercial doxorubicina (doxorubicin hydrochloride. Sigma-Aldrich Cat. D1515), e o DMSO (Dimethyl sulfoxide. Sigma-Aldrich Cat. D4540) foi usado como controle de solvente.

Após o tratamento, o meio contendo os análogos foi removido, seguido da adição de meio fresco e 20 μL do sal MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide. Sigma-Aldrich Cat. M2128) em uma concentração de 5 mg/mL, em solução de sais balanceada de Hank. As placas foram então reincubadas na estufa por 3 horas e, subsequentemente, centrifugadas a 3220 G para sedimentação dos cristais de formazan. O sobrenadante foi descartado, e os cristais precipitados foram solubilizados em 150 μL de DMSO, seguido de incubação a 37°C por 1 hora para completa dissolução dos cristais. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através da medição da absorbância das placas utilizando um leitor de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer) com comprimento de onda de 550 nm.

Para o cálculo dos valores de IC_{50} , uma série de diluições foi realizada a partir da concentração inicial de 20 μM , onde a concentração foi reduzida pela metade em cada etapa subsequente (20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 μM). Isso permitiu a construção de curvas com tendências logarítmicas, das quais equações foram derivadas. Essas equações, por sua vez, foram utilizadas como ferramentas fundamentais para o cálculo do valor de IC_{50} para cada linhagem celular.

5.4 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR

Os ensaios de migração celular foram conduzidos empregando duas técnicas distintas: a técnica de cicatrização de ferida, também conhecida como *wound healing* ou *scratch assay*, e a técnica utilizando a câmara Transwell (Justus et al., 2023; Martinotti & Ranzato, 2020)

garantindo uma confluência celular superior a 90%. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C , com uma atmosfera contendo 5% de CO_2 , por um período de 24 horas,

permitindo a aderência completa das células à superfície do poço. Após esse período, uma ferida na monocamada de células foi criada, consistindo na remoção das células em uma linha reta, utilizando uma ponteira de micropipeta com capacidade de 1000 μL . Em seguida, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo o análogo de curcumina a 0,75 μM para tratamento, com um período de incubação de 24 horas. Imagens foram adquiridas nos tempos $T = 0 \text{ h}$ e $T = 24 \text{ h}$ para posterior comparação da cicatrização, utilizando para isso o software Image J (C. A. Schneider et al., 2012).

O Transwell consiste em uma câmara contendo uma membrana semipermeável, sobre a qual são cultivadas as linhagens celulares permitindo observar se há a migração de células através da membrana. Para isso 1mL de uma suspensão de células da linhagem BT-20, a uma concentração de 3×10^5 célula/mL em meio de cultura sem soro fetal bovino, foi adicionado às câmaras Transwell de 24 mm (Corning® 24 mm Transwell® with 8.0 μm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile Cat.3428). As câmaras foram posicionadas em poços que continham meio fresco acrescido de 10% de soro fetal bovino, utilizado como um quimioatrativo, juntamente com o composto a ser testado quanto ao seu potencial efeito antimigratório (NC2603 e curcumina a 0,75 μM). Após 24 horas de incubação, procedeu-se à contagem das células, seguindo o protocolo do fabricante (Corning Incorporated, 2009).

Para a captura de imagens representativas, as células foram coradas com Giemsa. O processo foi iniciado com a lavagem das câmaras utilizando uma solução de Hank, repetindo-se esse procedimento antes de cada etapa subsequente para remover o excesso de reagentes utilizados. Posteriormente, as câmaras foram colocadas em poços contendo 2 mL de solução de formol a 3,7% (em solução de Hank), na qual também foi adicionado 1 mL dentro das câmaras, permitindo um período de repouso de 2 minutos para fixação das células. Após a lavagem, as câmaras foram transferidas para poços contendo 2 mL de metanol 100%, no qual também foi adicionado 1 mL dentro das câmaras, deixando-as em repouso por 20 minutos. Para a coloração das células, as câmaras foram então colocadas em poços contendo 2 mL de corante Giemsa, com a adição de 1 mL dentro das câmaras, e permaneceram em repouso por 15 minutos. As células que não migraram (retidas na parte interna da câmara) foram removidas utilizando swabs, deixando apenas as células que migraram através da membrana para a parte externa. As imagens foram capturadas utilizando microscopia óptica.

5.5 ENSAIOS DE APOPTOSE

5.5.1 Citometria de fluxo

O ensaio de apoptose foi conduzido por meio da técnica de citometria de fluxo, empregando Annexina V-FITC como marcador.

Inicialmente, as células da linhagem BT-20 foram subcultivadas a uma concentração de 2×10^5 célula/mL em garrafas de cultura celular de 25 cm^2 contendo 5 mL da suspensão celular. Estas células foram submetidas a tratamentos com os compostos 2603 ($3,5 \mu\text{M}$), curcumina ($3,5$ e $30 \mu\text{M}$) e doxorrubicina ($3,5 \mu\text{M}$), durante um período de 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados em tubos de centrifuga de 15 mL. As células foram soltas utilizando tripsina e coletadas nos respectivos tubos falcon contendo o sobrenadante, que foram posteriormente centrifugados a 1741 G por 5 minutos a 4°C .

Para a avaliação da indução de apoptose, utilizou-se o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmigen™ Cat.556547), seguindo estritamente os procedimentos recomendados pelo fabricante (BD, 2022). A análise por citometria de fluxo foi conduzida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP, Bloco S), utilizando o citômetro LSR Fortessa (BD Biosciences), com a aquisição e análise dos dados realizada através do software BD FACS Diva (versão 8.0.1). Este processo foi supervisionado pela técnica Fabiana Rossetto de Moraes.

5.5.2 Quantificação de Caspase-3/7

Para o ensaio de quantificação da atividade de caspase-3/7, as células da linhagem BT-20 foram subcultivadas em placas de 96 poços com fundo branco (96 Well White/Clear Bottom Plate, TC Surface, Thermo Fisher, Cat. 165306), com cada poço contendo $200 \mu\text{L}$ de uma suspensão de células a uma concentração de 1×10^5 cél/mL (2×10^4 cél/poço). Após o período de aderência das células de 24 horas, essas receberam tratamentos com os compostos 2603 e doxorrubicina a $3,5 \mu\text{M}$ utilizando como controle o solvente orgânico DMSO. As células foram incubadas novamente por 24 horas.

A avaliação da atividade das caspases-3/7 foi conduzida utilizando o kit Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Cat. G8090), seguindo rigorosamente os protocolos recomendados pelo fabricante (PROMEGA, 2018). As placas foram lidas em uma leitora de microplacas GloMax® Explorer (Promega, Cat. 3510).

5.6 CICLO CELULAR

O ensaio de ciclo celular foi conduzido por meio da técnica de citometria de fluxo, empregando iodeto de propídio como marcador.

Inicialmente, as células da linhagem MCF-7 foram subcultivadas a uma concentração de 2×10^5 célula/mL em garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo 5 mL da suspensão celular. Estas células foram submetidas a tratamentos com os compostos 2603 (3,5 µM) e o controle de solvente DMSO (<0,01%), durante um período de 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados em tubos de centrifuga de 15 ml. As células foram soltas utilizando tripsina e coletadas nos respectivos tubos contendo o sobrenadante, que foram posteriormente centrifugados a 1741 G por 5 minutos a 4 °C.

Para a avaliação do ciclo celular, utilizou-se o kit BD Cycletest™ Plus (BD Pharmigen™ Cat.340242), seguindo estritamente os procedimentos recomendados pelo fabricante (BD, 2015). A análise por citometria de fluxo foi conduzida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP, Bloco S), utilizando o citômetro LSR Fortessa (BD Biosciences), com a aquisição e análise dos dados realizada através do software BD FACS Diva (versão 8.0.1). Este processo foi supervisionado pela técnica Fabiana Rossetto de Moraes.

5.7 SEQUENCIAMENTO

5.7.1 Tratamento

Triplicatas independentes foram conduzidas para as linhagens BT-20 e MCF-7 para avaliar os transcritomas dessas em resposta ao tratamento com o análogo de curcumina (2603).

as células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm², cada um contendo 5 mL de suspensão de células a uma densidade de 2×10^5 cél/mL, em meio RPMI suplementado

com 10% de SFB. Após o período de aderência das células, as linhagens foram tratadas com o composto 2603, utilizando a concentração previamente determinada como IC50 para cada linhagem (3,5 μ M para BT-20 e 5,6 μ M para MCF-7). O grupo de controle foi tratado apenas com o solvente orgânico DMSO. Após 24 horas de tratamento, sob condições de estufa a 37 °C e uma atmosfera contendo 5% de CO₂, as células foram submetidas ao processo de extração de RNA.

5.7.2 Extração de RNA

Para extrair o RNA das células tratadas com o análogo 2603 e DMSO, as células foram desprendidas utilizando solução de tripsina e posteriormente centrifugadas para precipitar. As células foram submetidas ao processo de extração de RNA por coluna de sílica, empregando o kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Cat. 74104), seguindo estritamente as diretrizes recomendadas pelo fabricante, conforme descrito no protocolo disponível em (QIAGEN, 2019).

5.7.3 Biblioteca de cDNA

Para conduzir a técnica de sequenciamento, foi essencial realizar a reação de transcriptase reversa, a fim de obter o cDNA de cada amostra. Para isso, todas as amostras foram padronizadas para uma concentração de 0,1 μ g/ μ L de RNA e empregou-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™ Cat. 4368814), aderindo estritamente às orientações estabelecidas pelo fabricante. O protocolo detalhado está disponível em (Thermo Fisher Scientific, 2018)).

5.7.4 Qualidade e integridade das amostras

A integridade das amostras de RNA e a presença de DNA, foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando tampão TBE 1x, e sua quantificação foi realizada utilizando um nanofotômetro P 360 (Implen).

A qualidade das bibliotecas de cDNA foi posteriormente analisada pela Dra. Kamila Chagas Peronni Zueli no Instituto de Pesquisa do Câncer (IPEC) em Guarapuava-PR, utilizando o sistema TapeStation da Agilent.

5.7.5 RNA-seq

As amostras foram submetidas a um processo de sequenciamento de nova geração (NGS - Next Generation Sequencing) conduzido pela Dra. Kamila Chagas Peronni Zueli no Instituto de Pesquisa do Câncer (IPEC) em Guarapuava-PR. Para a realização deste sequenciamento, foi empregado o sistema NovaSeq 6000 da Illumina, juntamente com os kits Illumina Stranded mRNA Prep (Cat. 20040532), IDT® for Illumina® RNA UD Indexes Set A (Cat. 20040553), e NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (Cat. 20040326).

5.7.6 Análise de dados

A análise e o processamento dos dados brutos gerados no processo de sequenciamento foram conduzidos pela bioinformata Dra. Adriane Feijo Evangelista, no Hospital de Câncer de Barretos.

Os dados do sequenciamento foram submetidos ao controle de qualidade utilizando a ferramenta FastQC versão 0.11.9 (Andrews, 2010), a qual realiza uma série de análises para avaliar a qualidade dos dados gerados durante o processo de sequenciamento. Essa análise identifica potenciais erros e vieses que devem ser corrigidos antes das etapas subsequentes.

O próximo passo envolveu a trimagem, que consiste na remoção das bases de baixa qualidade. Essa etapa foi realizada com o auxílio da ferramenta Trim Galore versão 0.6.7 (Krueger et al., 2021), que combina duas outras ferramentas, o FastQC (mencionado anteriormente) e o Cutadapt (Martin, 2011). O Cutadapt é responsável por realizar a trimagem de sequências indesejadas, como adaptadores, caudas poli-A e regiões de baixa qualidade. O parâmetro de corte (cutoff) utilizado foi $Q > 30$, o que significa que todas as sequências com valores de qualidade inferiores a 30 foram removidas.

Após a trimagem, os dados estão prontos para serem alinhados. Nessa etapa, os fragmentos de sequência (reads) são mapeados em relação a um genoma de referência e quantificados para determinar os níveis de expressão dos transcritos. O genoma de referência utilizado foi o hg19 (GRCh37) (Church et al., 2011). Há uma versão mais atualizada (GRCh38)

(V. A. Schneider et al., 2016), porém a maioria dos bancos de dados contém informações obtidas utilizando a versão 37.

O alinhamento das sequências foi conduzido utilizando a ferramenta Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (Dobin, et al., 2013) na versão 2.7.9a. O STAR é amplamente empregado para alinhamento devido à sua excelente precisão e velocidade, embora demande um alto consumo de memória. Sua eficácia é atribuída a dois processos essenciais: a busca por "seeds" (segmentos de sequência) e o agrupamento, costura e pontuação das sequências. Esses processos desempenham um papel crucial na detecção de "splicing" (inclusão de íntrons), desvios (bases que não correspondem ao genoma de referência) e na identificação de adaptadores, caudas poli-A e sequências de baixa qualidade que podem não ter sido removidas durante o processo de trimagem.

O resultado do alinhamento gera arquivos no formato SAM (Sequence Alignment Map), que são arquivos de texto capazes de conter sequências de nucleotídeos extensas (frequentemente dezenas de gigabytes) após o alinhamento. Esses arquivos são posteriormente analisados e manipulados por meio da ferramenta SAMtools (Danecek, et al., 2021), utilizada nesta pesquisa na versão 1.14. O SAMtools é frequentemente empregado para converter arquivos SAM em formato BAM (Binary Alignment Map), que contém as mesmas informações dos arquivos SAM, mas em uma representação binária, compactada e indexada, facilitando a visualização e o manuseio dos dados. Os índices gerados a partir do arquivo BAM são armazenados em arquivos adicionais com extensão BAI.

Para a visualização dos dados, foi adotada a interface gráfica IGB (Integrative Genome Browser) (Robinson et al., 2003), uma ferramenta de código aberto amplamente reconhecida e utilizada para visualização de genomas, alinhamentos e arrays.

Com o arquivo BAM gerado, o próximo passo consistiu na quantificação dos transcritos, realizada por meio da ferramenta Salmon (Patro et al., 2017) na versão 1.5.2. O Salmon é uma ferramenta de quantificação rápida e precisa que permite a estimativa dos níveis de expressão dos transcritos com base nos dados brutos (quasi-mapping-based) ou nos dados já alinhados (alignment-based).

Após a quantificação dos transcritos, os dados foram submetidos a uma análise estatística conhecida como análise de expressão diferencial. Esta análise envolve a comparação dos níveis de expressão dos genes nas amostras tratadas em relação às amostras de controle (não tratadas). Essa avaliação foi conduzida por meio de pacotes estatísticos disponíveis no

ambiente e linguagem de programação R, amplamente utilizados em análises de bioestatística e na geração de gráficos. Dois desses pacotes, nomeadamente o DESeq2 (Love, Huber, Anders, 2014) e o EdgeR (Robinson; McCarthy; Smyth; 2009), fazem parte do Bioconductor, um software especializado em análise de dados biológicos.

Esses pacotes adotam um modelo estatístico baseado na distribuição binomial negativa, que descreve a probabilidade de uma série de sucessos ocorrer antes de um número determinado de falhas. Esse modelo é aplicado para identificar quais genes apresentam diferenças significativas em sua expressão entre as amostras tratadas e as de controle, contribuindo assim para a identificação de genes candidatos com regulação alterada em resposta ao tratamento.

5.8 VALIDAÇÃO POR RT-qPCR

Os dados provenientes do ensaio de sequenciamento foram validados por meio da técnica RT-qPCR. Para garantir a consistência da validação da técnica, foram aplicados os mesmos procedimentos de preparação de amostras, extração de RNA e transcrição reversa, conforme especificados nos itens 5.7.1, 5.7.2 e 5.7.3, respectivamente, que foram utilizados no processo de sequenciamento. Neste contexto, este documento se concentrará na descrição do protocolo empregado nas reações de RT-qPCR.

Os genes para validação foram selecionados com base nas vias as quais esses pertencem, e que podem explicar alguns resultados obtidos em outros ensaios.

Inicialmente, os primers correspondentes aos genes selecionados para validação foram adquiridos (conforme detalhado na Tabela 3). As sequências dos primers foram obtidas na literatura científica e posteriormente verificadas utilizando o banco de dados Emsembl (Martin et al., 2023). Todos os primers foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) para assegurar a qualidade dos reagentes utilizados no experimento .

Os primers, inicialmente recebidos na forma liofilizada, foram armazenados a uma concentração de 100 μM . A partir dessa concentração, foi conduzida uma diluição para preparar a solução de trabalho, obtendo-se uma concentração de 10 μM .

Foram realizadas curvas de dissociação para avaliar a qualidade dos primers. Além disso, os primers passaram por um processo de padronização para determinar a concentração

ideal de cada um deles. Para este propósito, foram realizados ensaios de RT-qPCR, nos quais os primers foram testados em três diferentes concentrações: 100, 300 e 600 nM. As reações foram executadas utilizando o kit SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA), seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante. O protocolo detalhado está disponível em (SIGMA-ALDRICH, n.d.).

Após a padronização das concentrações dos primers, foram conduzidos ensaios de RT-qPCR para validar as amostras de controle (C1, C2, C3) e tratamento (T1, T2, T3) de cada linhagem celular. Para a linhagem BT-20, foram empregados os primers EGR3, ATF3, EMP1, SOCS3, ZFP36, GADD45B e GAPDH. Já para a linhagem MCF-7, foram utilizados os primers GADD45A, CCNB1, CDKN1A, CCNA2, CCNE2, CCND1, CCND2, CDK2, CDK1, CDK4, CDK6, PCNA e ESR1. Esses ensaios foram conduzidos utilizando o mesmo kit utilizado na padronização, seguindo o mesmo protocolo. Três experimentos independentes foram realizados para cada primer.

Tabela 3 A tabela contém as sequencias dos primers utilizados na validação de dados por RT-qPCR.

Gene	Primer	
	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
GADD45A	TGCGAGAACGACATCAACAT	TCCCGGCAAAAACAAATAAG
CCNB1	AATAAGGCGAAGATCAACATGGC	TTTGTTACCAATGTCCCCAAGAG
CDKN1A	GACACCACTGGAGGGTGACT	CAGGTCCACATGGTCTTCCT
CCNA2	CACTCTACACAGTCACGGGA	AGTGTCTCTGGTGGGTTGAG
CCNE2	CTTACGTCACTGATGGTGCTTGC	CTTGGAGAAAGAGATTTAGCCAGG
CCND1	TCTACACCGACAACCTCCATCCG	TCTGGCATTTTGGAGAGGAAGTG
CCND2	GTTCTGGCCTCCAAACTCA	CTTGATGGAGTTGTTCGGTGTAAT
CDK2	ATGGATGCCTCTGCTCTCACTG	CCCGATGAGAATGGCAGAAAGC
CDK1	TTTTTCAGAGCTTTGGGCACT	CCATTTTGCCAGAAATTCGT
CDK4	CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT	TCAGTTCGGGATGTGGCACAGA
CDK6	GGATAAAGTTCCAGAGCCTGGAG	GCGATGCACTACTCGGTGTGAA
PCNA	ATTAAACGGTTGCAGGCGTAG	ACATCTGCAGACATACTGAGTG
ESR1	GCTTACTGACCAACCTGGCAGA	GGATCTCTAGCCAGGCACATTC
EGR3	GACATCGGTCTGACCAACGAG	GGCGAACTTTCCCAAGTAGGT
ATF3	GTTTGAGGATTTTGCTAACCTGAC	AGCTGCAATCTTATTCTTTCTCGT
EMP1	GCCAATGTCTGGTTGGTTTCC	GAGGGCATCTTCACTGGCATA
SOCS3	GACCAGCGCCACTTCTTCA	CTGGATGCGCAGGTTCTTG

Gene	Primer	
	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
ZFP36	GACTGAGCTATGTCTGGACCTT	GAGTTCCGTCTTGTATTTGGGG
GADD45B	ATTGCAACATGACGCTGGAAGAGC	GGATGAGCGTGAAGTGGATT

5.9 ESPECIES REATIVAS DE OXIGENIO

A seguir, serão expostas as metodologias desenvolvidas durante o período de mobilidade no âmbito do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE-CAPES). A estadia transcorreu sob a orientação do Professor Doutor Brian Bandy, pertencente ao Departamento de Farmácia e Nutrição da Universidade de Saskatchewan, situada em Saskatoon, Canadá.

5.9.1 Cultivo celular

Durante o período, empregou-se a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal Caco-2. Essa linhagem foi cultivada em meio de cultura DMEM (DMEM 1X, referência Gibco 11885-084), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich) e contendo a combinação dos antibióticos penicilina e estreptomicina (100 I.U./mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), sendo incubada a uma temperatura de 37°C, sob uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Exceto pelo ensaio que empregou JC-1, todos os demais experimentos seguiram um protocolo padronizado de subcultivo e tratamento conforme descrito a seguir. A linhagem celular foi subcultivada em placas de cultura de 96 poços, com densidades de 1x10⁵ células/mL ou 2x10⁴ células por poço. As placas foram então incubadas em uma estufa a 37°C, com uma atmosfera contendo 5% de CO₂, por um período de 24 horas para possibilitar a aderência das células. Após esse intervalo, o meio de cultura foi removido e substituído por meio fresco contendo o análogo NC2603 para fins de tratamento, sendo que o DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Cat. D4540) foi utilizado como controle de solvente.

5.9.2 Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos empregando a técnica de coloração com sulforodamina B (SRB) (Sigma, Catálogo S1402-1G). Após o tratamento com o análogo NC2603 nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 μM , sem remover o meio de cultura, foram adicionados 100 μL de ácido tricloroacético a 10% gelado, de maneira cuidadosa. As placas foram então incubadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ por um período de 1 hora. Após este intervalo, as placas foram submetidas a quatro lavagens com água e deixadas para secar à temperatura ambiente.

Para a coloração, 100 μL de SRB a 0,057% (peso/volume) foram adicionados e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens com ácido acético a 1% para remover o excesso de corante não ligado às proteínas de adesão. As placas foram novamente deixadas para secar à temperatura ambiente.

Para a leitura das placas, 200 μL de Trisbase 10 mM a pH=10,5 foram adicionados para solubilizar o corante. As placas foram agitadas em um shaker por 5 minutos e, posteriormente, submetidas à leitura, que foi realizada em uma leitora de placas Biotek Plate Reader Synergy, com um comprimento de onda de 510 nm.

Para calcular os valores de IC_{50} , uma série de diluições foi realizada a partir de uma concentração inicial de 50 μM , com redução pela metade em cada etapa subsequente (50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 μM). Isso permitiu a construção de curvas com tendências logarítmicas, das quais equações foram derivadas. Essas equações, por sua vez, foram utilizadas como ferramentas fundamentais para o cálculo do valor de IC_{50} .

5.9.3 Avaliação de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio de maneira geral, empregou-se o reagente dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA). Antes da coloração das células, foi conduzido um tratamento com Antimicina A a 50 μM para indução da geração de espécies reativas de oxigênio, com o intuito de estabelecer um controle positivo. O tratamento foi realizado utilizando o análogo NC2603 em sua concentração de IC_{50} (4 μM) e metade dessa concentração (2 μM), além da curcumina a 4 μM , ao longo de um período de 30 minutos. Subsequentemente, a placa foi lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para

eliminação de impurezas, e 200 μL de uma solução de DCFH-DA a 10 μM foram adicionados. A placa foi então incubada em uma estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$, mantida na ausência de luz, durante 1 hora.

As placas foram submetidas à leitura utilizando uma leitora de placas Biotek Plate Reader Synergy, com comprimentos de onda de excitação de 485/20 nm e de emissão de 530/25 nm.

5.9.4 Avaliação de superóxido

Foram conduzidos ensaios específicos para avaliar a produção de superóxido, empregando o reagente MitoSOX (Invitrogen, catálogo M36008). Novamente, com o objetivo de estabelecer um controle positivo, procedeu-se ao tratamento com Antimicina A a 50 μM durante 30 minutos. Foram realizados tratamentos com o análogo NC2603 em sua concentração de IC₅₀ (4 μM) e metade dessa concentração (2 μM), além da curcumina a 4 μM . Após a realização do controle positivo, a placa foi submetida a lavagem, seguida pela adição de 100 μL de uma solução do reagente MitoSOX, na concentração de 5 μM . A placa foi então incubada em uma estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz, durante 30 minutos. A leitura das placas foi realizada por meio de uma leitora de placas Biotek Plate Reader Synergy, com comprimentos de onda de excitação de 530/25 nm e de emissão de 590/35 nm.

5.9.5 Potencial de membrana

5.9.5.1 JC-1

A primeira técnica empregada para avaliar a redução do potencial de membrana mitocondrial após o tratamento com o análogo NC2603 envolveu o uso do fluoroforo JC-1 (Abcam, catálogo 141387).

As células foram subcultivadas em placas de cultura de 96 poços, com densidades de 1×10^5 células/mL ou 2×10^4 células por poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$, em uma atmosfera com 5% de dióxido de carbono (CO_2), ao longo de um período de 24 horas para permitir a adesão celular. Após este período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução de fosfato salino tamponado com fosfato (DPBS).

Após a lavagem, 100 µL de JC-1 a 5 µM, em meio de cultura DMEM sem fenol vermelho, foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C em uma estufa, na ausência de luz, durante 15 minutos. Posteriormente, os poços foram novamente lavados e, em seguida, os tratamentos com análogo NC2603 em sua concentração de IC50 (4 µM), curcumina a 4 µM foram adicionados, todos em meio de cultura DMEM sem fenol vermelho. O solvente DMSO foi utilizado como controle negativo, enquanto o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) serviu como controle positivo. O tratamento prosseguiu por 24 horas, com a placa mantida em uma estufa a 37 °C.

As leituras das placas foram realizadas utilizando uma leitora de placas Biotek Plate Reader Synergy. Para a fluorescência verde, os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 485/20 nm e 528/20 nm, respectivamente. Para a fluorescência vermelha, foram utilizados comprimentos de onda de excitação de 530/20 nm e emissão de 590/35 nm.

5.9.5.2 TMRE

A segunda metodologia empregada para avaliação do potencial de membrana utilizou o reagente Tetrametilrodamin, Etil Ester, Perclorato (TMRE) (Sigma Aldrich, catálogo 87917-25MG).

Após o tratamento conforme o protocolo previamente estabelecido, os poços foram submetidos a uma lavagem com solução de fosfato salino tamponado com fosfato (DPBS), seguida da adição de 200 µL de solução de TMRE a uma concentração de 100 nM. As placas foram então incubadas por 30 minutos em uma estufa a 37 °C. Após o período de incubação, os poços foram novamente lavados e 100 µL de DPBS foram adicionados.

A leitura das placas foi realizada utilizando uma leitora de placas Biotek Plate Reader Synergy, com comprimentos de onda de excitação de 530/20 nm e de emissão de 590/35 nm.

5.9.6 Normalização dos dados

Os valores obtidos para cada replicata em um único experimento podem apresentar variações. No entanto, a interpretação dos resultados é sempre feita em relação ao controle. Para viabilizar corretamente os testes estatísticos, os dados foram submetidos a um processo de normalização.

O primeiro passo desse processo consistiu no cálculo das médias dos controles para cada evento. Posteriormente, foi determinada a razão entre essa média e as médias dos controles específicos de cada evento, gerando assim um fator normalizador exclusivo para cada evento. Esse fator, obtido para cada evento, foi então aplicado para multiplicar todos os valores correspondentes a cada evento, incluindo os valores dos controles.

Além disso, os valores foram ajustados com base no número de células, ou seja, a intensidade de fluorescência foi dividida pelo número de células presentes. Nos poços que continham 100% de células, a intensidade de fluorescência foi dividida pelo número total de células. Em contraste, nos poços sujeitos a tratamento com a concentração de IC50, a intensidade de fluorescência foi dividida pela metade do número de células inicialmente cultivadas.

5.9.7 Obtenção de imagens

Em todos os ensaios envolvendo fluorescência, as imagens foram adquiridas por meio de microscopia de fluorescência utilizando um microscópio invertido Olympus IX71. Para a captura das imagens, foi empregada uma câmera Qimaging QICAM Fast1394, controlada pelo software Image-Pro Discovery. Algumas imagens também foram realizadas utilizando o equipamento ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD).

5.10 TESTES ESTATÍSTICOS

Para obtenção dos dados estatísticos de cada experimento, foram utilizados os testes ANOVA unidirecional e multidirecional, seguido pelos testes de comparações múltiplas de Tukey e Bonferroni respectivamente. Dois testes de correlação foram utilizados para avaliar a relação entre os dois conjuntos de dados (RNAseq e RT-qPCR): um teste paramétrico (correlação de Pearson) e um teste não paramétrico (correlação de Spearman).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 POTENCIAL CITOTOXICO DO ANALOGO NC2603 EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES

Na busca por novos compostos com atividades antitumorais, um dos efeitos mais desejados é a manifestação de citotoxicidade. Este fenômeno é avaliado com base nos parâmetros estipulados pelos Critérios de Avaliação de Resposta para Tumores Sólidos (RECIST - Response Evaluation Criteria for Solid Tumors). O RECIST representa um protocolo normatizado amplamente empregado para a avaliação dos resultados de tratamentos em tumores sólidos, conferindo primordial ênfase à redução do volume tumoral como indicador preeminente (R. L. Anderson et al., 2019; Ko et al., 2021). Sendo assim, independentemente das vias ou modos de ação empregados pelas moléculas investigadas, é imprescindível que tais agentes se revelem capazes de inviabilizar a sobrevivência das células neoplásicas, inibindo, assim, o crescimento tumoral e induzindo sua regressão.

Os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos empregando a técnica da redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo). A utilização deste composto é respaldada pela sua carga positiva, o que lhe confere a capacidade de penetrar tanto membranas celulares intactas quanto membranas internas das mitocôndrias. Em virtude da atividade metabólica intracelular, o MTT sofre uma transformação química, sendo reduzido a uma molécula violeta insolúvel em água denominada formazan (Berridge et al., 2005).

A metodologia do ensaio de MTT (como é conhecido na literatura científica), foi primeiramente descrita por Mosmann em 1983 (Mosmann, 1983). Atualmente, os cristais de formazan gerados durante o ensaio são solubilizados por meio do solvente orgânico Dimetilsulfóxido (DMSO). A solução resultante, com coloração violeta, é então submetida à mensuração da densidade óptica (OD, Optical Density) por meio de espectrofotometria em uma leitora de microplacas.

Portanto, essa abordagem se configura como uma técnica colorimétrica qualitativa e quantitativa amplamente empregada, notável por sua acessibilidade econômica. Ela é comumente utilizada para avaliar a atividade metabólica, a função mitocondrial, a viabilidade celular e a citotoxicidade de moléculas em estudos biológicos e farmacológicos. Entretanto, é importante mencionar que há controvérsias quanto à interpretação dos resultados, uma vez que

alguns estudos demonstram que a produção de formazan pode ser influenciada por diversos fatores além da atividade metabólica, o que sugere a necessidade de realizar ensaios complementares para respaldar as conclusões, suposições e hipóteses derivadas dos ensaios de MTT (Ghasemi et al., 2021).

Com base nos ensaios de indução de apoptose e análise de sequenciamento, que proporcionam insights acerca dos mecanismos pelos quais os compostos podem afetar as células no contexto da morte celular, os experimentos utilizando ensaios de MTT foram executados neste estudo com a finalidade de avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade em resposta a tratamentos empregando análogos da curcumina.

Foram conduzidos ensaios utilizando as linhagens celulares MCF-7 e BT-20, nas quais foram submetidas a tratamentos com diferentes análogos, todos na concentração de 5 μ M (Figura 3). Notou-se que o composto 2603 exibiu uma notável capacidade de inibição em ambas as linhagens celulares, o que justificou a seleção deste composto para prosseguir em ensaios subsequentes.

A média de inibição dos análogos para a linhagem MCF-7 foi de 30%, enquanto para a linhagem BT-20 foi de 50%. É relevante destacar que o controle realizado com doxorrubicina não apresentou um desvio padrão significativamente elevado. Isso sugere que a variabilidade no desvio padrão pode ser atribuída à possível instabilidade dos compostos quando em contato com o meio de cultura celular, o qual é mantido com pH tamponado.

É pertinente observar que a maioria dos análogos demonstrou uma maior capacidade de inibição em comparação com a doxorrubicina, utilizada na mesma concentração. Conforme mencionado na introdução, é relevante ressaltar que o uso da doxorrubicina está associado a efeitos colaterais adversos, notadamente a cardiomiopatia (Chatterjee et al., 2010; McGowan et al., 2017; Saltiel & McGuire, 1983).

A Figura 4 evidencia a disparidade nos resultados obtidos por meio do tratamento com o composto 2603 em contraposição à doxorrubicina. É notável que, para as linhagens celulares BT-20 e MCF-7, o análogo 2603 manifestou uma significativa influência na viabilidade celular, em contraste com a linhagem HaCat. Esta divergência de efeito é distinta do que se observou com o uso da doxorrubicina, onde o maior efeito foi identificado na linhagem de células não tumorais.

FIGURA 3 - Os gráficos de viabilidade das linhagens celulares BT-20 e MCF-7 foram gerados a partir de tratamentos com diversos análogos da curcumina, bem como do uso da doxorrubicina, todos na concentração de 5 μ M e com uma duração de exposição de 24 horas. No eixo vertical desses gráficos, são representadas as porcentagens de inibição provocadas pelos diferentes compostos testados, enquanto no eixo horizontal são indicados os compostos em avaliação.

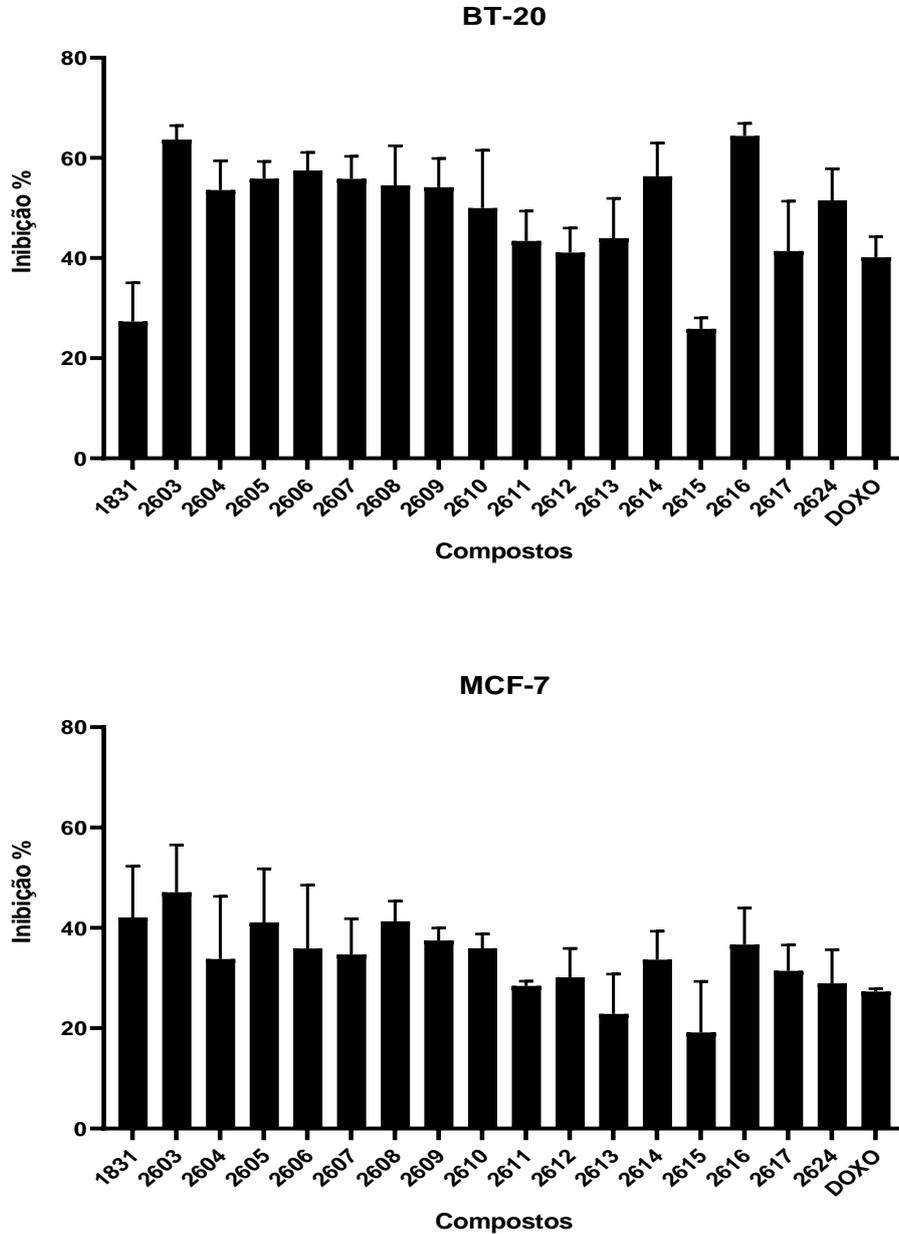
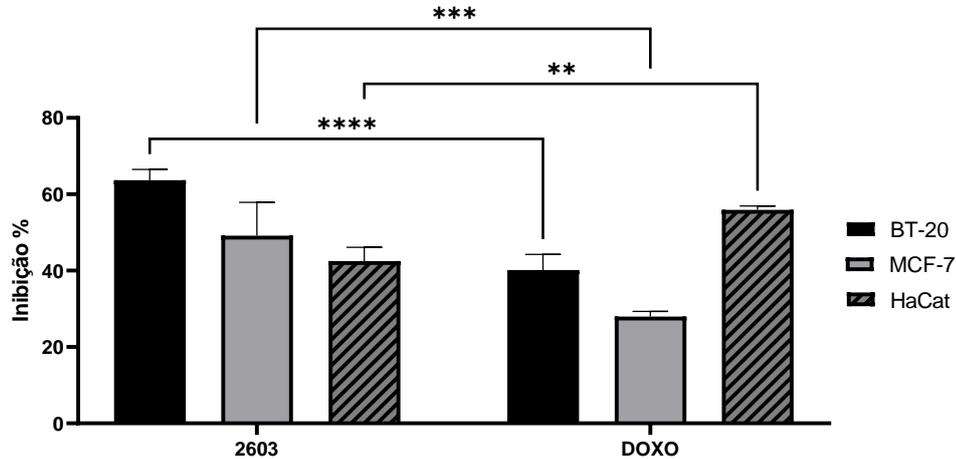


FIGURA 4 – Comparação do potencial citotóxico do composto 2603 em relação à doxorubicina em linhagens tumorais BT-20 e MCF-7, bem como em uma linhagem não tumoral de queratinócitos humanos, denominada HaCat. Todos os tratamentos foram administrados a uma concentração de 5 μ M, com uma duração de exposição de 24 horas.



A curcumina, uma molécula de interesse devido às suas propriedades bioativas, apresenta em sua estrutura uma configuração na qual sete átomos de carbono conectam dois anéis fenólicos. No entanto, é importante observar que nos rizomas da planta *Curcuma longa*, encontram-se compostos análogos à curcumina, os quais se caracterizam por possuir cinco átomos de carbono interconectando esses anéis, resultando em uma estrutura com apenas um grupo cetona, em contraste com os dois grupos cetona presentes na molécula de curcumina que possui sete átomos de carbono (Masuda et al., 1993; Sueth-Santiago et al., 2015).

Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo das diferenças entre esses compostos contendo cinco e sete átomos de carbono. Por exemplo, Lin et al. investigaram a eficácia dos compostos com cinco átomos de carbono no tratamento do câncer de próstata, enquanto Robinson et al. avaliaram a atividade dos análogos no contexto da inibição da angiogênese (Lin et al., 2006; Robinson et al., 2003). Outros estudos também demonstram a atividade citotóxica dos análogos com cinco átomos de carbono, revelando uma capacidade de inibição de cerca de 50% das células quando utilizadas concentrações próximas ou inferiores a 10 μ M (Yamakoshi et al., 2010). Essas pesquisas contribuem para a compreensão das potenciais aplicações terapêuticas desses análogos e suas diferenças em relação à curcumina.

Todos os compostos avaliados neste estudo são análogos da curcumina, com uma característica distintiva em relação aos outros mencionados: a adição de uma piperidina na região central da estrutura molecular.

Um parâmetro amplamente empregado para a avaliação da eficácia de substâncias farmacológicas é a determinação da Concentração Inibitória de 50% (IC50) da população celular submetida ao ensaio (Sebaugh, 2011). Acredita-se que quanto menor a concentração necessária para atingir 50% de inibição celular, maior é o potencial terapêutico do composto em questão, uma vez que demonstra a capacidade de induzir efeitos significativos em doses reduzidas.

Os valores de IC50 do análogo NC2603 para as linhagens BT-20 e MCF-7 foram determinados por meio de ensaios de viabilidade celular utilizando o método de redução do sal MTT. Dado que os pontos nos gráficos exibiram tendências logarítmicas (Figura 5), curvas de tendência foram ajustadas para derivar equações que possibilitaram o cálculo dos valores de IC50. A equação referente à linhagem BT-20 foi:

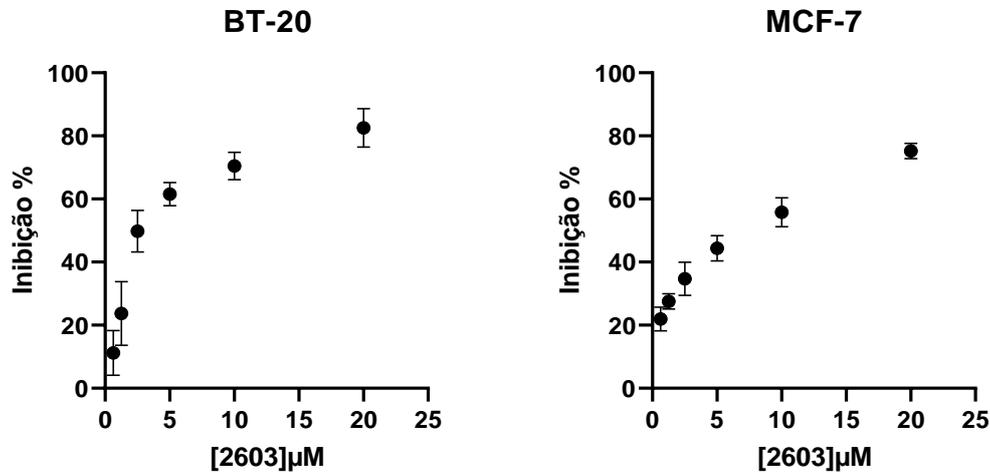
$$y = 20,961 \ln(x) + 23,404$$

e para a linhagem MCF-7:

$$y = 14,864 \ln(x) + 24,512$$

Em ambos os casos, a variável "y" foi fixada no valor de 50, uma vez que o eixo vertical y representa a porcentagem de inibição e 50% é a porcentagem de interesse para o ensaio. Os valores de IC50 obtidos foram de 3,5 µM para a linhagem BT-20 e 5,6 µM para a MCF-7.

FIGURA 5 – Curvas de IC₅₀ referentes ao composto 2603 nas linhagens BT-20 e MCF-7 são apresentadas. Estes gráficos ilustram os ensaios de viabilidade celular conduzidos com o objetivo de determinar os valores de IC₅₀ para cada linhagem.



6.2 MODULAÇÃO DE GENES ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM O ANALOGO NC2603

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento, tornou-se possível realizar o sequenciamento de genomas completos em questão de poucos dias. Além do genoma, essas técnicas também nos permitem acessar informações do transcriptoma, que se refere às sequências de RNA transcritas a partir do DNA. Essas informações são de grande valor e são utilizadas para avaliar a expressão gênica em um determinado momento, como após tratamentos com substâncias farmacológicas.

As tecnologias de sequenciamento evoluíram ao longo do tempo, e embora estejamos atualmente na quarta geração, que inclui equipamentos portáteis do tamanho de um dispositivo móvel, a terceira geração, também conhecida como sequenciamento de nova geração (NGS - Next Generation Sequencing), ainda é a mais amplamente empregada. Nesse contexto, destacam-se duas principais tecnologias: Ion Torrent e Illumina, devido à sua avançada capacidade e robustez. Por esse motivo, e em decorrência de colaborações com grupos de pesquisa, optou-se pelo uso da tecnologia Illumina neste estudo.

Após a determinação dos valores de IC₅₀ para as linhagens MCF-7 e BT-20, procedeu-se à padronização do tratamento para a extração de RNA total, visando o ensaio de sequenciamento. A concentração celular selecionada para este ensaio foi de 2×10^5 células/mL, cultivadas em frascos de cultura contendo 5 mL da suspensão celular, resultando em um total

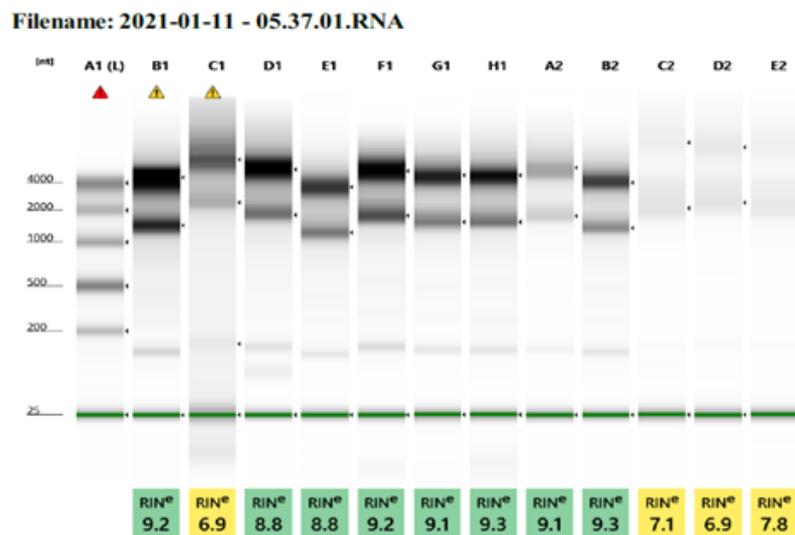
de 1×10^6 células. Estas células foram tratadas com os respectivos valores de IC_{50} correspondentes a cada linhagem.

As extrações de RNA foram conduzidas, e as amostras foram submetidas a testes de análise de qualidade do RNA extraído (conforme ilustrado na figura 6).

O RIN (RNA Integrity Number) é um algoritmo empregado para avaliar a integridade dos RNAs, baseado na análise de eletroferogramas que contêm informações relativas aos RNAs ribossomais 18S e 28S. Para a realização do RNA-Seq, foi estabelecido um valor mínimo de RIN igual a 8 como critério de inclusão das amostras. As amostras B1, C1, D1, C2, D2 e E2 correspondem à linhagem BT-20, enquanto as demais amostras, com exceção da amostra A1, que foi utilizada como controle, referem-se à linhagem MCF-7.

Ao analisar os resultados (figura 6), observamos que as amostras C1, C2, D2 e E2 apresentaram valores de RIN inferiores a 8, não atendendo ao critério mínimo estabelecido para a realização do sequenciamento. A amostra C1 demonstrou baixa qualidade devido à presença de possíveis contaminantes e degradações. Quanto às amostras C2, D2 e E2, suas concentrações não se encontravam dentro dos parâmetros adequados para a realização do ensaio. Portanto, as amostras relacionadas à linhagem BT-20 foram submetidas a um processo adicional de extração, obtendo-se êxito nessa etapa, o que permitiu sua subsequente submissão ao processo de sequenciamento.

FIGURA 6 - Análise de qualidade do RNA foi conduzida utilizando o TapeStation. As bandas observadas correspondem aos RNAs ribossomais 18S e 28S. No entanto, para as amostras C2, D2 e E2, a intensidade das bandas foi consideravelmente baixa, indicando uma concentração de RNA reduzida nestas amostras.

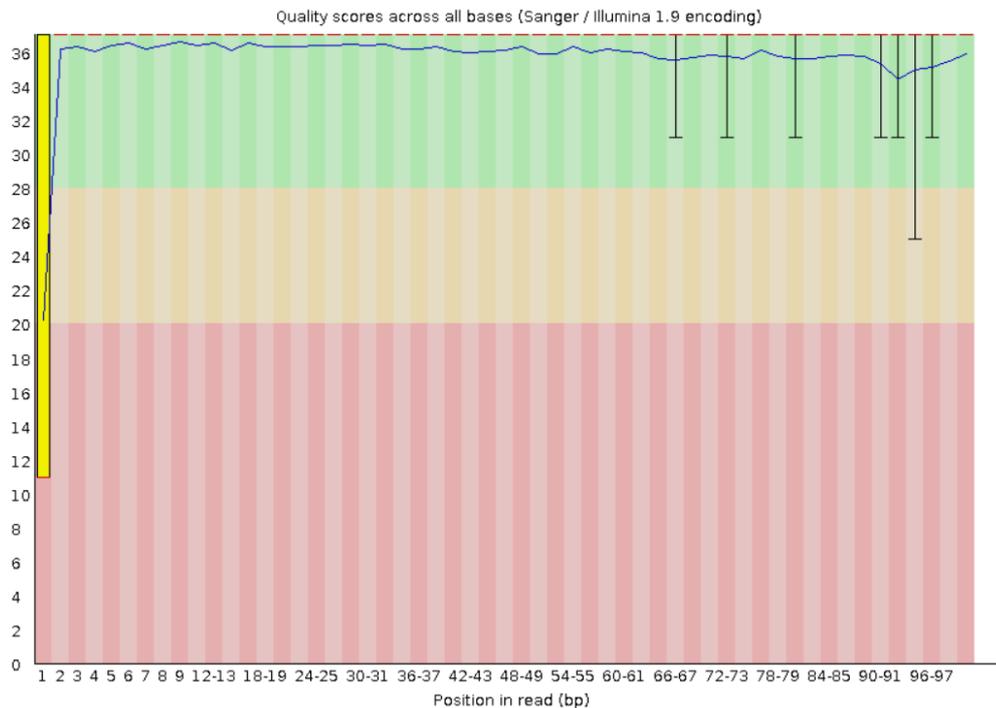


Um dos parâmetros analisados nos arquivos gerados após o sequenciamento é a probabilidade de erro de um nucleotídeo em uma posição específica (figura 7). Essa probabilidade é calculada com base na intensidade de sinal emitida por um cluster de nucleotídeos, onde uma maior intensidade de sinal indica uma menor probabilidade de erro, e vice-versa. Os valores de probabilidade são utilizados para calcular o Phred Score (Q), que representa a qualidade e precisão dos dados e é calculado pela fórmula:

$$Q = -10 \text{ Log}_{10}(P)$$

Aqui, P denota a probabilidade de erro. Quanto maior o Phred Score, melhor a qualidade dos dados. Geralmente, bases com um Phred Score acima de 30, onde a chance de erro é de 1 em 1000 (indicada na região verde do gráfico), são consideradas de alta qualidade.

FIGURA 7 - A qualidade da sequência por base é um dos parâmetros avaliados por meio da ferramenta FastQC. Esse parâmetro fornece informações sobre a qualidade e a precisão de cada base sequenciada.



É possível observar que, com exceção da primeira base, todas as bases apresentaram um score acima de 30, o que indica que os dados gerados no sequenciamento são de boa qualidade e confiáveis. A baixa qualidade da primeira base pode ser atribuída a possíveis resíduos de adaptadores que não foram removidos adequadamente durante o processo de

eliminação de adaptadores e indexes fornecido pela plataforma de sequenciamento Illumina. É importante ressaltar que esta imagem é apenas uma representação, pois contém apenas parte dos dados. No entanto, todos os outros arquivos de sequenciamento produziram resultados semelhantes a este.

Após a conclusão de todos os procedimentos necessários e a análise de expressão diferencial entre as linhagens tratadas e não tratadas, identificamos um total de 4.687 genes que foram modulados na linhagem BT-20 e 6.299 genes na linhagem MCF-7, com valores de P ajustados inferiores a 0,01. Além desse critério de corte no valor de P ajustado, também implementamos um limite no valor do log2foldchange, estabelecendo que os genes deveriam apresentar valores <-2 e >2 . Com base nessa condição, identificamos 714 genes na linhagem BT-20 e 872 genes na linhagem MCF-7. Entre esses genes, muitos desempenham papéis essenciais nos processos relacionados à tumorigênese, principalmente entre os que foram mais induzidos e mais reprimidos (tabela 4). Para avaliar a modulação de vias específicas, optamos por manter alguns genes que não atenderam aos critérios de corte no valor do log2foldchange, mas sim os de P ajustado.

Tabela 4 A tabela apresenta os dez genes mais induzidos e os dez mais reprimidos após o tratamento.

BT-20		MCF-7	
Gene	Log2FoldChange	Gene	Log2FoldChange
MMP10	13.8	CRYAB	8.5
CD300LB	13.5	FOSL1	8.2
AC092143.1	12.8	HMOX1	6.5
HSPA7	12.7	CD68	6.4
HSPA6	12.3	ALOXE3	5.5
1-Dec	12.3	SDCBP2	4.9
KRT75	11.9	HSPA1B	4.7
HTRA3	11.6	HSPA1A	4.6
TDRG1	11.1	PPP1R15A	4.5
SPRR2D	11.1	TUBA4A	4.1
RP13-608F4.8	-8.4	RP11-480I12.9	-8.6
RP11-158I13.2	-7.3	AP001062.1	-8.4
SLITRK6	-3.1	SPANXA1	-7.1
POU5F1B	-2.9	LUM	-5.4
LRP1B	-2.8	HAPLN1	-5.2

BT-20		MCF-7	
Gene	Log2FoldChange	Gene	Log2FoldChange
RBM14-RBM4	-2.8	GREM2	-5
C14orf180	-2.8	POSTN	-4.7
SYT4	-2.4	COL11A1	-4.4
SNRPGP15	-2.4	FENDRR	-4.3
DCT	-2.3	HDAC9	-4.2

Foram realizadas algumas análises do panorama geral dos genes modulados para cada linhagem. Uma dessas análises foi realizada utilizando o sistema de classificação PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationship*) (Mi et al., 2021). O sistema classifica proteínas e seus genes de acordo com parâmetros como funções moleculares, processos biológicos e vias. Dos 714 genes modulados na linhagem BT-20 (após corte pelo valor de log2foldchange), 527 foram relacionados a funções moleculares. E dos 872 genes da linhagem MCF-7, 675 genes foram relacionados (tabela 5).

Tabela 5 Distribuição do número de genes modulados em cada linhagem em funções moleculares. Dentro de cada uma dessas funções moleculares, são encontradas outras mais detalhadas com subprocessos os quais esses genes pertencem.

Funções	BT-20	MCF-7
Atividade de Transporte	25	40
Regulação de tradução	2	1
Regulação de transcrição	54	49
Atividade catalítica	115	158
Atividade motora de citoesqueleto	4	8
Regulação de função molecular	33	53
Atividade ATP-dependente	14	18
Atividade de transdução molecular	52	61
Atividade de adaptador molecular	1	14
Atividade estrutural	7	11
Ligação	220	272

Outra análise rápida realizada se deu pela utilização o banco de dados de assinaturas moleculares MSigDB (*Molecular Signatures Database*) (Subramanian et al., 2005). Dentro desse banco de dados, se encontram *gene sets* (conjunto de genes) divididos em 9 coleções, as quais são subdivididas em outros conjuntos mais detalhados. Foi utilizado o *hallmark gene sets*, onde podem ser encontrados 50 conjuntos de genes de estados e processos biológicos como apoptose, angiogênese, reparo de DNA, glicólise, hipoxia, vias de sinalização entre outros (Liberzon et al., 2015). Dos 714 genes modulados na linhagem BT-20, 233 foram relacionados a vias presentes no *hallmark gene sets*. E dos 872 genes da linhagem MCF-7, 267 foram relacionados (tabela 6).

Observou-se que alguns desses sets fazem parte dos processos de tumorigenese, como via da P53, apoptose e transição epitélio mesenquimal. Porém, a modulação causada pelo composto pode estar tanto beneficiando quanto prejudicando as células tumorais.

Tabela 6 Relação entre o número de genes modulados em cada linhagem e seus respectivos gene sets.

Gene set	BT-20	MCF-7
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	44	34
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	32	41
HALLMARK_P53_PATHWAY	22	25
HALLMARK_APOPTOSIS	19	21
HALLMARK_COAGULATION	15	0
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	23	22
HALLMARK_UV_RESPONSE_UP	14	14
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	21	8
HALLMARK_HYPOXIA	15	27
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	0	16
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	13	19
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	9	17
HALLMARK_MYOGENESIS	6	0
HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION	0	9
HALLMARK_COMPLEMENT	0	8
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_DN	0	6

Além dessas análises, ainda foi realizado um enriquecimento por Gene Ontology (GO). Foi utilizado um site de análise de dados online (<http://www.bioinformatics.com.cn/>, acessado em 29 de junho de 2023). Este site fornece mapas visuais informativos que auxiliam na interpretação e exploração de categorias funcionais enriquecidas (figuras 8 e 9).

FIGURA 8 - A imagem apresenta os resultados da análise de enriquecimento para os dados do sequenciamento para a linhagem BT-20, fornecendo uma representação visual da quantidade e pontuação dos genes categorizados em a, processos biológicos e b, funções moleculares.

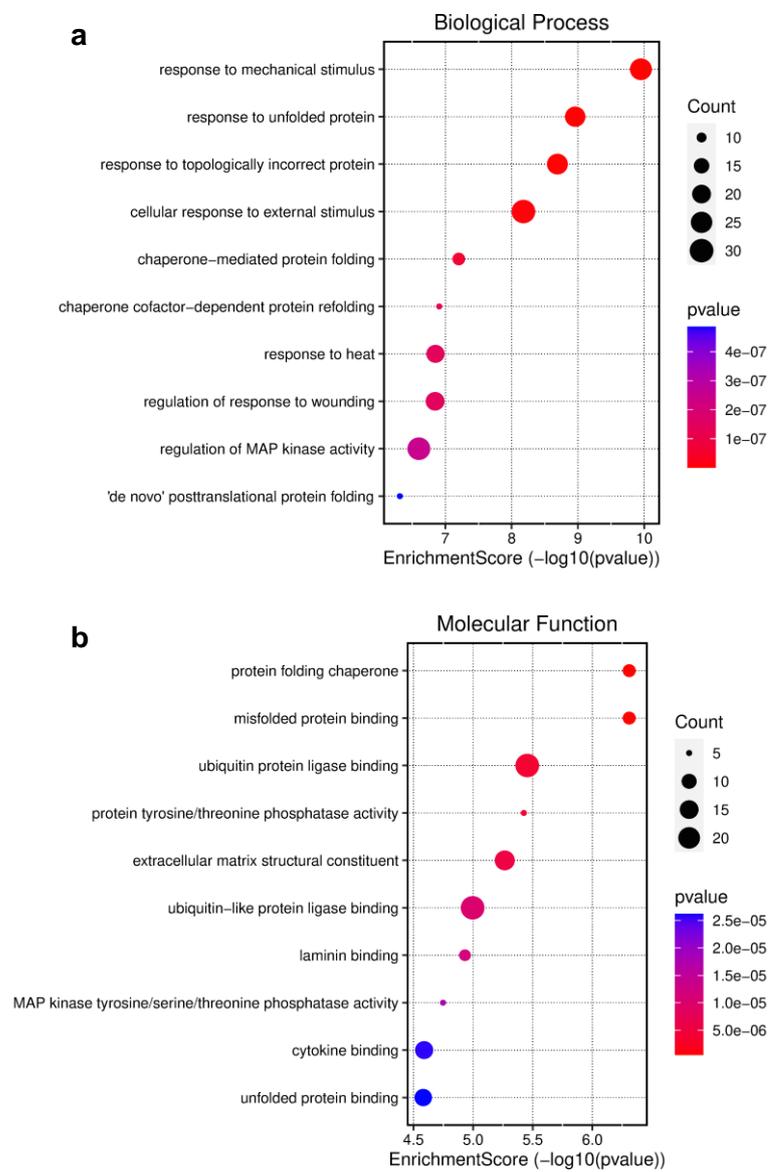
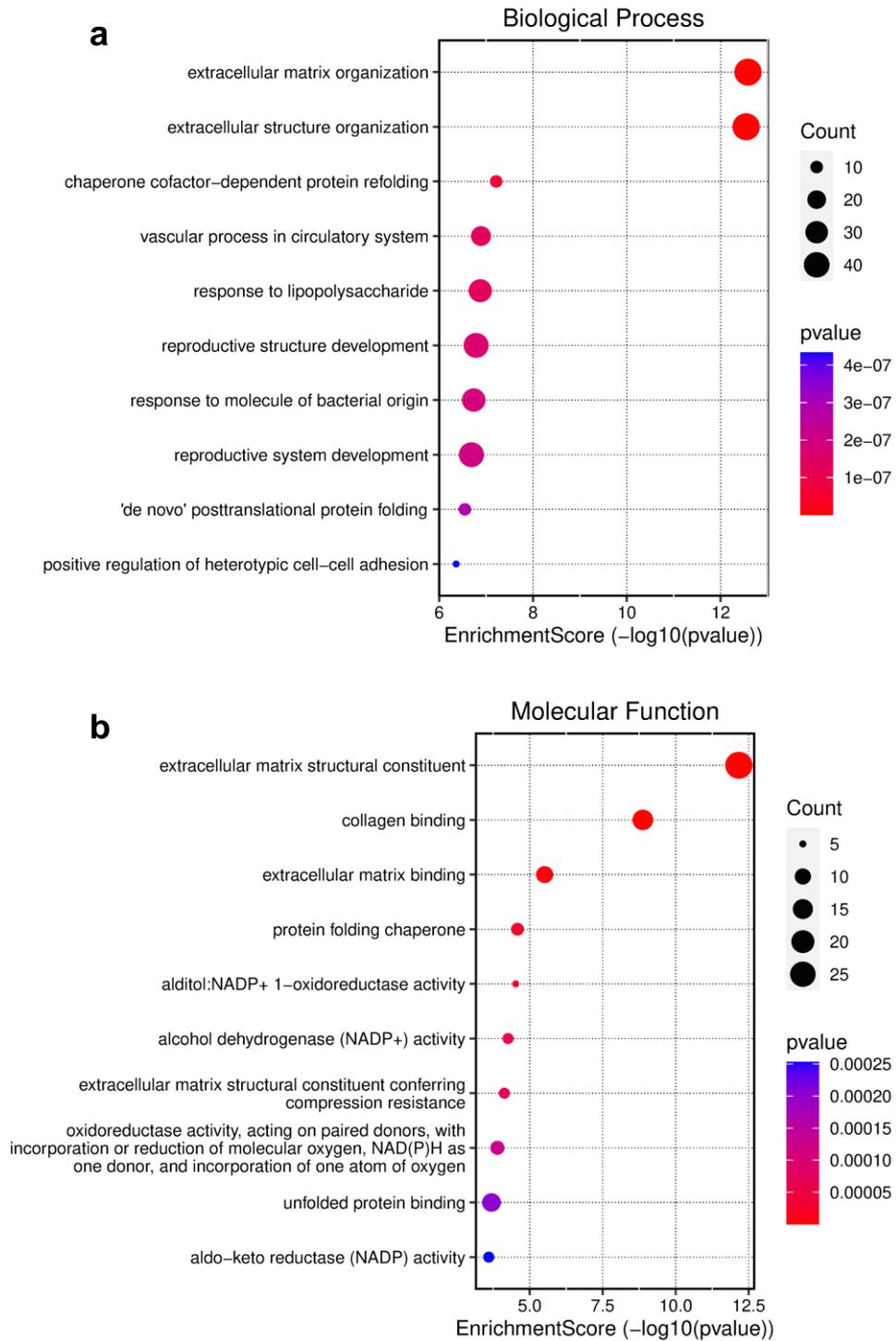


FIGURA 9 - A imagem apresenta os resultados da análise de enriquecimento para os dados do sequenciamento para a linhagem MCF-7, fornecendo uma representação visual da quantidade e pontuação dos genes categorizados em **a**, processos biológicos e **b**, funções moleculares.



Essas análises desempenham um papel fundamental na compreensão do impacto global provocado pelo tratamento, destacando as vias, processos e funções que foram influenciados, tanto de forma positiva quanto negativa. No entanto, como será discutido posteriormente, são necessários ensaios adicionais para validar a funcionalidade de cada gene e o verdadeiro efeito do tratamento sobre as vias identificadas. Apesar dos resultados obtidos, nenhuma das vias identificadas por essas análises foi objeto de investigação detalhada até o momento. É plausível que os genes selecionados para estudos aprofundados estejam contidos nas categorias apresentadas. Por exemplo, os genes escolhidos para a linhagem BT-20 estão relacionados à migração celular, o que sugere que possam estar inseridos na categoria de transição epitelial-mesenquimal, conforme apresentado na Tabela 6. Da mesma forma, os genes selecionados para a linhagem MCF-7 podem estar envolvidos nas categorias de Regulação da Transcrição da tabela 5 e Respostas ao Receptor de Estrógeno da tabela 6.

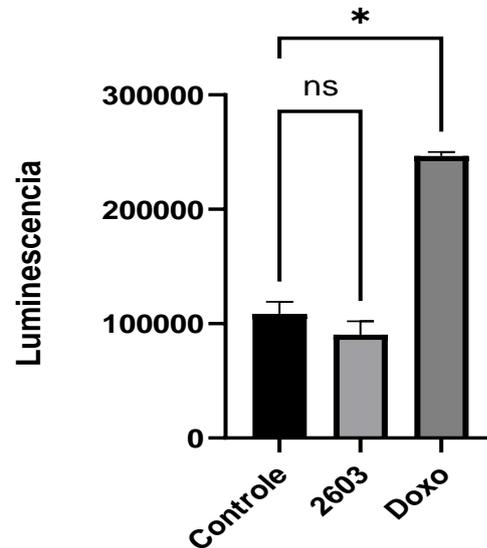
6.3 INDUÇÃO DE APOPTOSE: POSSÍVEL MECANISMO PARA CITOTOXICIDADE DO ANÁLOGO NC2603

A apoptose tem sido, ao longo do tempo, uma das vias amplamente exploradas como alvo terapêutico nos tratamentos contra o câncer. Diversos fármacos com potencial nessa direção estão em estudo e já estão disponíveis no mercado, incluindo Navitoclax, Venetoclax, Birinapant e Idasanutlin (Carneiro & El-Deiry, 2020).

Este processo é notavelmente complexo, envolvendo um intrincado conjunto de moléculas. Algumas dessas moléculas desempenham papéis cruciais e são ativadas durante o processo apoptótico, com destaque para as caspases. Por conseguinte, essas moléculas podem ser empregadas como biomarcadores dessa via.

No contexto do ensaio de quantificação de caspase 3/7 realizado na linhagem BT-20, observou-se que o tratamento com o composto não demonstrou diferença significativa em relação ao resultado do grupo controle (Figura 6). Em contrapartida, a doxorubicina, conhecida por induzir a apoptose, provocou a ativação das caspases, descartando, portanto, possíveis hipóteses de erro experimental.

FIGURA 10 - O gráfico representa a quantificação da atividade da caspase-3/7 em linhagem BT-20. O tratamento foi conduzido ao longo de um período de 24 horas, com ambos os compostos (2603 e doxorrubicina) na concentração de 3,5 μ M, e o controle foi realizado utilizando o solvente orgânico DMSO em uma concentração inferior a 0,2%. A intensidade de emissão de luz está diretamente relacionada à quantidade de caspases-3/7 em atividade, o que torna a quantificação possível por meio da luminescência (* $p < 0,02$).



O ensaio foi conduzido exclusivamente com a linhagem BT-20, devido à ampla compreensão de que a linhagem MCF-7 não apresenta expressão de caspase-3 (Jänicke, 2009; Tian, 2023; Xiao-He Yang et al., 2001).

No entanto, é importante destacar que a avaliação da atividade da caspase 3/7 não é suficiente para determinar se as células estão ou não passando pelo processo de apoptose. Outros marcadores desse processo estão disponíveis, como a fosfatidilserina (phosphatidylserine, PS), um fosfolípido localizado no folheto interno da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose, a perda de assimetria da membrana plasmática resulta na exposição externa do PS (Koopman et al., 1994), o que facilita o reconhecimento das células apoptóticas por células fagocíticas (Naeini et al., 2020).

É relevante salientar que a exposição do PS também está associada ao aumento da atividade coagulante (Zwaal et al., 1977). Isso levou à descoberta de que a proteína placentar anticoagulante I, conhecida como Annexina V, que possui afinidade por moléculas com carga negativa, como o PS (Tait & Smith, 1991). Como resultado, os ensaios contemporâneos que buscam obter informações sobre células em processo de apoptose fazem uso dessa afinidade entre as moléculas, destacando a relevância da exposição de PS como um marcador adicional nesse contexto.

Adicionalmente, é possível discernir o processo de apoptose de outras formas de morte celular, como a necrose, por meio da utilização do iodeto de propídio (Propidium Iodide - PI). O PI se liga ao DNA de maneira inespecífica e, quando a membrana celular está comprometida (um fenômeno característico das células necróticas), o PI pode adentrar a célula e se intercalar no DNA (Eray et al., 2001).

Para a detecção dessas moléculas, emprega-se a tecnologia de citometria de fluxo. Trata-se de uma técnica analítica que opera em nível de célula única, na qual as amostras são direcionadas em um fluxo contínuo através de feixes de luz de diferentes comprimentos de onda (McKinnon, 2018). Os comprimentos de onda visíveis fornecem informações relativas ao tamanho e à complexidade interna das células. Por outro lado, os comprimentos de onda não visíveis são empregados para detecção de fluorescência, resultante da interação com proteínas fluorescentes, corantes fluorescentes (como o PI), ou anticorpos conjugados a moléculas fluorescentes, como a anexina conjugada com FITC.

A partir destes dados, é possível discriminar e quantificar com precisão as células apoptóticas das células que sofreram danos na membrana ou mesmo as células em estado de necrose.

Embora o ensaio de quantificação das caspases não tenha apresentado evidências de apoptose após o tratamento com o análogo 2603, os ensaios de citometria de fluxo revelaram a marcação positiva para anexina V em células submetidas ao mesmo tratamento. Cerca de 63% das células entraram em apoptose após o tratamento (Figura 7 e 8).

É importante notar que as marcações com anexina V nas amostras controle apresentaram níveis relativamente elevados. A concentração do solvente DMSO foi mantida abaixo de 0,2%, uma concentração geralmente considerada segura e não citotóxica para as células, não influenciando significativamente nos resultados. A comunidade científica tem debatido a concentração limite segura para o uso desse solvente, com variações sugeridas entre 0,1% a 1%. No entanto, não é possível concluir as razões por trás dos resultados obtidos nas amostras controle. É relevante ressaltar a diferença entre essas amostras controle e as amostras tratadas, com exceção do tratamento utilizando curcumina na concentração de 3,5 μM , que apresentou resultados semelhantes aos do grupo controle.

Genericamente, a análise envolve a soma das porcentagens dos quadrantes que indicam a marcação e sinalização pela Anexina V-FITC, ou seja, Q2 e Q4. É importante mencionar que alguns pesquisadores se referem ao quadrante Q2 como indicativo de apoptose tardia. Esta designação se baseia no fato de que, além da sinalização da Anexina V-FITC, no

quadrante Q2 ocorre também a marcação pelo iodeto de propídio (PI). O PI é comumente utilizado como marcador de morte celular, geralmente associada à necrose. Devido a essas interpretações variáveis, existem divergências entre os autores quanto à classificação do quadrante Q2 como apoptose tardia.

Por outro lado, em estágios avançados do processo de apoptose, ocorre a permeabilização da membrana celular (Poon et al., 2009), o que possibilita a entrada do PI e sua subsequente intercalação com o DNA, resultando em um aumento significativo (20 a 30 vezes) na emissão de sinal pelo PI. Portanto, com base nesse fenômeno, optou-se por somar as porcentagens dos quadrantes Q2 e Q4 como uma abordagem para identificação de células em processo de apoptose.

Mais uma vez, observamos estudos que demonstram a capacidade da curcumina de induzir apoptose e seus mecanismos subjacentes (Mortezaee et al., 2019; Patel et al., 2019; C. Yang et al., 2017). No entanto, é importante notar que esses estudos frequentemente empregam concentrações elevadas, como evidenciado no tratamento com curcumina a 30 μM .

Da mesma forma, pesquisas que investigam os efeitos da indução de apoptose por análogos da curcumina geralmente obtêm resultados semelhantes com o uso de concentrações próximas às da curcumina (Ali et al., 2017; Rahim et al., 2021; L. Wang et al., 2019). Nesse contexto, até o momento, o análogo 2603 demonstrou ser bem-sucedido na indução de apoptose.

Os mecanismos subjacentes à indução de apoptose pelo análogo 2603 ainda não foram completamente elucidados. A ausência de ativação das caspases, por exemplo, sugere a possibilidade da indução de um processo caspase-independente na linhagem BT-20.

Foram conduzidos ensaios experimentais com a linhagem celular MCF-7, no entanto, os resultados obtidos revelaram-se inconclusivos devido à observação de elevadas taxas de apoptose (quadrante Q4) nos controles, as quais demonstraram ser ainda mais significativas em comparação aos dados apresentados nos gráficos correspondentes à linhagem celular BT-20. Uma possível explicação para esse fenômeno pode ser atribuída à utilização da tripsina como agente de dissociação celular. A ação da tripsina pode ser potencialmente agressiva e prejudicial para a integridade da membrana celular, ocasionando interferência no ensaio de apoptose por meio da técnica de citometria de fluxo (Lai et al., 2022; Nowak-Terpiłowska et al., 2021). Uma alternativa apresentada na literatura é a Accutase, que por sua vez causa menos danos.

FIGURA 11 – Os resultados dos ensaios de apoptose por citometria de fluxo são apresentados nos gráficos que representam a quantificação das células da linhagem BT-20 marcadas com PI (eixo y - vertical) e Anexina V FITC (eixo x - horizontal). Os gráficos estão divididos em quatro quadrantes, denominados Q1, Q2, Q3 e Q4. De forma geral, o Q1 representa exclusivamente as células marcadas com PI (ou aquelas que estão passando por um tipo de morte diferente de apoptose), o Q2 é associado às células em apoptose tardia, o Q3 abriga as células viáveis e o Q4 engloba as células em processo de apoptose. Os tratamentos foram conduzidos utilizando o análogo 2603 e a doxorubicina, ambos na concentração de 3,5 μM . O grupo controle foi submetido ao uso de DMSO a uma concentração inferior a 0,2%.

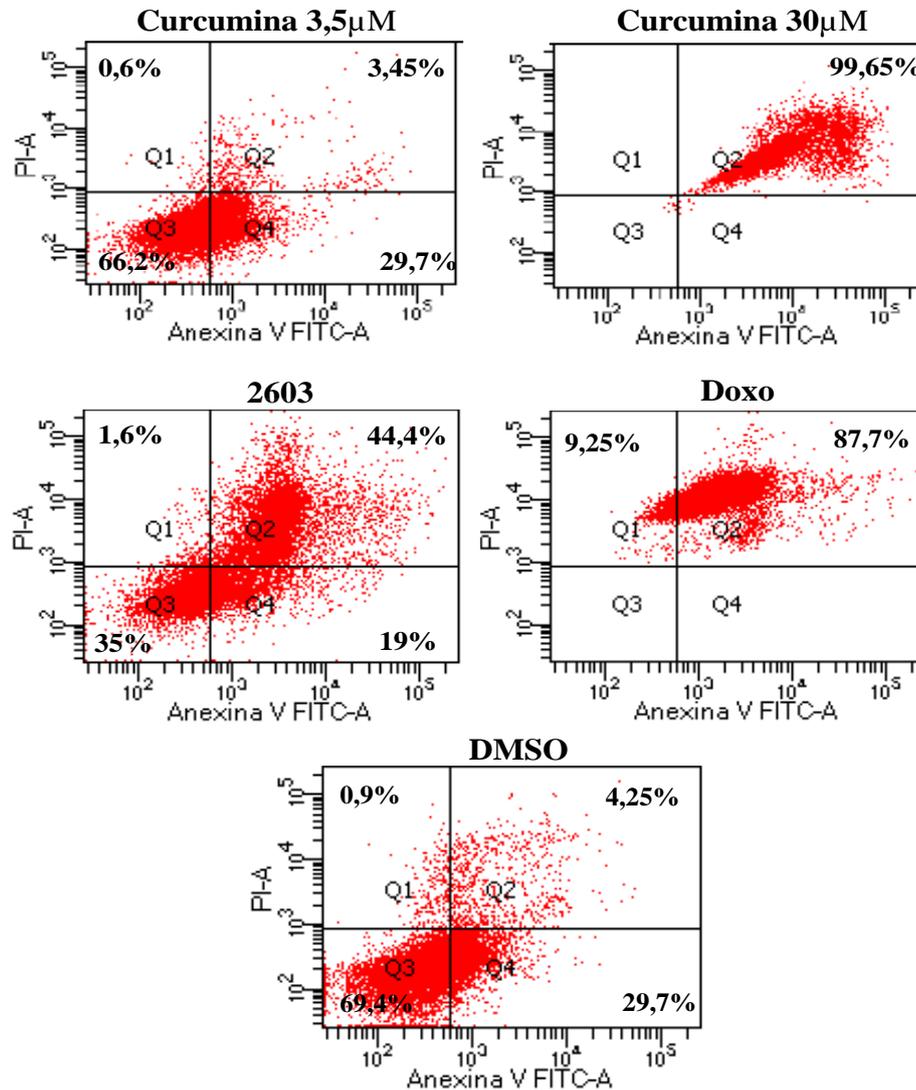
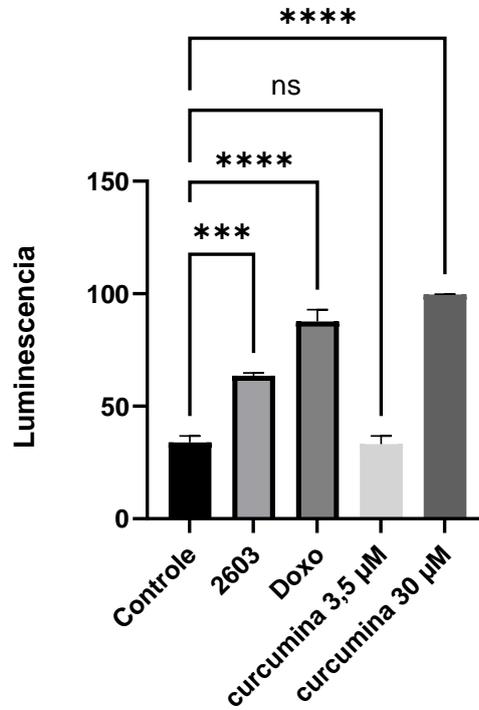


FIGURA 12 – Quantificação de Células em Apoptose. O gráfico exibe a soma das porcentagens dos quadrantes Q2 e Q4, representando, desse modo, a proporção de células que passaram pelo processo de apoptose em cada tratamento. Os tratamentos foram conduzidos utilizando o análogo 2603 e a doxorubicina, ambos na concentração de 3,5 μ M. O grupo controle foi submetido ao uso de DMSO a uma concentração inferior a 0,2%. (***) $p < 0,0003$, **** $p < 0,0001$).



6.4 POTENCIAL ANTIMETASTÁTICO DO ANALOGO NC2603

Conforme mencionado anteriormente, o RECIST baseia-se principalmente na avaliação do encolhimento tumoral como critério de eficácia. No entanto, diversos fatores e efeitos associados a drogas antitumorais, como a capacidade de inibição de metástase, são geralmente desconsiderados neste sistema (R. L. Anderson et al., 2019). Além disso, a terapia adjuvante é amplamente reconhecida como a estratégia mais eficaz para a prevenção de recidivas e o tratamento após o diagnóstico, com recursos financeiros limitados para o desenvolvimento de drogas antimetastáticas (Esposito et al., 2021).

É relevante destacar que o uso prolongado de terapias adjuvantes pode estar associado à sua toxicidade. Por exemplo, o inibidor do receptor HER2, trastuzumabe, amplamente utilizado em tratamentos de câncer de mama, foi associado à cardiotoxicidade (Telli et al., 2007). Além disso, o uso desse adjuvante durante a gravidez também foi relacionado a efeitos no desenvolvimento fetal (Azim et al., 2009).

Considerando esses aspectos e o fato de que a metástase é responsável por aproximadamente 90% das mortes por câncer (Lyon et al., 2006), surge a sugestão de que drogas com propriedades antimetastáticas podem representar uma alternativa valiosa no contexto do tratamento adjuvante.

Podemos encontrar na literatura diversos estudos que demonstram a capacidade de inibir a migração de células tumorais após o tratamento com curcumina (Hu et al., 2019; N. Wang et al., 2020; L. Zhang et al., 2019). No entanto, é relevante notar que esses estudos frequentemente empregam concentrações relativamente elevadas para alcançar resultados significativos, como nos exemplos mencionados, nos quais as concentrações utilizadas foram $\geq 10 \mu\text{M}$, em alguns casos chegando a $40 \mu\text{M}$. No presente estudo, observamos que a curcumina foi capaz de inibir aproximadamente 25% da migração das células da linhagem BT-20 em concentrações mais baixas.

Além disso, na literatura também existem estudos que investigam os efeitos anti-migratórios de moléculas sintéticas análogas à curcumina (Ali et al., 2017; H. Shen et al., 2021; Silva et al., 2018; J. Wang et al., 2019; Zhao et al., 2021). Entretanto, muitos desses estudos também requerem concentrações elevadas, da ordem de $\geq 10 \mu\text{M}$, que são equivalentes às concentrações geralmente utilizadas em ensaios com curcumina e, em alguns casos, alcançando valores extremamente altos, como $100 \mu\text{M}$.

Através dos ensaios de migração celular utilizando o análogo 2603, foi possível evidenciar seu efeito anti-migratório na linhagem BT-20. No ensaio de cicatrização, o composto inibiu aproximadamente 71% da migração das células, o que significa que as células que migraram conseguiram regenerar apenas 29% da ferida, em comparação com quase 100% no grupo controle (figura 10). Já no ensaio de migração usando câmaras Transwell, a inibição foi de aproximadamente 55% em relação ao grupo controle (figura 11).

Todos os ensaios de migração celular foram conduzidos com uma concentração de $0,75 \mu\text{M}$ tanto para a curcumina quanto para o composto 2603. Isso se deve ao fato de que concentrações mais elevadas resultavam na inviabilidade das células, enquanto concentrações mais baixas levavam a uma migração e proliferação excessivas.

Adicionalmente, é importante observar que esses ensaios frequentemente envolvem períodos de até 48 horas, e em alguns casos até mesmo períodos mais longos. No entanto, os ensaios realizados neste estudo foram limitados a um período de 24 horas devido a várias considerações. Assim como foram observados diferentes efeitos relacionados à dependência da dose, foi igualmente notada uma dependência do tempo para a realização dos ensaios. Em

concentrações de 0,75 μM , períodos superiores a 24 horas resultavam na inviabilidade das células. Isso levantou a hipótese de que o composto 2603 pode atuar de maneira dependente tanto da dose quanto do tempo.

Outra razão para o período de 24 horas foi a intenção de correlacionar os dados dos ensaios de migração com os resultados do ensaio de sequenciamento, uma vez que a extração dos transcritos foi realizada 24 horas após o tratamento.

A síntese de um composto análogo tem como objetivo aprimorar alguma característica presente em uma molécula original. Hipoteticamente, esses compostos análogos tendem a apresentar efeitos superiores em comparação com suas moléculas de origem, como demonstrado no caso do análogo 2603.

Os potenciais mecanismos pelos quais esses análogos atuam na inibição da migração celular são tópicos de grande interesse na literatura científica, pois oferecem novas perspectivas para o desenvolvimento e aperfeiçoamento dessas moléculas.

FIGURA 13 – Ensaio de Migração Celular da linhagem BT-20. **a**, As imagens retratam os ensaios de cicatrização nos tempos $T = 0\text{h}$ (acima) e $T = 24\text{h}$ (abaixo) para o análogo 2603 e a curcumina, ambos na concentração de 0,75 μM . O grupo controle foi tratado com o solvente orgânico DMSO em concentração $<0,1\%$ (barra de escala 250 μm) **b**, O gráfico exibe as porcentagens de cicatrização das feridas (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$).

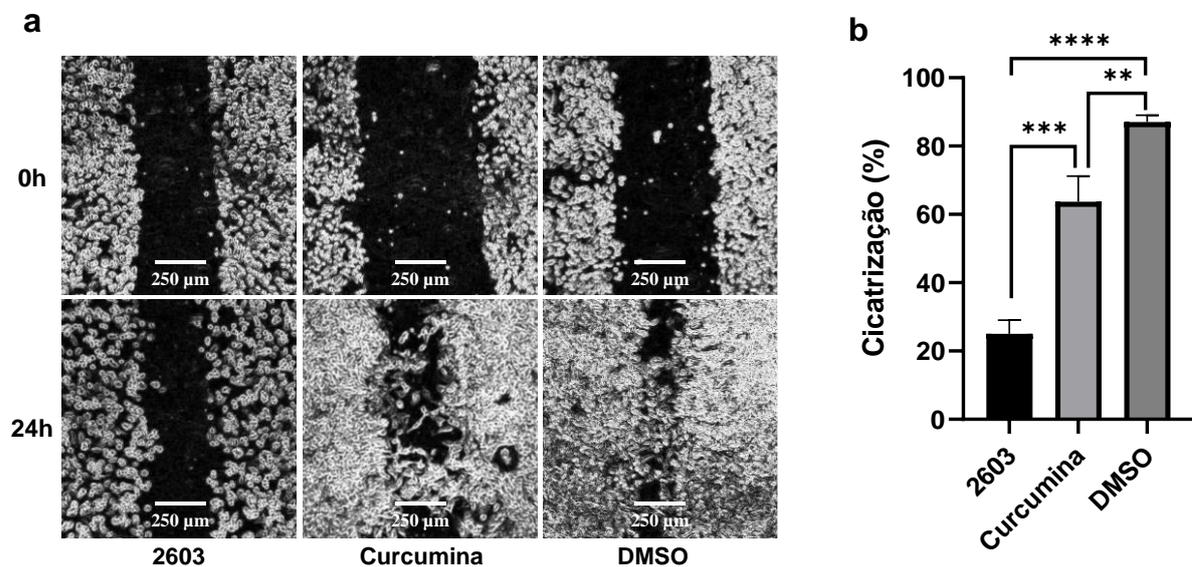
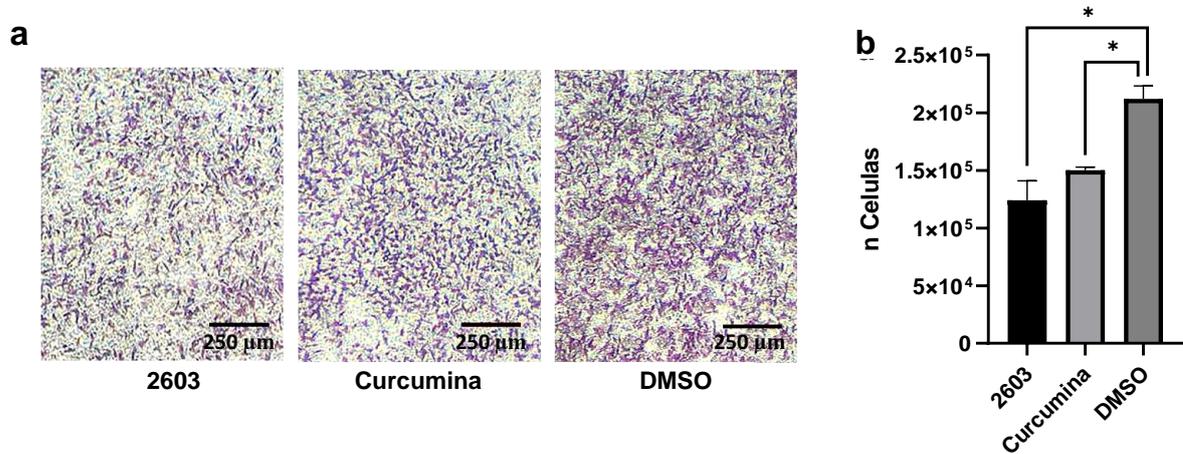


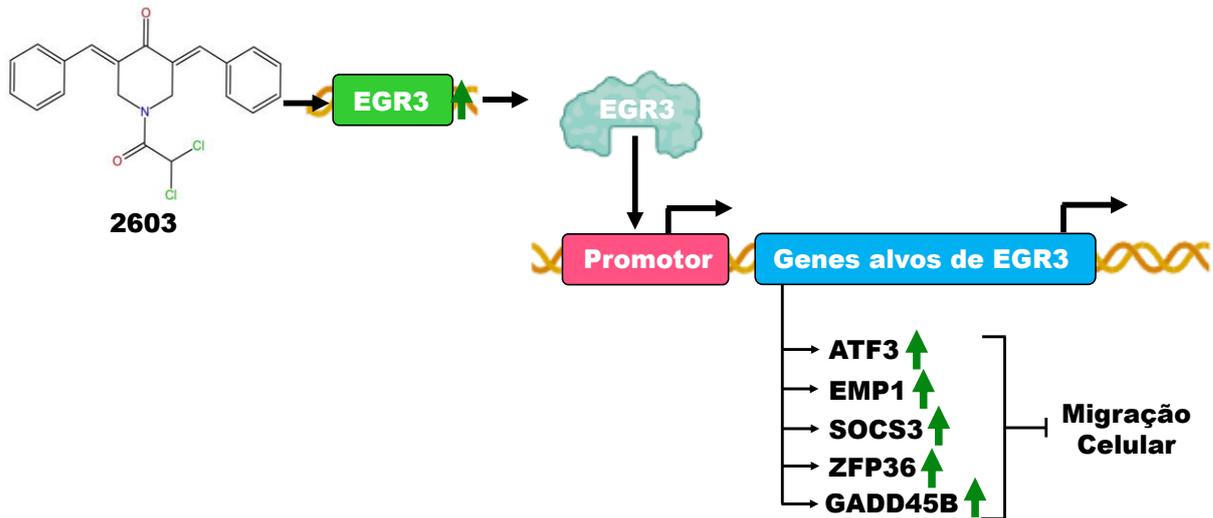
FIGURA 14 - a, As imagens retratam os ensaios de migração utilizando câmaras Transwell, capturadas no período T = 24h, após o tratamento com o análogo 2603 e a curcumina, ambos na concentração de 0,75 μ M. O grupo controle foi submetido ao solvente orgânico DMSO em concentração <0,1% (barra de escala 250 μ m). **b**, O gráfico apresenta a contagem das células que migraram através da membrana após o tratamento (* $p < 0.05$).



6.5 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ANALOGO NC2603 NA LINHAGEM BT-20: VIAS DE INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR

A metástase envolve uma complexa interação de mecanismos celulares, com a transição epitélio-mesenquimal (EMT) sendo um evento fenotípico-chave no qual as células perdem características epiteliais e adquirem propriedades mesenquimais (Noh et al., 2021). A regulação de vias celulares, fatores de transcrição e citocinas, incluindo IL-6/STAT3, SNAIL, TWIST e zinc finger E-box-binding (ZEB), desempenha um papel fundamental no processo metastático do câncer (Noh et al., 2021; M. Park et al., 2022). Um estudo recente destacou a atividade supressora do fator de transcrição EGR3 na metástase, ativando genes específicos, nomeadamente ZFP36, GADD45B e SOCS3, em uma linha celular de câncer de próstata (Shin et al., 2020). O autor sugere que o EGR3 se liga às regiões promotoras de genes como ATF3, EMP1, GADD45B, SOCS3 e ZFP36, levando à inibição da migração celular. No nosso estudo atual, observamos a modulação desses genes após o tratamento com o análogo NC2603, indicando o possível mecanismo de ação do análogo na inibição da migração celular (figura 15).

FIGURA 15 – Esquema representativo do possível mecanismo de ação do análogo NC2603 na inibição da migração celular. O análogo induziu a expressão do gene EGR3. O gene EGR3 por sua vez, tem a função de promover a expressão dos genes ATF3, EMP1, SOCS3, ZFP36 e GADD45B, que também foram observados induzidos nos ensaios de expressão gênica. Cada um desses genes possui funções na inibição da migração celular.



Os fatores de transcrição da família "Early growth response" (EGR) são conhecidos por participar em diversos processos celulares, incluindo apoptose, proliferação e crescimento celular, devido aos seus domínios de ligação ao DNA altamente conservados (Morita et al., 2016; Pio et al., 2013). O gene EGR3 foi implicado como um supressor de tumores e marcador prognóstico em certos tipos de câncer (F. Liao et al., 2013; S. Zhang et al., 2017). Notavelmente, no câncer de mama com receptor de estrogênio positivo, o EGR3 tem sido sugerido como crucial para o processo de metástase (Suzuki et al., 2007), enquanto no carcinoma nasofaríngeo e câncer de próstata, a sua expressão foi associada à inibição da migração celular (X. Z. Li et al., 2021; Shin et al., 2020).

O gene ATF3 (fator de transcrição ativador 3) apresenta baixa expressão basal, mas é induzido por estresse e respostas adaptativas, e a sua regulação positiva tem sido associada à inibição da migração celular (L. Li et al., 2020; Wu et al., 2022; Xie et al., 2014; Yuan et al., 2013).

O papel do gene EMP1 (proteína da membrana epitelial 1) é controverso, pois tem sido descrito tanto como um supressor de tumores que inibe a migração e invasão celular em certos tipos de câncer (Liu et al., 2022; G. G. Sun, Lu, et al., 2014; G. G. Sun, Wang, Lu, et al., 2014; J. Zhang et al., 2011), quanto como um promotor de tumores em outros estudos (G. G. Sun, Wang, Cui, et al., 2014; G. G. Sun, Wang, Lu, et al., 2014; J. Wang et al., 2019).

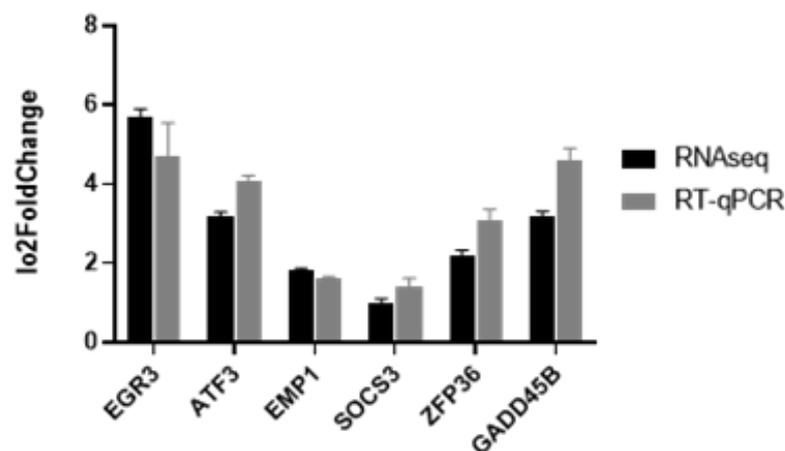
Embora o envolvimento do gene GADD45b na migração celular seja menos explorado, alguns estudos relataram descobertas interessantes. Huang et al. demonstraram que a superexpressão de GADD45b, com ou sem tratamento com Matrine, inibe a migração celular (H. Huang et al., 2018). Além disso, outro estudo indicou que a expressão de GADD45b levou ao aumento da fosforilação de p38 MAPK, induzindo mudanças na morfologia celular e inibindo a migração (Kodama & Negishi, 2011).

O supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) é conhecido por funcionar como um inibidor das vias JAK2/STAT3 e IL-6/STAT3, que, quando induzidas, promovem a EMT (M. Chen et al., 2020; L. Huang et al., 2016; Xiao et al., 2022; Yu et al., 2017; Q. X. Zhou et al., 2015).

O Tristetrapolin (TTP), codificado pelo gene ZFP36, é uma proteína de ligação ao RNA do tipo dedo de zinco que desempenha um papel crucial na degradação do mRNA, regulando assim a expressão de proteínas e genes específicos⁶⁸, tais como TWIST1 e SNAI1, que são conhecidos indutores da EMT (J. M. Park et al., 2018; Yoon et al., 2016).

Dentre os genes identificados no sequenciamento, os seis mencionados (EGR3, ATF3, EMP1, SOCS3, ZFP36 e GADD45B) foram observados como induzidos após o tratamento, sugerindo que este pode ser o mecanismo pelo qual o análogo NC2603 inibiu o processo de migração celular. Por isso, esses genes foram selecionados para validação por RT-qPCR para a linhagem BT-20 (figura 16).

FIGURA 16 - O gráfico representa os valores de log₂FoldChange obtidos a partir dos experimentos de RNAseq e validação RT-qPCR da linhagem BT-20 (correlação de Pearson, R=0.8462, valor-p < 0.05).



Mas, além desses genes, o gene HSPA6 se destaca por estar presente entre os genes com níveis mais elevados de expressão (tabela 4). Este gene demonstrou características

relacionadas à regulação da tumorigênese e progressão tumoral em diversos tipos de câncer. Enquanto em certas malignidades, o gene HSPA6 exerce efeitos inibitórios nesses processos, em outras, parece induzir a progressão do câncer (Song et al., 2022).

Apoiando essa ideia, Shen et al. realizaram um estudo esclarecedor no qual exploraram o impacto do tratamento com timoquinona em uma linha celular de câncer de mama triplo negativo. Notavelmente, sua pesquisa revelou uma substancial indução na expressão do gene HSPA6 após o tratamento com timoquinona. Além disso, essa indução do HSPA6 foi correlacionada com reduções significativas no crescimento celular, na migração e nas capacidades invasivas, como validado por meio de ensaios funcionais (S. Shen et al., 2021)

6.6 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ANALOGO NC2603 NA LINHAGEM MCF-7: INDUÇÃO DE ARRASTO DE CICLO CELULAR

Após uma análise minuciosa dos genes afetados pelo tratamento, identificamos que vários deles fazem parte de vias cruciais no contexto do ciclo celular. Isso sugere a possibilidade de intervenção no controle do ciclo.

O ciclo celular é um processo altamente regulado que ocorre para viabilizar a divisão celular. Ele compreende quatro fases distintas: G1, S, G2 e M. As fases G1 e G2 representam períodos de crescimento celular, principalmente dedicados à acumulação de biomassa (*G - Growth*). A fase S é o estágio em que ocorre a síntese do DNA, enquanto a fase M está centrada na mitose (Alberts et al., 2017).

Para que a divisão celular seja bem-sucedida, é fundamental que todas essas fases sejam concluídas com êxito. Caso ocorra algum erro ou danos no DNA durante o processo, o sistema de reparo é ativado. Nesse momento, as células enfrentam duas alternativas. O reparo bem-sucedido permite que a célula continue seu ciclo celular normalmente. No entanto, se o dano for irreparável, as células ativam mecanismos de morte celular programada.

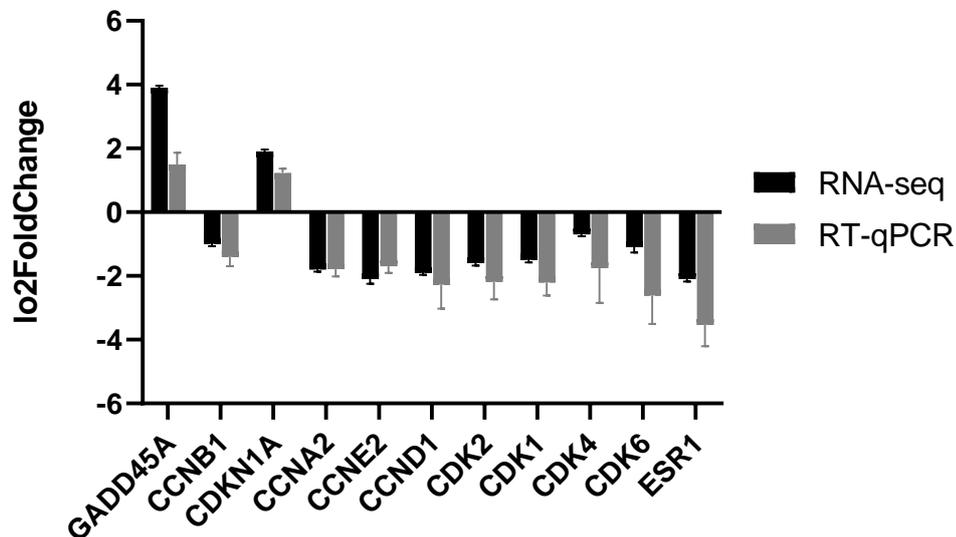
Esse processo representa o funcionamento ideal das células em um contexto saudável. No entanto, no caso do câncer, as células podem acumular erros genéticos que não são devidamente reparados, resultando em proliferação celular descontrolada. Isso enfatiza a importância de abordagens terapêuticas direcionadas para interromper esse ciclo incessante.

Atualmente, existem agentes farmacológicos comerciais com atividade antimitótica, notadamente o Paclitaxel e a Vimblastina, que exercem sua ação sobre as tubulinas. O Paclitaxel atua inibindo a despolimerização dos microtúbulos, enquanto a Vimblastina interfere na

polimerização dos microtúbulos já estabilizados, evitando sua despolimerização (X. Zhou et al., 2018). Dado o papel fundamental dos microtúbulos como componentes do citoesqueleto, sua regulação exerce um impacto significativo nos processos do ciclo celular (Chi et al., 2015).

O possível mecanismo de ação do análogo NC2603 pode estar relacionado à via de quinases dependentes de ciclinas (Cdks - cyclin-dependent kinases), cujos genes correspondentes foram modulados após o tratamento, conforme evidenciado nos resultados do ensaio de sequenciamento e confirmados por RT-qPCR (figura 17).

FIGURA 17 - O gráfico representa os valores de \log_2 FoldChange obtidos a partir dos experimentos de RNAseq e validação RT-qPCR da linhagem MCF-7 (correlação de Pearson, $R=0.9189$, valor- $p < 0.00007$).



O ciclo celular é rigorosamente regulado pela interação entre ciclinas e CDKs (quinases dependentes de ciclina). As diversas funcionalidades desse processo resultam da formação de complexos entre essas moléculas. Ciclinas específicas, como a ciclina D, estabelecem complexos com CDKs 4 e 6, enquanto as ciclinas E e A formam complexos com CDK2, e as ciclinas B se associam a CDK1 (S. Goel et al., 2018; Kim et al., 2022).

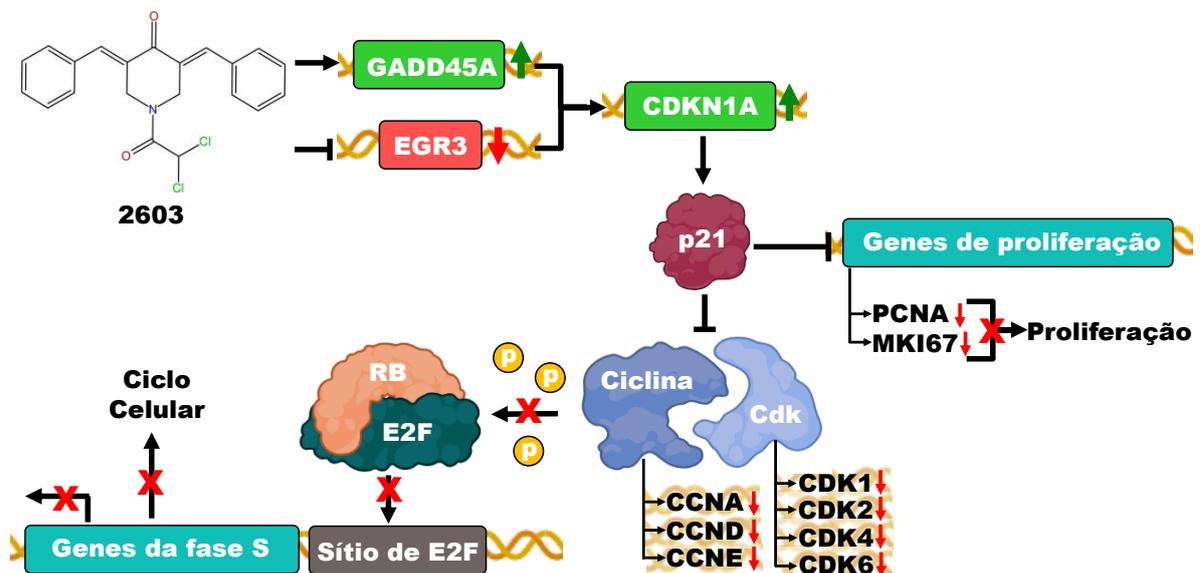
Os complexos formados têm o papel de fosforilar proteínas pertencentes à família retinoblastoma (proteínas Rb). Essas proteínas, por sua vez, interagem com a proteína E2F, desempenhando um papel crítico na regulação da expressão dos genes que controlam o ciclo celular (Al Bitar & Gali-Muhtasib, 2019). A hiper fosforilação das proteínas Rb impede sua interação com as proteínas E2F, enquanto a hipofosforilação permite essa interação. Quando ocorre a complexação Rb-E2F, ela reprime a expressão dos genes necessários para a progressão do ciclo celular (Engeland, 2022).

Além disso, uma molécula essencial nesse contexto é a proteína p21, também conhecida como Cip1 ou Waf1, que é codificada pelo gene CDKN1A. A p21 é amplamente reconhecida como uma inibidora universal de CDKs (Engeland, 2022). Uma vez que a p21 inibe as CDKs, ela desempenha um papel direto na formação do complexo Rb-E2F, sendo assim um componente crucial no controle do ciclo celular.

Com base nos resultados de expressão dos genes que codificam as proteínas mencionadas, podemos inferir que o tratamento com o análogo NC2603 está influenciando a via de controle do ciclo celular. O gene CDKN1A, responsável pela codificação da proteína p21, foi induzido pelo tratamento, enquanto os genes que codificam as ciclinas A, B, D e E, bem como os genes que codificam as CDKs 1, 2, 4 e 6, foram todos reprimidos.

Do ponto de vista das proteínas, a elevada produção da proteína p21 resulta em uma menor formação de complexos entre as ciclinas e as CDKs, uma vez que os níveis de produção destas últimas foram reduzidos, tornando-as menos disponíveis para a formação de complexos. Como resultado, a proteína Rb passa por uma hipofosforilação, o que permite sua interação com a proteína E2F, potencialmente levando à interrupção do ciclo celular (figura18).

FIGURA 18 - Esquema representativo do possível mecanismo de ação do análogo NC2603 no arrasto de ciclo celular. O análogo, ao mesmo tempo que induziu a expressão do gene GADD45A, reprimiu a expressão do gene ESR1. Ambos, quando nessas condições, induzem a expressão de CDKN1A. A proteína p21, codificada pelo gene CDKN1A, inibe a formação dos complexos ciclinas/CDKs, cujos maioria dos genes tiveram a expressão reprimida após o tratamento com o análogo. Uma vez que não há a formação de complexos ciclinas/CDKs, a proteína Rb é hipofosforilada, complexando assim com a proteína E2F. O complexo Rb/E2F quando formado, regula negativamente o ciclo celular, ou seja, causa o arrasto do ciclo celular. Por outro lado, a proteína p21 ainda inibe os genes PCNA e MKI67, que induzem a proliferação celular. Uma vez que o tratamento com o análogo reprimiu a expressão desses genes, esse também se torna um possível mecanismo de ação do análogo.



Além disso, os dados fornecem insights adicionais. É sabido que a expressão da p21 é regulada pela proteína p53 (Engeland, 2022; Kim et al., 2022; Parveen et al., 2016; Planas-Silva & Weinberg, 1997). No entanto, nossos resultados indicam que a maioria desses processos ocorreu de forma independente da p53, que teve sua expressão reduzida ($\log_2\text{FoldChange} = -1$, $P_{\text{Adj}} = 1.6e-57$). Isso sugere uma regulação alternativa da via de controle do ciclo celular induzida pelo tratamento com o análogo NC2603.

Além disso, na busca pela compreensão da indução do gene CDKN1A, foi levantada a hipótese de que esse processo pode estar relacionado à supressão do gene que codifica o receptor de estrógeno ESR1. Liao et al. (2014) demonstraram em seu estudo que o receptor de estrógeno promove a entrada de células da linhagem MCF-7 na fase S do ciclo celular, permitindo a proliferação celular por meio da indução dos genes PCNA e Ki-67 (ambos associados à proliferação celular) enquanto suprime a expressão de p53 e p21 (X. H. Liao et al., 2014). No referido estudo, a superexpressão do receptor $ER\alpha$ resultou na repressão da atividade da proteína p21, resultando na redução tanto da expressão de mRNA quanto da proteína em si. Esses achados sugeriram que o receptor $ER\alpha$ poderia influenciar a expressão de PCNA e Ki-67 por meio da regulação da expressão de p21.

De acordo com as descobertas apresentadas aqui, observou-se que o gene ESR1, que codifica o receptor $ER\alpha$, foi reprimido pelo tratamento, assim como os genes PCNA e Ki-67. Esses resultados levantam a possibilidade de que o mecanismo de ação do análogo NC2603 possa estar associado ao receptor de estrógeno. Além disso, para corroborar essa hipótese, é relevante notar que esse mecanismo não foi observado na linhagem BT-20, a qual não expressa o receptor de estrógeno.

6.7 ARRASTO DE CICLO CELULAR EM FASE G1 CAUSADO PELO ANALOGO NC2603 NA LINHAGEM MCF-7

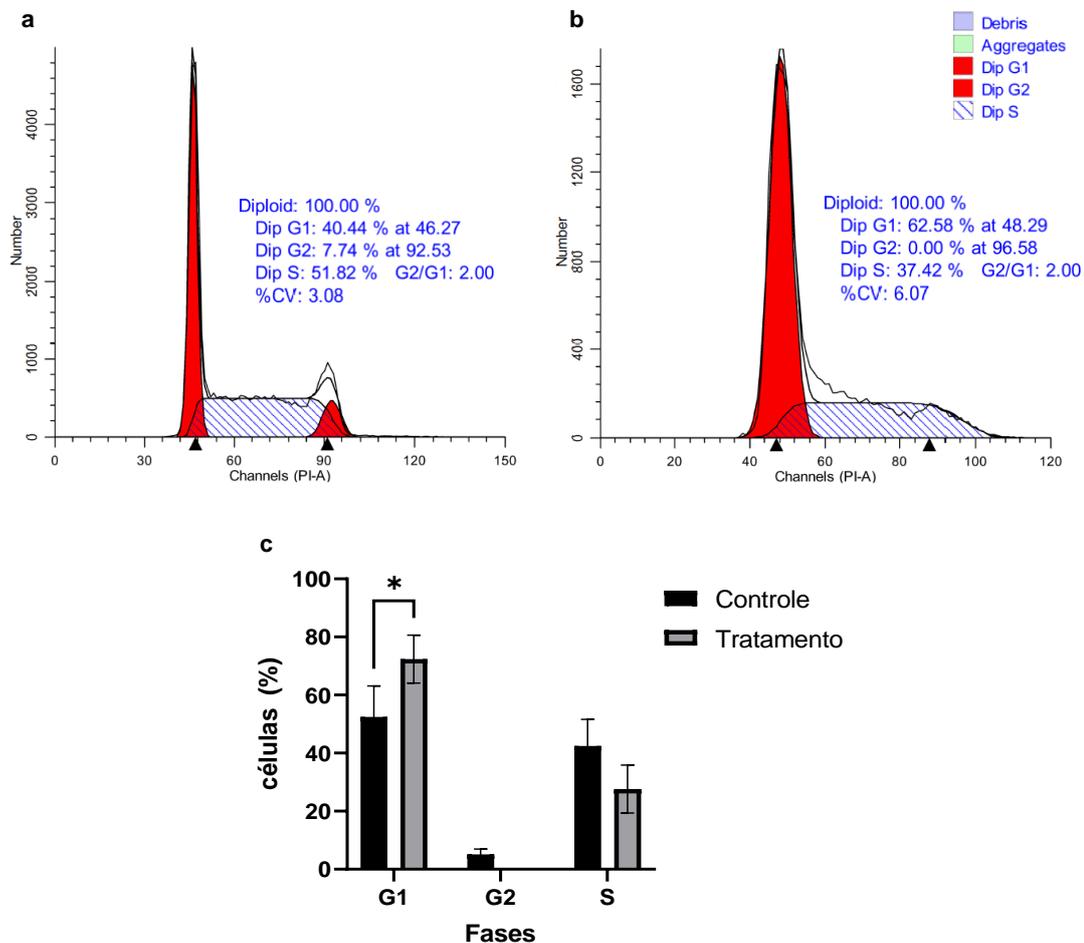
Após a identificação da modulação das vias de controle do ciclo celular por meio dos resultados de expressão genética, procedemos à realização de ensaios de citometria de fluxo para avaliar o impacto do tratamento sobre o ciclo celular.

Os resultados apresentados na Figura 19 revelam um aumento significativo no número de células na fase G1 como resultado do tratamento. Embora o número de células na fase S não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa, observou-se uma tendência de

diminuição. Além disso, houve uma redução na proporção de células na fase G2, embora, tanto no grupo controle quanto no grupo de tratamento, as porcentagens tenham permanecido baixas ou insignificantes.

Na literatura, há referências a arrasto do ciclo celular após tratamentos com curcumina e seus análogos (Kelly et al., 2023; S. H. Sun et al., 2012; Walker & Mittal, 2020; Xia et al., 2014; J. J. Yang et al., 2023; H. Zhang et al., 2015; Z. Zhang et al., 2020; H. Zhou et al., 2021). Entretanto, nenhum desses estudos apresentou mecanismos semelhantes aos descritos neste trabalho. A maioria deles demonstra a redução dos níveis de ciclinas e CDKs, porém, de maneira indireta, a partir de diferentes alvos primários. Além disso, a maioria desses estudos também relata arrasto na fase G2 do ciclo celular.

FIGURA 19 – a figura apresenta ilustrações do ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo **a**, resultado de uma amostra controle. **b**, resultado de uma amostra tratada. O pico mais à esquerda é referente a células em se encontram em G1, a parte central, que está listrada, representa células em S e o pico mais à direita (que aparece apenas em a) se refere a células em G2. **c**, representação gráfica dos resultados obtidos (*P< 0,05).



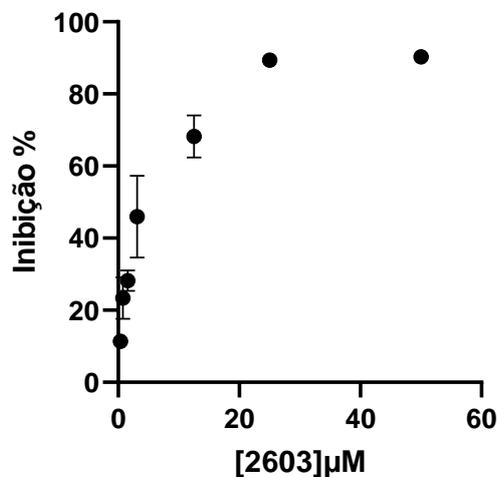
6.8 INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO: POSSIVEL MECANISMO DE AÇÃO PARA CITOTOXICIDADE DO ANALOGO NC2603

A finalidade do estágio internacional, na universidade de Saskatchewan, foi avaliar a atividade antioxidante do análogo NC2603. Antes de iniciar os ensaios de atividade antioxidante, foram conduzidos testes de viabilidade celular para avaliar a citotoxicidade do análogo em relação à linhagem celular Caco-2.

O valor de IC₅₀ obtido foi aproximadamente 4 μM, um resultado próximo aos obtidos para as linhagens de câncer de mama BT-20 e MCF-7. A equação que descreve a curva (Figura 20), gerada a partir dos dados, é a seguinte:

$$y = 17.418\ln(x) + 25.93$$

FIGURA 20 - Curva de IC₅₀ referentes ao análogo NC2603 para a linhagem Caco-2. Este gráfico ilustra os ensaios de viabilidade celular conduzidos com o objetivo de determinar os valores de IC₅₀.



Após a determinação do valor de IC₅₀, procedeu-se com os ensaios de potencial de membrana mitocondrial. Conforme discutido por Hossain et al. (2019), acredita-se que os análogos da curcumina, incluindo o análogo NC2603, possam apresentar afinidade com grupos tiol presentes na membrana mitocondrial. A interação dos análogos com esses grupos tiol pode, teoricamente, desestabilizar a membrana, levando à abertura de poros ou até mesmo à ruptura da mesma, afetando, assim, o potencial de membrana (Hossain et al., 2019).

Surpreendentemente, contrariando essa hipótese, observamos que o tratamento com o NC2603 resultou em um aumento na diferença de potencial de membrana (figuras 21 e 22), ou seja, tornou o potencial mais negativo, ao invés de aproximá-lo do valor de potencial zero.

Tanto o reagente JC-1 quanto o TMRE são corantes catiônicos, ou seja, possuem carga positiva, o que os torna propensos a interagir com cargas negativas. Dado que as membranas mitocondriais carregam uma carga negativa, esses reagentes têm afinidade por elas. A intensidade dessa ligação está diretamente relacionada ao grau de polarização, ou seja, quanto mais negativa a membrana, maior a afinidade dos reagentes por ela.

É importante observar que o reagente JC-1 tem a tendência de formar aglomerados, conhecidos como J-aggregates, à medida que se ligam à membrana mitocondrial. No entanto, quando não se ligam em grandes quantidades, permanecem na forma monomérica, denominada J-monomer. Os agregados fluorescem na cor vermelha, enquanto os monômeros fluorescem na cor verde. Essa técnica é amplamente empregada por pesquisadores, embora muitos relatem desafios e resultados inconclusivos, como observados aqui (Figura 23). Por esse motivo, optou-se pela utilização do TMRE.

FIGURA 21 – O gráfico apresenta os resultados do ensaio de potencial de membrana mitocondrial utilizando o reagente TMRE. Os níveis de luminescência são expressos por célula, refletindo os valores médios de luminescência em uma única célula (* $p < 0.02$, ** $p < 0.008$, *** $p < 0.0006$).

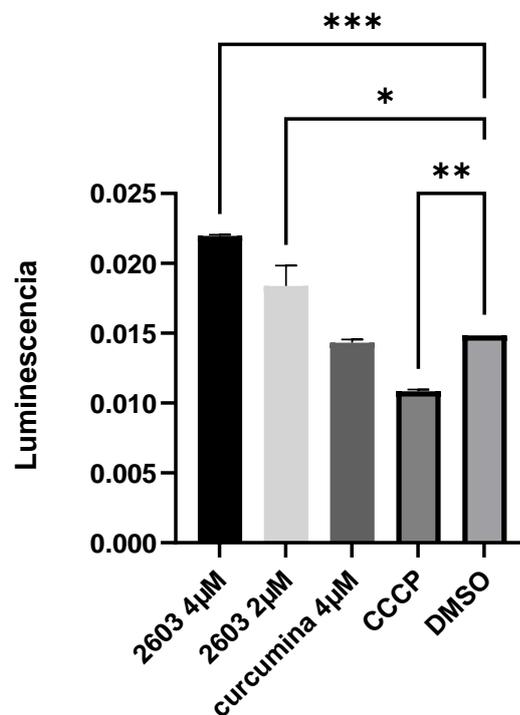


FIGURA 22 – Imagens obtidas nos ensaios utilizando o reagente TMRE. **a**, tratamento com o análogo NC2603 a 4 μM . **b**, tratamento com o análogo NC2603 a 2 μM . **c**, tratamento com curcumina a 4 μM , **d**, controle positivo, tratado com CCCP a 10 μM . **e**, controle negativo utilizando o solvente DMSO <0,01% (barra de escala 100 μm)

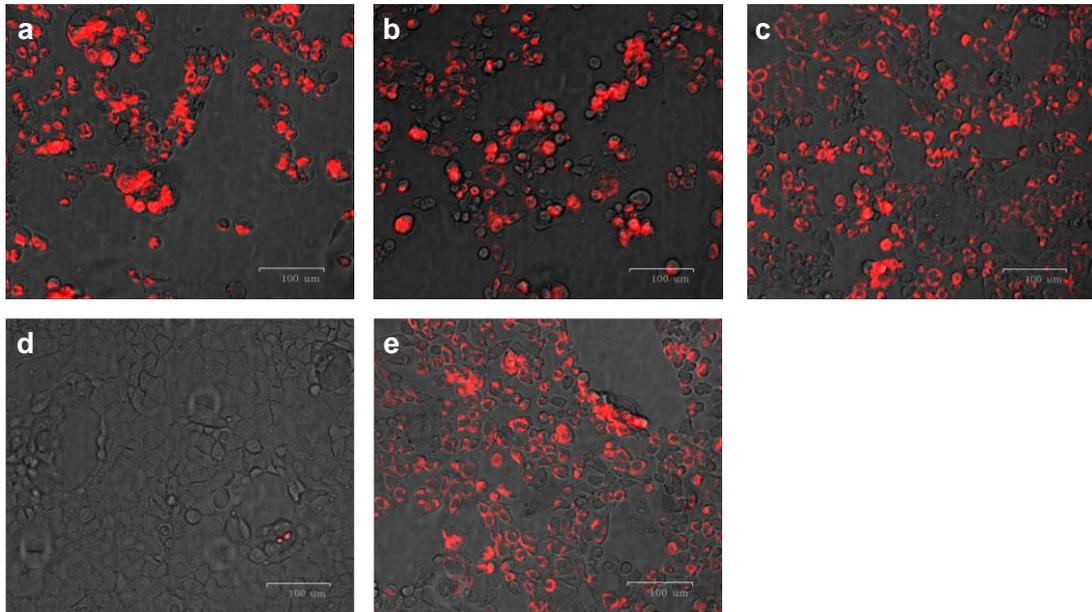
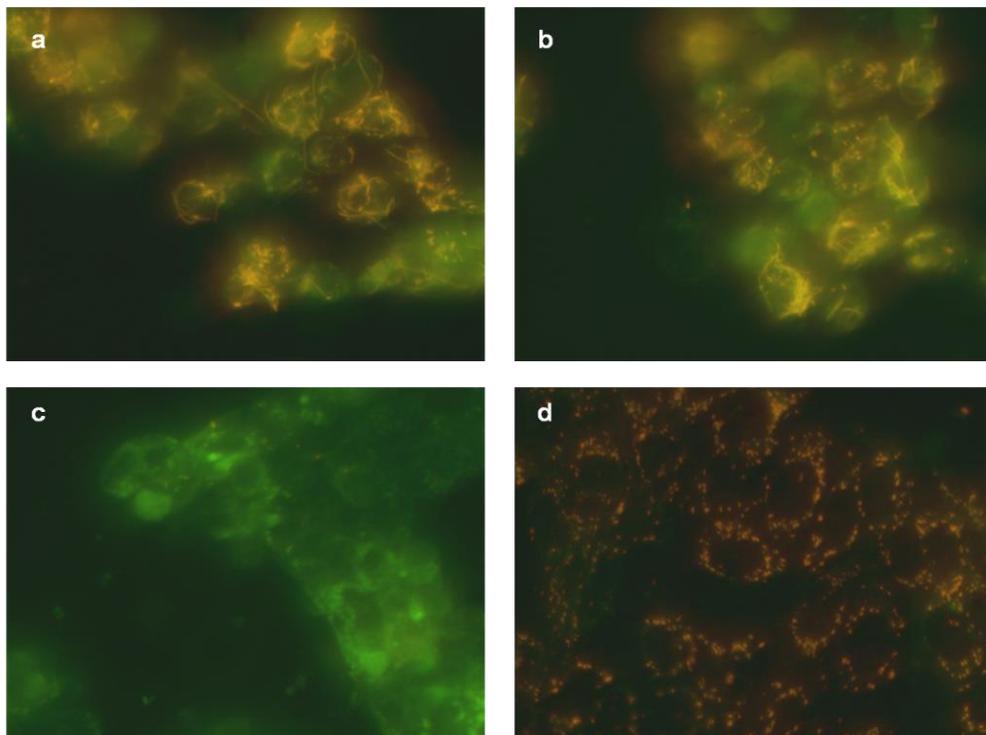


FIGURA 23 – As imagens apresentam resultados dos ensaios de potencial de membrana mitocondrial após o tratamento com **a**, análogo NC2603 4 μM , **b**, análogo NC2603 4 μM , **c**, CCCP 10 μM e **d**, , controle negativo utilizando o solvente DMSO <0,01%.



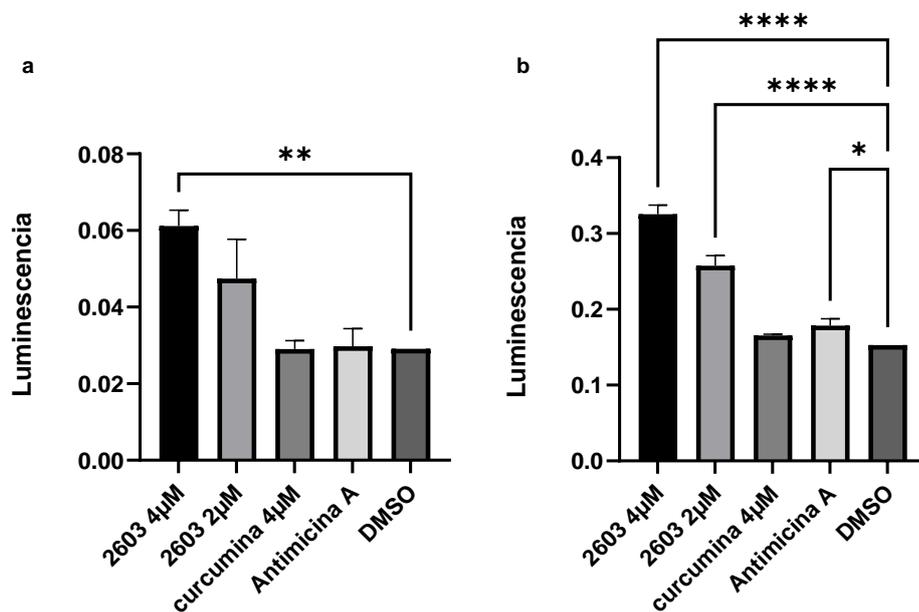
Na Figura 23, observam-se diferenças na fluorescência nos tratamentos com o análogo NC2603 em comparação aos controles com CCCP e DMSO. No controle positivo, a fluorescência assume uma coloração verde devido à sua interferência do CCCP na membrana

mitocondrial, resultando na despolarização da mesma e na conversão do reagente JC-1 para seu estado monomérico (J-monomer). No controle negativo com DMSO, a membrana permanece íntegra, permitindo a ligação do JC-1 à membrana, resultando na formação de agregados (J-aggregate) que fluorescem em vermelho.

No entanto, no tratamento com o análogo NC2603, observa-se a presença de ambas as fluorescências, tanto verde quanto vermelha. Além disso, a fluorescência vermelha exibe padrões distintos em comparação ao controle com DMSO. Supõe-se que essas observações possam ser responsáveis pelos resultados quantitativos inconclusivos obtidos neste estudo.

Esse não foi o único resultado que contrariou a hipótese inicial. Em vez do esperado efeito antioxidante, observamos um aumento nas EROs (Figuras 24, 25 e 26) em resposta ao tratamento com o análogo NC2603, indicando a indução de estresse oxidativo.

FIGURA 24 – Os gráficos representam os resultados obtidos para **a**, avaliação de EROs utilizando o reagente DCFH-DA, e **b**, avaliação de superóxido utilizando o reagente MitoSox. Os níveis de luminescência são expressos por célula, refletindo os valores médios de luminescência em uma única célula (* $p < 0.03$, ** $p < 0.009$, **** $p < 0.0001$).



Ao analisar as imagens na Figura 25, observa-se uma discrepância em relação aos resultados apresentados no gráfico da Figura 24. Visualmente, a fluorescência aparenta ser mais intensa no controle positivo (Antimicina A 50µM). É importante ressaltar, no entanto, que o gráfico representa a fluorescência de uma única célula. Em outras palavras, a fluorescência gerada por uma única célula no tratamento com o análogo NC2603 é superior àquela gerada por uma célula tratada com Antimicina A.

FIGURA 25 - Imagens obtidas nos ensaios utilizando o reagente MitoSox. **a**, tratamento com o análogo NC2603 a 4 μM . **b**, tratamento com o análogo NC2603 a 2 μM . **c**, tratamento com curcumina a 4 μM , **d**, controle positivo, tratado com Antimicina A a 50 μM . **e**, controle negativo utilizando o solvente DMSO <0,01%.

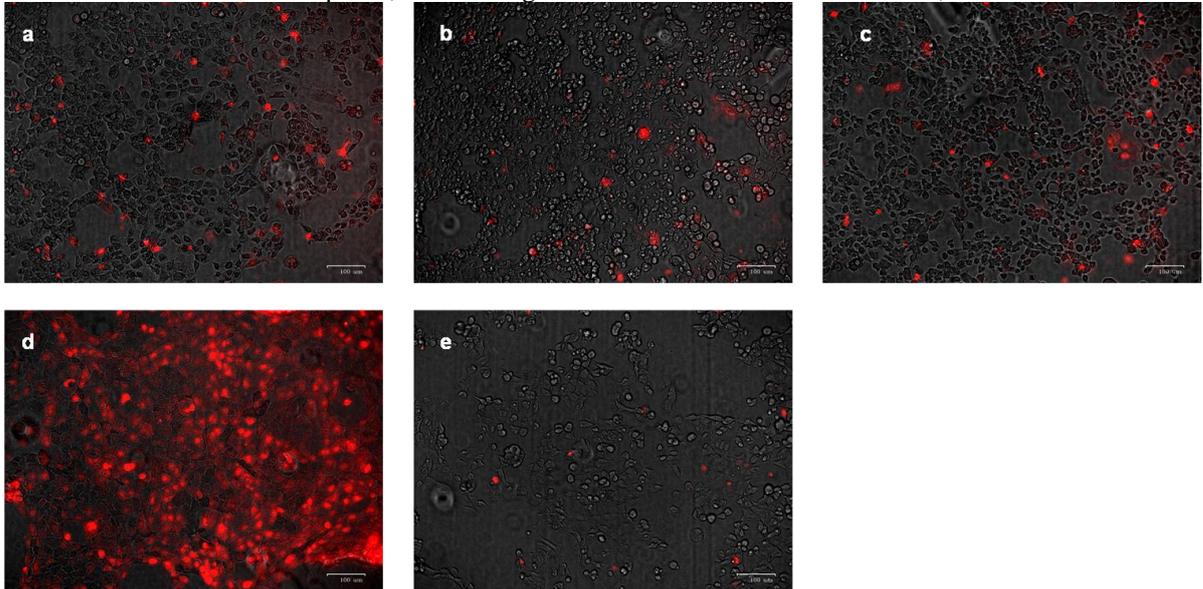
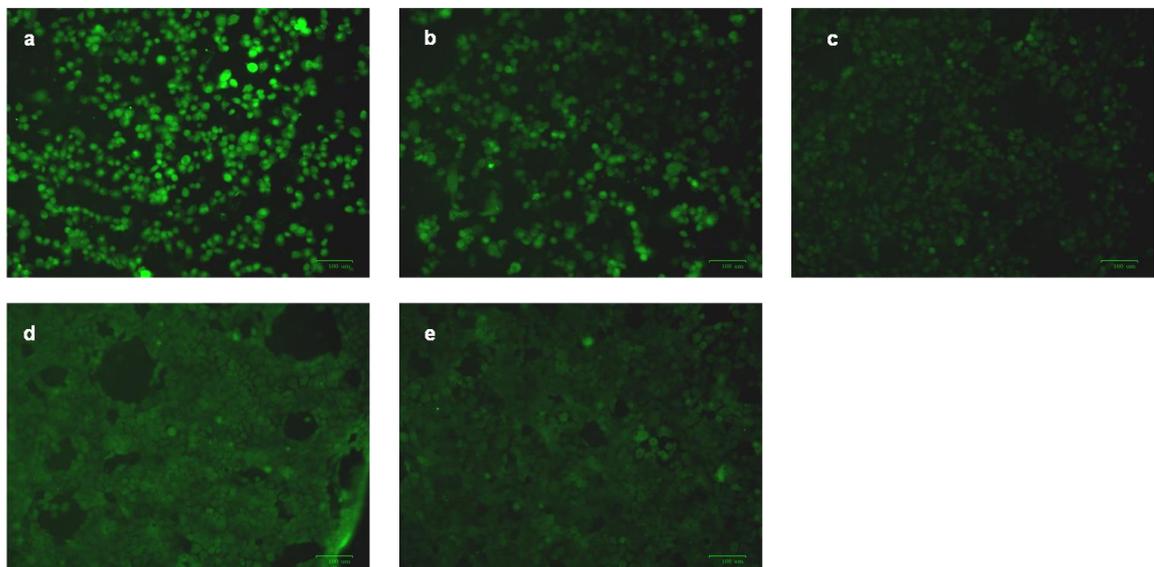


FIGURA 26 - Imagens obtidas nos ensaios utilizando o reagente DCFH-DA. **a** tratamento com o análogo NC2603 a 4 μM . **b**, tratamento com o análogo NC2603 a 2 μM . **c**, tratamento com curcumina a 4 μM , **d**, controle positivo, tratado com Antimicina A a 50 μM . **e**, controle negativo utilizando o solvente DMSO <0,01%.



O aumento das EROs pode ser uma possível explicação para o aumento da polarização da membrana mitocondrial. À medida que a quantidade de EROs aumenta dentro das mitocôndrias, a diferença de potencial entre a área interna e externa também aumenta, resultando em uma membrana mais polarizada.

7 CONCLUSÃO

Apesar das diversas propriedades da curcumina, a sua baixa biodisponibilidade e a necessidade de concentrações elevadas para se alcançarem efeitos pronunciados limitam o seu potencial terapêutico. No entanto, moléculas sintéticas e análogas à curcumina têm demonstrado resultados promissores em ensaios que avaliam sua atividade antitumoral.

Entre os análogos da curcumina testados, o análogo NC2603 mostrou-se particularmente citotóxico. Foi observado um efeito citotóxico mais marcante nas linhagens tumorais BT-20 e MCF-7 em comparação com a linhagem não tumoral HaCat, sugerindo uma maior especificidade dos efeitos nas células tumorais. Isso sugere a possibilidade de uma redução dos efeitos colaterais caso esses resultados sejam extrapolados para tratamentos em pacientes. É importante destacar que o efeito citotóxico foi mais acentuado na linhagem BT-20, que é associada a um pior prognóstico.

Através da análise do transcriptoma obtido por meio de sequenciamento, foi possível elucidar alguns dos mecanismos de ação do análogo em estudo.

Embora ainda não seja um critério definitivo para a avaliação de efeitos antitumorais, foi evidenciada atividade antimetastática nos ensaios de migração celular na linhagem BT-20. A partir do transcriptoma, propõe-se que o mecanismo de ação do análogo envolve a modulação dos genes EGR3, ATF3, EMP1, GADD45B, SOCS3 e ZFP36. Destaca-se o gene EGR3 como principal, uma vez que ele atua na regulação das regiões promotoras dos demais genes. Quando induzidos, esses genes inibem a migração celular, como foi sugerido por Shin et al. (2020).

Embora não tenham sido identificadas vias completas de morte celular moduladas após o tratamento, os ensaios de citometria de fluxo demonstraram que o análogo é capaz de induzir apoptose. Além disso, os ensaios de atividade de caspases levantaram a possibilidade de envolvimento de vias e mecanismos não canônicos, como a ativação do processo de apoptose independente das caspases 3 e 7, bem como da p53, que não foi observada como regulada no transcriptoma.

Na linhagem MCF-7, o principal resultado obtido foi a alteração do ciclo celular. Embora não tenha sido possível determinar o mecanismo exato que desencadeou esse efeito, surge a hipótese de que isso possa ter ocorrido devido à repressão do gene ESR1, que codifica o receptor de estrógeno. Independentemente da maneira como o arrasto no ciclo celular se

iniciou, é relevante destacar a indução do gene CDKN1A, que codifica a proteína p21, de extrema importância para o controle do ciclo celular e outras vias celulares.

No entanto, apesar dos resultados obtidos, não foi possível determinar por quais vias as células estavam passando em termos de morte celular, uma vez que os resultados dos ensaios de citometria de fluxo utilizando Annexina V foram inconclusivos. Além disso, não foram identificadas vias de morte celular no transcriptoma, tornando difícil estabelecer uma relação entre os processos de alteração do ciclo celular e a morte celular.

Os ensaios de atividade antioxidante apresentaram resultados opostos aos esperados, impossibilitando a avaliação e descrição dos motivos e mecanismos subjacentes que levaram ao aumento das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em resposta ao tratamento com o análogo NC2603. No entanto, é plausível inferir que este fenômeno possa estar relacionado à indução da morte celular nas células da linhagem Caco-2 após o tratamento. Embora esse mecanismo não tenha sido investigado nas linhagens de câncer de mama, é possível que também ocorra nelas.

Outros ensaios de importância significativa, como ensaios de genotoxicidade e análises de Western blot para avaliar as proteínas envolvidas nos processos descritos aqui, poderão ser realizados em estudos futuros como parte de projetos subsequentes.

Em resumo, o análogo NC2603 demonstrou resultados superiores em comparação com a curcumina, o que confirma a hipótese inicial de que a síntese do análogo potencializa a molécula. No entanto, não podemos afirmar com certeza qual é o principal mecanismo de ação do análogo NC2603. Esses resultados são valiosos para pesquisas futuras que empreguem a mesma abordagem, bem como contribuem para o enriquecimento da literatura no que se refere à síntese de moléculas com atividades antitumorais, direcionando o foco para as vias descritas neste estudo e a abordagem experimental utilizada.

REFERÊNCIAS

- Abrahams, S., Haylett, W. L., Johnson, G., Carr, J. A., & Bardien, S. (2019). Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. *Neuroscience*, *406*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2019.02.020>
- Al Bitar, S., & Gali-Muhtasib, H. (2019). The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21cip1/waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11101475>
- Alam, A., Farooq, U., Singh, R., Dubey, V. P., Kumar, S., Kumari, R., Kumar Naik, K., Tripathi, B. D., & Dhar, K. L. (2018). Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review. *Open Acc J of Toxicol*, *2*(5). <https://doi.org/10.19080/OAJT.2018.02.555600>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Wilson, J., Walter, P., & Hunt, T. (2017). Biologia molecular da célula. In *Biologia Molecular da Célula*. Artmed.
- Ali, N. M., Yeap, S. K., Abu, N., Lim, K. L., Ky, H., Pauzi, A. Z. M., Ho, W. Y., Tan, S. W., Alan-Ong, H. K., Zareen, S., Alitheen, N. B., & Akhtar, M. N. (2017). Synthetic curcumin derivative DK1 possessed G2/M arrest and induced apoptosis through accumulation of intracellular ROS in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Cell International*, *17*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12935-017-0400-3/FIGURES/7>
- Anderson, R. L., Balasas, T., Callaghan, J., Coombes, R. C., Evans, J., Hall, J. A., Kinrade, S., Jones, D., Jones, P. S., Jones, R., Marshall, J. F., Panico, M. B., Shaw, J. A., Steeg, P. S., Sullivan, M., Tong, W., Westwell, A. D., & Ritchie, J. W. A. (2019). A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *16*(3), 185. <https://doi.org/10.1038/S41571-018-0134-8>
- Anderson, W. F., Jatoui, I., Tse, J., & Rosenberg, P. S. (2010). Male Breast Cancer: A Population-Based Comparison With Female Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(2), 232. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.8162>
- Annesley, S. J., & Fisher, P. R. (2019). Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS8070680>
- Azim, H. A., Peccatori, F. A., Liptrott, S. J., Catania, C., & Goldhirsch, A. (2009). Breast cancer and pregnancy: how safe is trastuzumab? *Nature Reviews Clinical Oncology* *2009* *6*:6, *6*(6), 367–370. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.48>
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, *24*(2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. In *International Immunopharmacology* (Vol. 84, p. 106535). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- BD. (2015). *DNA Reagent Kit*. www.bdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.nz.340242.pdf

- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bouchez, C., & Devin, A. (2019). Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS8040287>
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(1), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2>
- Cabello-Verrugio, C., Simon, F., Trollet, C., & Santibañez, J. F. (2017). Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4310469>
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(7), 395. <https://doi.org/10.1038/S41571-020-0341-Y>
- Catsburg, C., Miller, A. B., & Rohan, T. E. (2015). Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2204–2209. <https://doi.org/10.1002/ijc.29266>
- Chabner, B. A., & Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S. (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. In *Cardiology* (Vol. 115, Issue 2, pp. 155–162). <https://doi.org/10.1159/000265166>
- Chemotherapy for Breast Cancer | American Cancer Society*. (n.d.). Retrieved January 27, 2020, from http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html#written_by
- Chen, M., Zeng, J., Chen, S., Li, J., Wu, H., Dong, X., Lei, Y., Zhi, X., & Yao, L. (2020). SPTBN1 suppresses the progression of epithelial ovarian cancer via SOCS3-mediated blockade of the JAK/STAT3 signaling pathway. *Aging (Albany NY)*, 12(11), 10896. <https://doi.org/10.18632/AGING.103303>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271. <https://doi.org/10.1007/S12264-013-1423-Y>
- Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2022). The role of ROS in tumour development and progression. *Nature Reviews Cancer* 22:5, 22(5), 280–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
- Chi, S., Xie, W., Zhang, J., & Xu, S. (2015). Theoretical insight into the structural mechanism for the binding of vinblastine with tubulin. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.999256>, 33(10), 2234–2254. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.999256>
- Church, D. M., Schneider, V. A., Graves, T., Auger, K., Cunningham, F., Bouk, N., Chen, H. C., Agarwala, R., McLaren, W. M., Ritchie, G. R. S., Albracht, D., Kremitzki, M., Rock, S., Kotkiewicz, H., Kremitzki, C., Wollam, A., Trani, L., Fulton, L., Fulton, R., ... Hubbard, T. (2011). Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biology*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001091>
- Corning Incorporated. (2009). *Trypsinization Procedure for Corning® Transwell® Inserts*. <https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS-AN-033%20Rev1%20DL.pdf>

- Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Lerverve, X., & Mayol, J. F. (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*, 79A(6), 405–425. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.21061>
- Creed, S., & McKenzie, M. (2019). Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). *Methods in Molecular Biology*, 1928, 69–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9027-6_5/FIGURES/1
- Dall, G. V., & Britt, K. L. (2017). Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Frontiers in Oncology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00110>
- DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (2018). *Cancer Principles & Practice of Oncology* (11th ed.). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Travis, R. C., Alberg, A. J., Barricarte, A., Berrino, F., Krogh, V., Sieri, S., Brinton, L. A., Dorgan, J. F., Dossus, L., Dowsett, M., Eliassen, A. H., Fortner, R. T., Hankinson, S. E., Helzlsouer, K. J., Hoffmann-Bolton, J., ... Vineis, P. (2013). Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *The Lancet Oncology*, 14(10), 1009–1019. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70301-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70301-2)
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation*, 29(5), 946. <https://doi.org/10.1038/S41418-022-00988-Z>
- Eray, M., Mättö, M., Kaartinen, M., Andersson, L. C., & Pelkonen, J. (2001). *Flow Cytometric Analysis of Apoptotic Subpopulations With a Combination of Annexin V-FITC, Propidium Iodide, and SYTO 17*. <https://doi.org/10.1002/1097-0320>
- Esposito, M., Ganesan, S., & Kang, Y. (2021). Emerging strategies for treating metastasis. *Nature Cancer* 2021 2:3, 2(3), 258–270. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00181-0>
- Fentiman, I. S., Fourquet, A., & Hortobagyi, G. N. (2006). Male breast cancer. *The Lancet*, 367(9510), 595–604. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68226-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68226-3)
- Fett-Conte, A. C., & Salles, A. B. C. F. (2002). A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 24(2), 85–89. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842002000200004>
- Figueira, T. R., Barros, M. H., Camargo, A. A., Castilho, R. F., Ferreira, J. C. B., Kowaltowski, A. J., Sluse, F. E., Souza-Pinto, N. C., & Vercesi, A. E. (2013). Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2029–2074. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.4729>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312827/S1>
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, 75(4), 787–809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>
- Goel, S., DeCristo, M. J., McAllister, S. S., & Zhao, J. J. (2018). CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest. *Trends in Cell Biology*, 28(11), 911. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2018.07.002>
- Gomes Do Nascimento, R., & Otoni, K. M. (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*, 30, 20200024. <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>

- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2013 12:12, 12(12), 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Haque, A., Rahman, Md. A., Faizi, Md. S. H., & Khan, M. S. (2018). Next Generation Antineoplastic Agents: A Review on Structurally Modified Vinblastine (VBL) Analogues. *Current Medicinal Chemistry*, 25(14), 1650–1662. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170502123639>
- Harris, L. N., Broadwater, G., Lin, N. U., Miron, A., Schnitt, S. J., Cowan, D., Lara, J., Bleiweiss, I., Berry, D., Ellis, M., Hayes, D. F., Winer, E. P., & Dressler, L. (2006). Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342. *Breast Cancer Research*, 8(6), R66. <https://doi.org/10.1186/bcr1622>
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- Horn, J., & Vatten, L. (2017). Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. *International Journal of Women's Health*, Volume 9, 265–272. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S129017>
- Hossain, M., Das, U., & Dimmock, J. R. (2019). Recent advances in α,β -unsaturated carbonyl compounds as mitochondrial toxins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.111687>
- Howard-Anderson, J., Ganz, P. a., Bower, J. E., & Stanton, A. L. (2012). Quality of life, fertility concerns, and behavioral health outcomes in younger breast cancer survivors: A systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(5), 386–405. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr541>
- Hu, C., Li, M., Guo, T., Wang, S., Huang, W., Yang, K., Liao, Z., Wang, J., Zhang, F., & Wang, H. (2019). Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine*, 58, 152740. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.11.001>
- Huang, C.-Y., Ju, D.-T., Chang, C.-F., Muralidhar Reddy, P., & Velmurugan, B. K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *BioMedicine*, 7(4), 23. <https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070423>
- Huang, H., Wang, Q., Du, T., Lin, C., Lai, Y., Zhu, D., Wu, W., Ma, X., Bai, S., Li, Z., Liu, L., & Li, Q. (2018). Matrine inhibits the progression of prostate cancer by promoting expression of GADD45B. *The Prostate*, 78(5), 327–335. <https://doi.org/10.1002/PROS.23469>
- Huang, L., Hu, B., Ni, J., Wu, J., Jiang, W., Chen, C., Yang, L., Zeng, Y., Wan, R., Hu, G., & Wang, X. (2016). Transcriptional repression of SOCS3 mediated by IL-6/STAT3 signaling via DNMT1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-016-0301-7>
- INCA. (2016). INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. In *Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva*. <https://doi.org/978-85-7318-283-5>
- INCA. (2021). *Hereditariedade | INCA - Instituto Nacional de Câncer*. <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/prevencao-e-fatores-de-risco/hereditariedade>
- Jaganjac, M., Milkovic, L., Zarkovic, N., & Zarkovic, K. (2022). Oxidative stress and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 181, 154–165. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2022.02.004>

- Jänicke, R. U. (2009). MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(1), 219–221. <https://doi.org/10.1007/S10549-008-0217-9/METRICS>
- Justus, C. R., Marie, M. A., Sanderlin, E. J., & Yang, L. V. (2023). Transwell In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2644, 349. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5_22
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11). <https://doi.org/10.1007/S11883-017-0678-6>
- Kelly, B., Thamm, D., & Rosengren, R. J. (2023). The second-generation curcumin analogue RL71 elicits G2/M cell cycle arrest and apoptosis in canine osteosarcoma cells. *Veterinary and Comparative Oncology*. <https://doi.org/10.1111/VCO.12922>
- Kim, S., Leong, A., Kim, M., & Yang, H. W. (2022). CDK4/6 initiates Rb inactivation and CDK2 activity coordinates cell-cycle commitment and G1/S transition. *Scientific Reports 2022 12:1*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20769-5>
- Kimball, J. S., Johnson, J. P., & Carlson, D. A. (2021). Oxidative Stress and Osteoporosis. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 103(15), 1451–1461. <https://doi.org/10.2106/JBJS.20.00989>
- Klaunig, J. E. (2019). Oxidative Stress and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(40), 4771–4778. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>
- Knight, J. A., Fan, J., Malone, K. E., John, E. M., Lynch, C. F., Langballe, R., Bernstein, L., Shore, R. E., Brooks, J. D., Reiner, A. S., Woods, M., Liang, X., Bernstein, J. L., & WECARE Study Collaborative Group. (2017). Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *International Journal of Cancer*, 141(5), 916–924. <https://doi.org/10.1002/ijc.30791>
- Ko, C. C., Yeh, L. R., Kuo, Y. T., & Chen, J. H. (2021). Imaging biomarkers for evaluating tumor response: RECIST and beyond. *Biomarker Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S40364-021-00306-8>
- Kodama, S., & Negishi, M. (2011). Pregnane X Receptor PXR Activates the GADD45 β Gene, Eliciting the p38 MAPK Signal and Cell Migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3570. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.179812>
- Komoto, T. T., Nishimura, F. G., Evangelista, A. F., de Freitas, A. J. A., da Silva, G., Silva, W. A., Peronni, K., Marques, M. M. C., Marins, M., & Fachin, A. L. (2023). Exploring the Therapeutic Potential of trans-Chalcone: Modulation of MicroRNAs Linked to Breast Cancer Progression in MCF-7 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10785. <https://doi.org/10.3390/IJMS241310785/S1>
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., & Van Oers, M. H. J. (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415–1420. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V84.5.1415.1415>
- Krueger, F., James, F., Ewels, P., Afyounian, E., & Schuster-Boeckler, B. (2021). *FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 - DOI via Zenodo*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5127899>
- Lai, T. Y., Cao, J., Ou-Yang, P., Tsai, C. Y., Lin, C. W., Chen, C. C., Tsai, M. K., & Lee, C. Y. (2022). Different methods of detaching adherent cells and their effects on the cell surface expression of Fas receptor and Fas ligand. *Scientific Reports 2022 12:1*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09605-y>

- Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports*, 38(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20171492/87865>
- Li, L., Sun, R. M., & Jiang, G. Q. (2020). ATF3 Demethylation Promotes the Transcription of ARL4C, Which Acts as a Tumor Suppressor in Human Breast Cancer. *OncoTargets and Therapy*, 13, 3467. <https://doi.org/10.2147/OTT.S243632>
- Li, X. Z., Tu, Y. J., Zhou, T., Zhang, J. B., Xiao, R. W., Yang, D. W., Zhang, P. F., You, P. T., & Zheng, X. H. (2021). MicroRNA-483-5p Predicts Poor Prognosis and Promotes Cancer Metastasis by Targeting EGR3 in Nasopharyngeal Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.720835/FULL>
- Liao, F., Ji, M. Y., Shen, L., Qiu, S., Guo, X. F., & Dong, W. G. (2013). Decreased EGR3 expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. *Journal of Molecular Histology*, 44(4), 463–468. <https://doi.org/10.1007/S10735-013-9493-8/TABLES/4>
- Liao, X. H., Lu, D. L., Wang, N., Liu, L. Y., Wang, Y., Li, Y. Q., Yan, T. B., Sun, X. G., Hu, P., & Zhang, T. C. (2014). Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *The FEBS Journal*, 281(3), 927–942. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12658>
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Systems*, 1(6), 417–425. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2015.12.004>
- Lin, L., Shi, Q., Nyarko, A. K., Bastow, K. F., Wu, C. C., Su, C. Y., Shih, C. C. Y., & Lee, K. H. (2006). Antitumor agents. 250. Design and synthesis of new curcumin analogues as potential anti-prostate cancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(13), 3963–3972. <https://doi.org/10.1021/jm051043z>
- Liu, S., Shi, J., Wang, L., Huang, Y., Zhao, B., Ding, H., Liu, Y., Wang, W., Chen, Z., & Yang, J. (2022). Loss of EMP1 promotes the metastasis of human bladder cancer cells by promoting migration and conferring resistance to ferroptosis through activation of PPAR gamma signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 189, 42–57. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2022.06.247>
- Lyon, B., Lyon, F., Mehlen, P., & Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:6, 6(6), 449–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1886>
- Mailloux, R. J. (2020). An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060472>
- Makarem, N., Chandran, U., Bandera, E. V., & Parekh, N. (2013). Dietary fat in breast cancer survival. *Annual Review of Nutrition*, 33, 319–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-112912-095300>
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., ... Flicek, P. (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D933–D941. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC958>
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2020). Scratch wound healing assay. *Methods in Molecular Biology*, 2109, 225–229. https://doi.org/10.1007/7651_2019_259/COVER
- Marupudi, N. I., Han, J. E., Li, K. W., Renard, V. M., Tyler, B. M., & Brem, H. (2007). Paclitaxel: A review of adverse toxicities and novel delivery strategies. In *Expert Opinion on Drug Safety* (Vol. 6, Issue 5, pp. 609–621). <https://doi.org/10.1517/14740338.6.5.609>

- Masuda, T., Jitoe, A., Isobe, J., Nakatani, N., & Yonemori, S. (1993). Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*. *Phytochemistry*, 32(6), 1557–1560. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85179-U](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85179-U)
- McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 2018, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/CPIM.40>
- Mi, H., Ebert, D., Muruganujan, A., Mills, C., Albu, L. P., Mushayamaha, T., & Thomas, P. D. (2021). PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D394–D403. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1106>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Morita, K., Okamura, T., Sumitomo, S., Iwasaki, Y., Fujio, K., & Yamamoto, K. (2016). Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. *Rheumatology*, 55(suppl_2), ii76–ii81. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEW342>
- Mortezaee, K., Salehi, E., Mirtavoos-mahyari, H., Motevaseli, E., Najafi, M., Farhood, B., Rosengren, R. J., & Sahebkar, A. (2019). Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 12537–12550. <https://doi.org/10.1002/JCP.28122>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Naeini, M. B., Bianconi, V., Pirro, M., & Sahebkar, A. (2020). The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2020 25:1, 25(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S11658-020-00214-Z>
- NIH. (2017). *The Genetics of Cancer - National Cancer Institute*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>
- Noh, D.-Y., Han, W., & Toi, M. (Eds.). (2021). *Translational Research in Breast Cancer*. 1187. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6>
- Nowak-Terpiłowska, A., Śledziński, P., & Zeyland, J. (2021). Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(2), 1–7. <https://doi.org/10.1590/1414-431X202010197>
- Oiseth, S. J., & Aziz, M. S. (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 3(10), 250. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.41>
- Oncoguia. (2015). *Risco Genético e Câncer - Instituto Oncoguia*. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/risco-genetico-e-cancer/99/6/>

- Oncoguia. (2018). *Entendendo o funcionamento dos Medicamentos Quimioterápicos - Instituto Oncoguia*. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/entendendo-o-funcionamento-dos-medicamentos-quimioterapicos/3703/593/>
- Park, J. M., Lee, T. H., & Kang, T. H. (2018). Roles of Tristetraprolin in Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS19113384>
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS23126806>
- Parveen, A., Akash, M. S. H., Rehman, K., & Kyunn, W. W. (2016). Dual Role of p21 in the Progression of Cancer and Its Treatment. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, *26*(1), 49–62. <https://doi.org/10.1615/CRITREVEUKARYOTGENEEXPR.V26.I1.60>
- Patel, S. S., Acharya, A., Ray, R. S., Agrawal, R., Raghuwanshi, R., & Jain, P. (2019). Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1552244>, *60*(6), 887–939. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1552244>
- Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics* (3rd ed.). Oxford University Press.
- Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., & Gelbard, H. A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, *50*(2), 98. <https://doi.org/10.2144/000113610>
- Pio, R., Jia, Z., Baron, V. T., Mercola, D., & UCI NCI SPECS consortium of the Strategic Partners for the Evaluation of Cancer Signatures, P. C. (2013). Early Growth Response 3 (Egr3) Is Highly Over-Expressed in Non-Relapsing Prostate Cancer but Not in Relapsing Prostate Cancer. *PLoS ONE*, *8*(1), 54096. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0054096>
- Planas-Silva, M. D., & Weinberg, R. A. (1997). Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(7), 4059–4069. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.7.4059>
- Poon, I. K. H., Hulett, M. D., & Parish, C. R. (2009). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death & Differentiation* *2010* *17*:3, *17*(3), 381–397. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.195>
- QIAGEN. (2019). *RNeasy Mini Handbook - (EN) - QIAGEN*. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- Qin, S., Huang, L., Gong, J., Shen, S., Huang, J., Ren, H., & Hu, H. (2017). Efficacy and safety of turmeric and curcumin in lowering blood lipid levels in patients with cardiovascular risk factors: A meta-analysis of randomized controlled trials. In *Nutrition Journal* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0293-y>
- Rahim, N. F. C., Hussin, Y., Aziz, M. N. M., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Masarudin, M. J., Abdullah, R., Akhtar, M. N., & Alitheen, N. B. (2021). Cytotoxicity and Apoptosis Effects of Curcumin Analogue (2E,6E)-2,6-Bis(2,3-Dimethoxybenzylidene) Cyclohexanone (DMCH) on Human Colon Cancer Cells HT29 and SW620 In Vitro. *Molecules*, *26*(5), 1261. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26051261>
- Robinson, T. P., Ehlers, T., Hubbard IV, R. B., Bai, X., Arbiser, J. L., Goldsmith, D. J., & Bowen, J. P. (2003). Design, synthesis, and biological evaluation of angiogenesis inhibitors: Aromatic enone and

dienone analogues of curcumin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(1), 115–117. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00832-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00832-6)

Roser, M., & Ritchie, H. (2015). *Cancer - Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/cancer>

Sahebkar, A., Cicero, A. F. G., Simental-Mendía, L. E., Aggarwal, B. B., & Gupta, S. C. (2016). Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- α levels: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In *Pharmacological Research* (Vol. 107, pp. 234–242). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.026>

Saltiel, E., & McGuire, W. (1983). Doxorubicin (adriamycin) cardiomyopathy. *The Western Journal of Medicine*, 139(3), 332–341. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1021516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Saúde, M. DA. (2019). *MANUAL DE BASES TÉCNICAS DA ONCOLOGIA-SISTEMA DE INFORMAÇÕES AMBULATORIAIS Página 2*.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Schneider, V. A., Graves-Lindsay, T., Howe, K., Bouk, N., Chen, H.-C., Kitts, P. A., Murphy, T. D., Pruitt, K. D., Thibaud-Nissen, F., Albracht, D., Fulton, R. S., Kremitzki, M., Magrini, V., Markovic, C., McGrath, S., Steinberg, K. M., Auger, K., Chow, W., Collins, J., ... Church, D. M. (2016). Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *BioRxiv*, 072116. <https://doi.org/10.1101/072116>

Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134. <https://doi.org/10.1002/PST.426>

Shen, H., Shen, J., Pan, H., Xu, L., Sheng, H., Liu, B., & Yao, M. (2021). Curcumin analog B14 has high bioavailability and enhances the effect of anti-breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Science*, 112(2), 815. <https://doi.org/10.1111/CAS.14770>

Shen, S., Wei, C., & Fu, J. (2021). RNA-Sequencing Reveals Heat Shock 70-kDa Protein 6 (HSPA6) as a Novel Thymoquinone-Upregulated Gene That Inhibits Growth, Migration, and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 11, 1. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.667995/FULL>

Shin, S. H., Kim, I., Lee, J. E., Lee, M., & Park, J. W. (2020). Loss of EGR3 is an independent risk factor for metastatic progression in prostate cancer. *Oncogene* 2020 39:36, 39(36), 5839–5854. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01418-5>

SIGMA-ALDRICH. (n.d.). *SYBR® Green I Dye Quantitative PCR Protocol*. Retrieved September 11, 2023, from <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/protocol/genomics/qpcr/sybr-green-i-dye-quantitative-pcr>

Silva, G., Lima, F. T., Seba, V., Mendes Lourenço, A. L., Lucas, T. G., De Andrade, B. V., Torrezan, G. S., Polaquini, C. R., Garcia, M. E., Couto, L. B., Bestetti, R. B., De Castro França, S., Fachin, A. L., Regasini, L. O., & Marins, M. (2018). Curcumin Analog CH-5 Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion of the Human Gastric Cancer Cell Line HGC-27. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020279>

Solaini, G., Sgarbi, G., Lenaz, G., & Baracca, A. (2007). Evaluating Mitochondrial Membrane Potential in Cells. *Bioscience Reports*, 27(1–3), 11–21. <https://doi.org/10.1007/S10540-007-9033-4>

- Soliman, N. A., & Yussif, S. M. (2016). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biology & Medicine*, *13*(4), 496. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2016.0066>
- Song, B., Shen, S., Fu, S., & Fu, J. (2022). HSPA6 and its role in cancers and other diseases. *Molecular Biology Reports* *2022* *49*:11, *49*(11), 10565–10577. <https://doi.org/10.1007/S11033-022-07641-5>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506580102>
- Sueth-Santiago, V., Mendes-Silva, G. P., Decoté-Ricardo, D., & De Lima, M. E. F. (2015). Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. In *Química Nova* (Vol. 38, Issue 4, pp. 538–552). Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>
- Sun, G. G., Lu, Y. F., Fu, Z. Z., Cheng, Y. J., & Hu, W. N. (2014). EMP1 inhibits nasopharyngeal cancer cell growth and metastasis through induction apoptosis and angiogenesis. *Tumor Biology*, *35*(4), 3185–3193. <https://doi.org/10.1007/S13277-013-1416-5/FIGURES/8>
- Sun, G. G., Wang, Y. Di, Cui, D. W., Cheng, Y. J., & Hu, W. N. (2014). Epithelial membrane protein 1 negatively regulates cell growth and metastasis in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(14), 4001. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I14.4001>
- Sun, G. G., Wang, Y. D., Lu, Y. F., & Hu, W. N. (2014). EMP1, a member of a new family of antiproliferative genes in breast carcinoma. *Tumor Biology*, *35*(4), 3347–3354. <https://doi.org/10.1007/S13277-013-1441-4/FIGURES/8>
- Sun, S. H., Huang, H. C., Huang, C., & Lin, J. K. (2012). Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. *European Journal of Pharmacology*, *690*(1–3), 22–30. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.05.036>
- Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., & Zhu, H.-P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Suzuki, T., Inoue, A., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J. I., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. I., & Sasano, H. (2007). Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, *14*(2), 279–292. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0005>
- Tait, J. F., & Smith, C. (1991). Site-specific mutagenesis of annexin V: Role of residues from Arg-200 to Lys-207 in phospholipid binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *288*(1), 141–144. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90175-I](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90175-I)
- Telli, M. L., Hunt, S. A., Carlson, R. W., & Guardino, A. E. (2007). Trastuzumab-related cardiotoxicity: Calling into question the concept of reversibility. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(23), 3525–3533. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.0106>
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit USER GUIDE*. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf

- Thike, A. A., Cheek, P. Y., Jara-Lazaro, A. R., Tan, B., Tan, P., & Tan, P. H. (2010). Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Modern Pathology*, *23*(1), 123–133. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.145>
- Tian, T. (2023). MCF-7 cells lack the expression of Caspase-3. *International Journal of Biological Macromolecules*, *231*, 123310. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123310>
- Trichopoulos, D., Li, F. P., & Hunter, D. J. (1996). What causes cancer? *Scientific American*, *275*(3), 80–87. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0996-80>
- Walker, B. C., & Mittal, S. (2020). Antitumor Activity of Curcumin in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 1–11. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249435>
- Wang, J., Li, X., Wu, H., Wang, H., Yao, L., Deng, Z., & Zhou, Y. (2019). EMP1 regulates cell proliferation, migration, and stemness in gliomas through PI3K-AKT signaling and CD44. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(10), 17142–17150. <https://doi.org/10.1002/JCB.28974>
- Wang, L., Wang, C., Tao, Z., Zhao, L., Zhu, Z., Wu, W., He, Y., Chen, H., Zheng, B., Huang, X., Yu, Y., Yang, L., Liang, G., Cui, R., & Chen, T. (2019). Curcumin derivative WZ35 inhibits tumor cell growth via ROS-YAP-JNK signaling pathway in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *38*(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1424-4>
- Wang, N., Feng, T., Liu, X., & Liu, Q. (2020). Curcumin inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer cells through up-regulation of miR-206 and suppression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Acta Pharmaceutica*, *70*(3), 399–409. <https://doi.org/10.2478/ACPH-2020-0029>
- Washbrook, E. (2006). Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*, *3*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1383/WOHM.2006.3.1.8>
- WHO. (2020). *Cancer Today*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i
- Wu, J., Huang, Y., Zhou, X., Xiang, Z., Yang, Z., Meng, D., Wu, D., Zhang, J., & Yang, J. (2022). ATF3 and its emerging role in atherosclerosis: a narrative review. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, *12*(6), 926–942. <https://doi.org/10.21037/CDT-22-206/COIF>
- Xia, Y. Q., Wei, X. Y., Li, W. L., Kanchana, K., Xu, C. C., Chen, D. H., Chou, P. H., Jin, R., Wu, J. Z., & Liang, G. (2014). Curcumin analogue A501 induces G2/M arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *15*(16), 6893–6898. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.16.6893>
- Xiao, Y., Li, Y., Shi, D., Wang, X., Dai, S., Yang, M., Kong, L., Chen, B., Huang, X., Lin, C., Liao, W., Xu, B., Chen, X., Wang, L., Chen, X., Ouyang, Y., Liu, G., Li, H., & Song, L. (2022). MEX3C-Mediated Decay of SOCS3 mRNA Promotes JAK2/STAT3 Signaling to Facilitate Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, *82*(22), 4191–4205. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1203/709244/AM/MEX3C-MEDIATED-DECAY-OF-SOCS3-MRNA-PROMOTES-JAK2>
- Xiao-He Yang, Todd L. Sladek, Xuesong Liu, Bryn R. Butler, Christopher J. Froelich, & Ann D. Thor. (2001). *Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin- and Etoposide-induced Apoptosis1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research*. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/61/1/348/507421/Reconstitution-of-Caspase-3-Sensitizes-MCF-7>

- Xie, J. J., Xie, Y. M., Chen, B., Pan, F., Guo, J. C., Zhao, Q., Shen, J. H., Wu, Z. Y., Wu, J. Y., Xu, L. Y., & Li, E. M. (2014). ATF3 functions as a novel tumor suppressor with prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, *5*(18), 8569. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2322>
- Yalaza, M., İnan, A., & Bozer, M. (2016). Male Breast Cancer. *The Journal of Breast Health*, *12*(1), 1. <https://doi.org/10.5152/TJBH.2015.2711>
- Yamakoshi, H., Ohori, H., Kudo, C., Sato, A., Kanoh, N., Ishioka, C., Shibata, H., & Iwabuchi, Y. (2010). Structure-activity relationship of C5-curcuminoids and synthesis of their molecular probes thereof. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *18*(3), 1083–1092. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.045>
- Yang, C., Ma, X., Wang, Z., Zeng, X., Hu, Z., Ye, Z., & Shen, G. (2017). Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 431. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S126964>
- Yang, J. J., Chen, X. Y., Song, D. D., & Huang, L. L. (2023). Design, synthesis and evaluation of novel curcumin analog as potential anti-lung cancer agent. *Journal of Asian Natural Products Research*, *25*(5), 456–470. <https://doi.org/10.1080/10286020.2022.2095264>
- Yang, L., Yu, L., Chen, X., Hu, Y., & Wang, B. (2015). Clinical analysis of adverse drug reactions between vincristine and triazoles in children with acute lymphoblastic leukemia. *Medical Science Monitor*, *21*, 1656–1661. <https://doi.org/10.12659/MSM.893142>
- Yoon, N. A., Jo, H. G., Lee, U. H., Park, J. H., Yoon, J. E., Ryu, J., Kang, S. S., Min, Y. J., Ju, S. A., Seo, E. H., Huh, I. Y., Lee, B. J., Park, J. W., & Cho, W. J. (2016). Tristetraprolin suppresses the EMT through the down-regulation of Twist1 and Snail1 in cancer cells. *Oncotarget*, *7*(8), 8931. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7094>
- Yu, L., Zhang, Y., Zhang, H., & Li, Y. (2017). SOCS3 overexpression inhibits advanced glycation end product-induced EMT in proximal tubule epithelial cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *13*(6), 3109. <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.4297>
- Yuan, X., Yu, L., Li, J., Xie, G., Rong, T., Zhang, L., Chen, J., Meng, Q., Irving, A. T., Wang, D., Williams, E. D., Liu, J. P., Sadler, A. J., Williams, B. R. G., Shen, L., & Xu, D. (2013). ATF3 suppresses metastasis of bladder cancer by regulating gelsolin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Research*, *73*(12), 3625–3637. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3879/650755/AM/ATF3-SUPPRESSES-METASTASIS-OF-BLADDER-CANCER-BY>
- Zhang, H., Xu, W., Li, B., Zhang, K., Wu, Y., Xu, H., Wang, J., Zhang, J., Fan, R., & Wei, J. (2015). Curcumin Promotes Cell Cycle Arrest and Inhibits Survival of Human Renal Cancer Cells by Negative Modulation of the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *73*(3), 681–686. <https://doi.org/10.1007/S12013-015-0694-5/FIGURES/6>
- Zhang, J., Cao, W., Xu, Q., & Chen, W. T. (2011). The expression of EMP1 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and possibly associated with tumour metastasis. *Journal of Clinical Pathology*, *64*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1136/JCP.2010.082404>
- Zhang, L., Tao, X., Fu, Q., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zhu, Y., Tian, H., Li, Q., Liu, M., Hu, H., Zeng, B., Lin, Z., Li, C., Luo, R., & Song, X. (2019). Curcumin inhibits cell proliferation and migration in NSCLC through a synergistic effect on the TLR4/MyD88 and EGFR pathways. *Oncology Reports*, *42*(5), 1843–1855. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7278/HTML>
- Zhang, S., Xia, C., Xu, C., Liu, J., Zhu, H., Yang, Y., Xu, F., Zhao, J., Chang, Y., & Zhao, Q. (2017). Early growth response 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Fas ligand. *International Journal of Oncology*, *50*(3), 805–814. <https://doi.org/10.3892/IJO.2017.3855/HTML>

- Zhang, Z., Lin, R., Liu, Z., Yan, T., Xia, Y., Zhao, L., Lin, F., Zhang, X., Li, C., & Wang, Y. (2020). Curcumin analog, WZ37, promotes G2/M arrest and apoptosis of HNSCC cells through Akt/mTOR inhibition. *Toxicology in Vitro*, *65*, 104754. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2019.104754>
- Zhao, J. an, Nie, W., Dong, L., Liu, W., & Wei, W. (2021). A curcumin analog GL63 inhibits the malignant behaviors of hepatocellular carcinoma by inactivating the JAK2/STAT3 signaling pathway via the circular RNA zinc finger protein 83/microRNA-324-5p/cyclin-dependent kinase 16 axis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *36*(10), 2967. <https://doi.org/10.1111/JGH.15545>
- Zhou, H., Ning, Y., Zeng, G., Zhou, C., & Ding, X. (2021). Curcumin promotes cell cycle arrest and apoptosis of acute myeloid leukemia cells by inactivating AKT. *Oncology Reports*, *45*(4). <https://doi.org/10.3892/OR.2021.7962>
- Zhou, Q. X., Jiang, X. M., Wang, Z. D., Li, C. L., & Cui, Y. F. (2015). Enhanced expression of suppresser of cytokine signaling 3 inhibits the IL-6-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cholangiocarcinoma cell metastasis. *Medical Oncology*, *32*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S12032-015-0553-7/FIGURES/5>
- Zhou, X., Xu, Z., Li, A., Zhang, Z., & Xu, S. (2018). Double-sides sticking mechanism of vinblastine interacting with α,β -tubulin to get activity against cancer cells. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1539412>, *37*(15), 4080–4091. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1539412>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, *94*(3), 909. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00026.2013>
- Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., & Van Deenen, L. L. M. (1977). Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature* *1977* *268*:5618, *268*(5618), 358–360. <https://doi.org/10.1038/268358a0>