



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mariana Moreno de Sousa Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 para a sinalização e atividade de STAT3 em
modelos celulares de câncer de mama**

Rio de Janeiro

2024

Mariana Moreno de Sousa Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 para a sinalização e atividade de STAT3 em modelos
celulares de câncer de mama**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha
Coorientadora: Dra. Ísis Salviano Soares de Amorim

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

R696 Rodrigues, Mariana Moreno de Sousa
Investigação do papel de APE1 para a sinalização e atividade de STAT3 em modelos celulares de câncer de mama / Mariana Moreno de Sousa Rodrigues. – 2024.
117 f.

Orientadora: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ísis Salviano Soares de Amorim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Neoplasias da Mama. 2. Protocolos Antineoplásicos. 3. DNA Liase (Sítios Apurínicos ou Apirimidínicos). 4. Fator de Transcrição STAT3. I. Mencialha, Andre Luiz. II. Amorim, Ísis Salviano Soares de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.277.3:618.19-006

Bibliotecário: Hugo da Costa Maia Bernardo - CRB-7/7426

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mariana Moreno de Sousa Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 para a sinalização e atividade de STAT3 em modelos
celulares de câncer de mama**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de agosto de 2024.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Dra. Ísis Salviano Soares de Amorim

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Julio César Madureira de Freitas Junior

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dra. Eliane Fialho de Oliveira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Sheila Coelho Soares Lima

Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2024

RESUMO

RODRIGUES, Mariana Moreno de Sousa. **Investigação do papel de APE1 para a sinalização e atividade de STAT3 em modelos celulares de câncer de mama.** 2024. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A proteína APE1 atua no reparo de DNA, e pelo seu domínio redox, na ativação de fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral. Entre esses, STAT3 regula a ativação de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e metástase. Com isso, APE1 e STAT3 emergem como potenciais alvos terapêuticos para o câncer. Previamente mostramos que a inibição combinada de APE1 e STAT3 em células de câncer de mama reduzem ainda mais a viabilidade quando comparado ao tratamento individual. Este dado sugere a coparticipação de APE1 e STAT3 para a sobrevivência celular no câncer de mama, porém o papel dessas sinalizações na aquisição de características relacionadas ao fenótipo maligno ainda é desconhecido no câncer de mama. Esse tipo de câncer é o mais frequente em mulheres, e em estágios avançados pode se tornar resistente a terapias e formar metástases. Portanto, investigamos a contribuição de APE1 para a ativação e atividade transcricional de STAT3, além do impacto dessa inter-relação para o fenótipo maligno de células de câncer de mama. Para isso, analisamos, nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, o efeito dos inibidores de APE1 e STAT3 sobre: a atividade transcricional de STAT3, por ensaio de *gene reporter*; a viabilidade celular, por WST-1; a proliferação, por formação de colônia; a morte celular, por citometria; a migração, por *Wound Healing*; e a invasão, por transmigração em membrana *Transwell* revestidas de matrigel. Também investigamos o impacto dessa sinalização nos níveis de mRNA de genes que regulam positivamente a migração (*RHO* e *FSCN1*), a transição epitélio-mesenquimal (*VIM*, *FNI*, *CDH2*, *MMP9* e *SNAIL*), a proliferação e sobrevivência celular (*BIRC5*, *MKI67* e *CCND1*), além de *FOS* que é um alvo de STAT3. Os níveis de mRNA foram analisados por RT-qPCR e as análises *in silico* foram realizadas por ferramentas de bioinformática, pelas quais também foi possível avaliar os níveis de fosforilação de STAT3. A combinação do inibidor redox de APE1, APX2009, com o inibidor de STAT3, Stattic, reduz ainda mais a viabilidade celular, proliferação, migração e invasão de células de câncer de mama, comparado ao tratamento individual. Ainda, Stattic, individualmente ou combinado com APX2009, diminui os níveis dos marcadores mesenquimais vimentina e fibronectina nas células MCF-7. As análises *in silico* indicaram que os níveis das assinaturas de STAT3 e APE1, estão positivamente correlacionados entre si e com os níveis de assinaturas de proliferação e TEM. Além disso, os níveis de STAT3 fosforilado são positivamente correlacionados com os níveis proteicos dos marcadores mesenquimais vimentina e Snail, e amostras com altos níveis de STAT3 também exibem altos níveis de fibronectina e N-caderina, e baixos níveis do marcador epitelial E-caderina. Portanto, sugerimos que a combinação da inibição redox de APE1 e de STAT3, é uma estratégia eficaz em reduzir a sobrevivência e fenótipo maligno de células de câncer de mama. Dessa forma, os resultados sugerem um importante papel da atividade redox de APE1 e de STAT3 no câncer de mama, o que pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas promissoras contra esse câncer.

Palavras-chave: APE1; STAT3; agressividade; câncer de mama.

ABSTRACT

RODRIGUES, Mariana Moreno de Sousa. **Investigation of APE1 role in STAT3 signaling and activity in breast cancer cell models.** 2024. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

The APE1 protein acts in DNA repair and activating transcription factors involved in cancer progression through its redox domain. Among them, STAT3 regulates the activation of genes related to proliferation, survival, and metastasis. Therefore, APE1 and STAT3 emerge as potential therapeutic targets for cancer. Previous results demonstrated that the combined inhibition of APE1 and STAT3 in breast cancer cells led to a higher decrease in cell viability compared to the individual treatment. This data suggests a co-participation of APE1 and STAT3 in breast cancer cell survival, however, the role of these signaling in the acquisition of characteristics related to the malignant phenotype is still unclear in breast cancer. This cancer is the most frequent among women, and in advanced stages, the tumors can become resistant to therapies and form metastasis. Thus, we investigated the contribution of APE1 to the activation and transcriptional activity of STAT3, as well as the impact of this inter-relation for breast cancer malignant phenotype. For this purpose, we analyze in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines, the effects of APE1 and STAT3 inhibitors in: the transcriptional activity of STAT3, by *gene reporter* assay; in the cell viability, by WST-1; cell proliferation, by colony formation; in cell death, by flow cytometry; in cell migration, by Wound Healing; and invasion, by transmigration on a Matrigel-coated Transwell membrane. We also investigated this signaling impact on the breast cancer mRNA levels of genes that positively regulate cell migration (*RHOA* and *FSCN1*), genes that promote the EMT (*VIM*, *FN1*, *CDH2*, *MMP9* and *SNAI1*), genes that promote cell proliferation and survival (*BIRC5*, *MKI67* and *CCND1*), besides the STAT3 target *FOS*. The mRNA levels were analyzed by RT-qPCR and in silico by multiple bioinformatic tools, also used to evaluate the levels of STAT3 phosphorylation. The combination of APE1 redox inhibitor, APX2009, and STAT3 inhibitor, Stattic, can further reduce cell viability, proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells compared to individual treatments. Moreover, Stattic individually or in combination with APX2009, decreases the mesenchymal markers vimentin and fibronectin levels in the MCF-7 cell line. In silico analysis indicates that the STAT3 and redox APE1 signature levels positively correlate with each Other and EMT and proliferation signatures in breast cancer samples. Besides that, phosphorylated STAT3 levels are positively correlated with the levels of mesenchymal markers, such as vimentin and snail. The samples with high levels of phosphorylated STAT3 also have high levels of fibronectin and N-cadherin and low levels of the epithelial marker E-cadherin. Therefore, we suggest that combined APE1 and STAT3 inhibition is a more efficient strategy to reduce breast cancer cell survival and malignant phenotype. Thus, the results suggest an important role of redox APE1 and STAT3 in breast cancer, which contributes to the development of promising therapeutic strategies against breast cancer.

Keywords: APE1; STAT3; aggressiveness; breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os subtipos de câncer de mama	19
Figura 2 – Representação da estrutura da proteína APE1 e suas atuações	22
Figura 3 – Inibidores do domínio redox da proteína APE1	25
Figura 4 – Via de sinalização de STAT3	27
Figura 5 – Processos celulares relevantes para o câncer regulados por STAT3	28
Figura 6 – Inibidor seletivo de STAT3	30
Figura 7 – Esquema da estrutura do plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc	40
Tabela 1 – Sequências de primers utilizados para RT-qPCR	42
Figura 8 – Perfil eletroforético do plasmídeo pM67 pTATA TK-Luc	46
Figura 9 – Curvas de melting dos primers utilizados para detecção da especificidade do plasmídeo 4X pM67 pTATA TK-Luc	47
Figura 10 – Transfecção da linhagem HEK293-T com o plasmídeo EGFP	48
Figura 11 – Quantificação da atividade transcricional de STAT3 por ensaio de <i>gene reporter</i> na linhagem HEK293-T	49
Figura 12 – Transfecção da linhagem MCF-7 com o plasmídeo GFP	50
Figura 13 – Quantificação da atividade transcricional de STAT3 por ensaio de <i>gene reporter</i> na linhagem MCF-7	51
Figura 14 – Transfecção da linhagem MDA-MB-231 com o plasmídeo GFP	52
Tabela 2 – IC50 dos inibidores Stattic e APX2009 nas linhagens de câncer de mama	53
Figura 15 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, na viabilidade celular das linhagens de câncer de mama	54
Figura 16 – Índice de combinação dos inibidores Stattic e APX2009 nas linhagens de câncer de mama	54
Figura 17 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009 na viabilidade celular da linhagem celular HEK293-T	55
Figura 18 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de formação de colônias da linhagem MDA-MB-231	56
Figura 19 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de formação de colônias da linhagem MCF-7	57
Figura 20 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, na	

capacidade migratória da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	58
Figura 21 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, na capacidade migratória da linhagem de câncer de mama MCF-7	59
Figura 22 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de invasão da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	60
Figura 23 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de invasão da linhagem de câncer de mama MCF-7	61
Figura 24 – Efeito do inibidor APX2009 na morte celular das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7	62
Figura 25 – Efeito do inibidor Stattic na morte celular das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7	63
Figura 26 – Efeito da combinação dos inibidores APX2009 e Stattic na morte celular da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	64
Figura 27 – Efeito da combinação dos inibidores APX2009 e Stattic na morte celular da linhagem de câncer de mama MCF-7	65
Figura 28 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009 no nível de LDH liberado pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	66
Figura 29 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009 no nível de LDH liberado pela linhagem de câncer de mama MCF-7	66
Figura 30 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular, na linhagem MDA-MB-231	68
Figura 31 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam múltiplas vias, na linhagem MDA-MB-231	69
Figura 32 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a migração e invasão, na linhagem MDA-MB-231	70
Figura 33 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam classicamente a Transição epitélio-mesenquimal, na linhagem MDA-MB-231	71
Figura 34 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação, na linhagem MCF-7	72
Figura 35 – Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis	

	de mRNA de genes que regulam múltiplas vias, na linhagem MCF-7	73
Figura 36 –	Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a migração e invasão, na linhagem MCF-7	74
Figura 37 –	Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam classicamente a transição epitélio-mesenquimal, na linhagem MCF-7	75
Figura 38 –	Correlação dos níveis de mRNA da assinatura da atividade redox de APE1 e da atividade de STAT3 em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama	76
Figura 39 –	Correlação entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com os níveis de mRNA da assinatura de TEM em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama	77
Figura 40 –	Correlação entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com os níveis de mRNA da assinatura de proliferação em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama	78
Figura 41 –	<i>Heatmap</i> das correlações entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com as assinaturas de proliferação e TEM em amostras de câncer de mama	79
Figura 42 –	Níveis de mRNA das assinaturas de proliferação e de TEM de acordo com os níveis das assinaturas de STAT3 e APE1 combinadas em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama	80
Figura 43 –	Correlação entre os níveis da assinatura de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo basal	81
Figura 44 –	Correlação entre os níveis da assinatura de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo luminal A ..	82
Figura 45 –	Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo basal	83
Figura 46 –	Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo luminal A	84
Figura 47 –	<i>Heatmap</i> das correlações entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama	85

Figura 48 – Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais do subtipo basal	86
Figura 49 – Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais do subtipo luminal A	87
Figura 50 – <i>Heatmap</i> das correlações entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras de câncer de mama	88
Figura 51 – Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a migração celular em amostras tumorais do subtipo basal	89
Figura 52 – Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a migração celular em amostras tumorais do subtipo luminal A	90
Figura 53 – <i>Heatmap</i> das correlações entre as assinaturas de APE1 e STAT3 e os genes que regulam a migração em amostras de câncer de mama	91
Figura 54 – Níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo basal de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3	92
Figura 55 – Níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo luminal A de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3	93
Figura 56 – Níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais do subtipo basal e luminal A de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3	94
Figura 57 – Níveis de mRNA de genes que regulam a migração celular em amostras tumorais do subtipo basal e luminal A de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3	95
Figura 58 – Correlação entre os níveis de STAT3 fosforilado com os níveis proteínas que regulam a TEM em amostras tumorais de câncer de mama	96
Figura 59 – Correlação entre os níveis de STAT3 fosforilado com os níveis de proteínas que regulam processos de proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais de câncer de mama	97

Figura 60 – Correlação entre os níveis de STAT3 fosforilado com os níveis proteínas que regulam diversos processos em amostras tumorais de câncer de mama .	97
Figura 61 – Níveis de proteínas que regulam a TEM de acordo com os níveis de STAT3 fosforilado em amostras de câncer de mama	98
Figura 62 – Principais resultados obtidos no projeto	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína Ativadora 1
APE1	AP-Endonuclease 1
APEX1	<i>Apurínico/Apirimidínico Endodeoxirribonuclease 1</i>
BER	Base Excision Repair (reparo por excisão de bases)
cDNA	DNA complementar
Cels	Células
CPTAC	<i>Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium</i>
<i>Crispr</i>	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
$\Delta\Delta Ct$	Delta-Delta Ct
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ER/PR	Receptor de estrogênio/ progesterona
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2
HIF-1 α	Fator Induzido por Hipóxia
IL-6	Interleucina 6
JAK	Janus Quinase
LLA-T	Leucemia Linfocítica Aguda de células T
MCL-1	myeloid cell leukemia 1
MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
NF κ -B	Fator Nuclear kappa B
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

pH	potencial hidrogeniônico
PIAS	<i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>
PTPs	<i>protein tyrosine phosphatases</i>
Ref-1	Redox factor 1
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-qPCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SFB	Soro Fetal Bovino
SH2	domínio de homologia Src 2
<i>shRNA</i>	<i>Short Hairpin RNA</i>
<i>siRNA</i>	pequeno RNA de interferência
sítio AP	sítioapurínico/apurimidínico
SOCS	<i>Suppressors of cytokine signaling</i>
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TAE	Tris-Acetato EDTA
TCGA- BRCA	The Cancer Genomic Atlas cohort breast cancer
TCPA	The Cancer Protein Atlas
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TME	Transição mesênquima-epitelial
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
CO ₂	gás carbônico
%	por cento
°C	graus Celsius
cm ²	centímetro ao quadrado
bp	pares de base
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
μ L	Micro litro
mL	Mililitro
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
rpm	Rotação por minuto
min	Minuto
h	Hora
>	maior que
<	menor que
\pm	mais ou menos
V	Volt

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	O Câncer de mama	17
1.2	Subtipos de Câncer de mama	18
1.3	Agressividade tumoral	19
1.4	AP-Endonuclease 1 (APE1/REF-1)	21
1.5	APE1 no Câncer	22
1.6	Inibidores da função redox de APE1	24
1.7	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3)	25
1.8	STAT3 no Câncer	27
1.9	Inibidores de STAT3	29
1.10	A associação entre APE1 e STAT3	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Cultura celular	33
3.2	Tratamento com Inibidores	33
3.3	Ensaio de viabilidade celular por WST-1	34
3.4	Cálculo do IC50	34
3.5	Cálculo do Índice de combinação	35
3.6	Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem	35
3.7	Ensaio de Migração por <i>Wound Healing</i>	36
3.8	Ensaio de Invasão celular por <i>Transwell-Matrigel</i>	36
3.9	Ensaio de morte celular	37
3.9.1	<u>Marcação de células com Annexin V-FITC e 7-AAD</u>	37
3.9.2	<u>Ensaio de citotoxicidade por LDH (LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay)</u>	38
3.10	Ensaio de gene repórter	38
3.10.1	<u>Expansão e extração de plasmídeos</u>	38
3.10.2	<u>Eletroforese em gel de agarose</u>	38

3.10.3	<u>Transfecção e quantificação da Luminescência</u>	39
3.11	Análise dos níveis de mRNA	40
3.11.1	<u>Extração de RNA</u>	40
3.11.2	<u>Síntese de cDNA (DNA complementar)</u>	41
3.11.3	<u>Desenho de iniciadores (primers)</u>	41
3.11.4	<u>RT-qPCR</u>	43
3.12	Análises in silico	43
3.13	Análises Estatísticas	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Análise da atividade transcricional de STAT3 em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	46
4.2	Análise da viabilidade celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	52
4.3	Análise da viabilidade das células HEK293-T em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	55
4.4	Análise do potencial de formação de colônia de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	56
4.5	Análise do potencial migração celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	58
4.6	Análise da invasão celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	59
4.7	Análise da indução de morte celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	61
4.8	Análise dos níveis de mRNA de genes que regulam positivamente a proliferação, migração e invasão, em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic	67
4.9	Correlação entres os níveis de mRNA das assinaturas de atividade de STAT3 e da atividade redox de APE1	75
4.10	Análise da associação entre os níveis de mRNA das assinaturas de TEM e proliferação e os níveis de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3	76

4.11	Análise dos níveis de mRNA dos genes relacionados a sobrevivência, migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal em relação aos níveis de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3	80
4.12	Análise de correlação entre os níveis de proteínas que regulam a sobrevivência celular, migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal e os níveis de fosforilação de STAT3	95
5	DISCUSSÃO	99
	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	112

INTRODUÇÃO

AP-Endonuclease 1 (APE1) é uma proteína que tem níveis elevados em diversos tipos de câncer, regulando vias relacionadas à agressividade tumoral. Apesar de seu importante papel na via de reparo por excisão de bases (BER), o domínio N-terminal de APE1 tem sido amplamente estudado pela sua atividade redox, capaz de promover a ativação de fatores de transcrição envolvidos na progressão do câncer, como STAT3, HIF1A, NF- κ B, AP-1 e TP53. Como ambas as funções de APE1, reparo de DNA e sinalização celular, são importantes para a manutenção da integridade celular, tumorigênese e progressão tumoral, essa proteína tem sido descrita como um importante alvo para terapias contra o câncer e sua inibição já se encontra em estudos clínicos. Ainda, nosso grupo mostrou que a inibição da porção redox de APE1 provoca redução da viabilidade celular de linhagens de câncer de mama.

Dos fatores de transcrição citados, STAT3 é elencado como um alvo significativo para redução da viabilidade celular em câncer. STAT3 participa da via JAK/STAT na qual é ativado, por fosforilação, e se transloca para o núcleo. No núcleo, STAT3 se liga ao DNA na região promotora de genes alvos relacionados à promoção de processos essenciais para o câncer, como sobrevivência, proliferação, migração, invasão e metástase. Assim como APE1, STAT3 tem seus níveis aumentados em diferentes tipos de câncer e é altamente relacionado à aquisição do fenótipo maligno. Anteriormente, também mostramos que sua inibição diminui a viabilidade celular em linhagens de câncer de mama.

Em resultados prévios, mostramos que a inibição combinada de APE1 e STAT3 em células de câncer de mama reduzem ainda mais a viabilidade quando comparada à inibição de só uma das vias. Este dado sugere a coparticipação de APE1 e STAT3 para a sobrevivência celular no câncer de mama. Entretanto, a regulação entre essas proteínas ainda é desconhecida em processos relacionados à agressividade, tal como a metástase. Portanto, esse trabalho visa investigar a contribuição de APE1 para a ativação e atividade transcricional de STAT3, tal como o impacto dessa inter-relação para processos de migração e invasão de células de câncer de mama.

O câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres no Brasil e no mundo, sendo a principal causa de morte por câncer deste público. Ao atingir estágios mais avançados, as chances de cura diminuem, devido ao aumento da resistência a tratamentos convencionais e formação de metástases. Nesse contexto e com os resultados obtidos, o entendimento da biologia desses tumores com foco em novos alvos moleculares, tal como APE1 e STAT3, pode ser um campo promissor para futuras abordagens contra a doença.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.O Câncer de mama

O câncer é caracterizado como um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos (INCA). Além disso, é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2018 (OMS).

O tipo de câncer mais comum entre as mulheres tanto em nível nacional quanto global, é o câncer de mama, sendo o quinto tipo de câncer com maior taxa de mortalidade no mundo, atrás do câncer de pulmão, colorretal, fígado e estômago (GLOBOCAN, 2022). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados mais de 70 mil novos casos de câncer de mama em mulheres para cada ano do triênio de 2023 a 2025. Além de altas taxas de incidência, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer em pessoas do sexo feminino, com cerca de 18 mil óbitos em 2021. Em escala global, a incidência de câncer de mama em mulheres foi de mais de 2 milhões de casos em 2022, correspondendo a 23,8% dos casos totais de todos os tipos de câncer, também sendo a principal causa de morte por câncer, com um número total de 666.103 casos (15,4%), em mulheres (GLOBOCAN,2022).

Apesar dos avanços científicos nas descobertas de novas terapias e incentivo ao diagnóstico precoce, as estimativas de incidência de câncer ainda possuem a tendência de aumento ao longo dos anos. De 2022 a 2050 são esperados mais de 3 milhões de novos casos de câncer de mama em mulheres (GLOBOCAN, 2022). Este fato está associado aos hábitos de vida, como alimentação, uso de drogas (como tabaco), além do envelhecimento da população. Dentre esses, a idade, acima de 50 anos, é um dos fatores de risco mais consideráveis para o câncer de mama, também devem ser levados em consideração a história reprodutiva, sedentarismo e fatores hereditários, este último corresponde a 5-10% dos casos (INCA, 2024).

Quando detectado precocemente, o câncer de mama exibe chances de cura consideráveis, entretanto quanto mais tardio o diagnóstico, maiores as chances da doença atingir estágios avançados, com resistência aos tratamentos e maior agressividade, podendo ocorrer metástases (SUN *et al.*, 2017).

1.2.Subtipos de Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença que apresenta alta heterogeneidade intra- e inter-tumoral. A heterogeneidade intratumoral demonstra as diferentes populações de células que formam a massa tumoral (LÜÖND; TIEDE; CHRISTOFORI, 2021). Já a heterogeneidade intertumoral se refere à diferença dos tumores entre os indivíduos, refletindo em diferentes subtipos de tumores.

Os subtipos de câncer de mama são definidos de acordo com uma classificação histológica baseada na expressão do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor do fator de crescimento epidérmico (HER-2), além do marcador de proliferação Ki67. Os principais subtipos são: Luminal A, Luminal B, HER-2 enriquecido e *Basal-like* (Fig.1) (SØRLIE, 2004; PRAT; PEROU, 2011; HASHMI *et al.*, 2019).

O subtipo Luminal A é o subtipo mais comum, representando cerca de 50 a 60% dos tumores, possui uma alta expressão dos receptores ER e/ou PR, com uma menor expressão de genes que participam da proliferação, com baixos níveis do marcador Ki67 (cerca de 24%), além de não expressar os receptores HER-2. Se trata de um subtipo com prognóstico favorável e seu tratamento é feito principalmente com terapia endócrina cujos alvos são os receptores hormonais.

O subtipo Luminal B representa cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama e, quando comparado ao subtipo Luminal A, possui maior expressão de genes relacionados à proliferação, como Ki67 (cerca de 35%), e conseqüentemente um pior prognóstico e maior agressividade. Esse subtipo é positivo para os receptores ER e/ou PR, além de poder ou não expressar o receptor HER-2. A principal forma de terapia também é a endócrina.

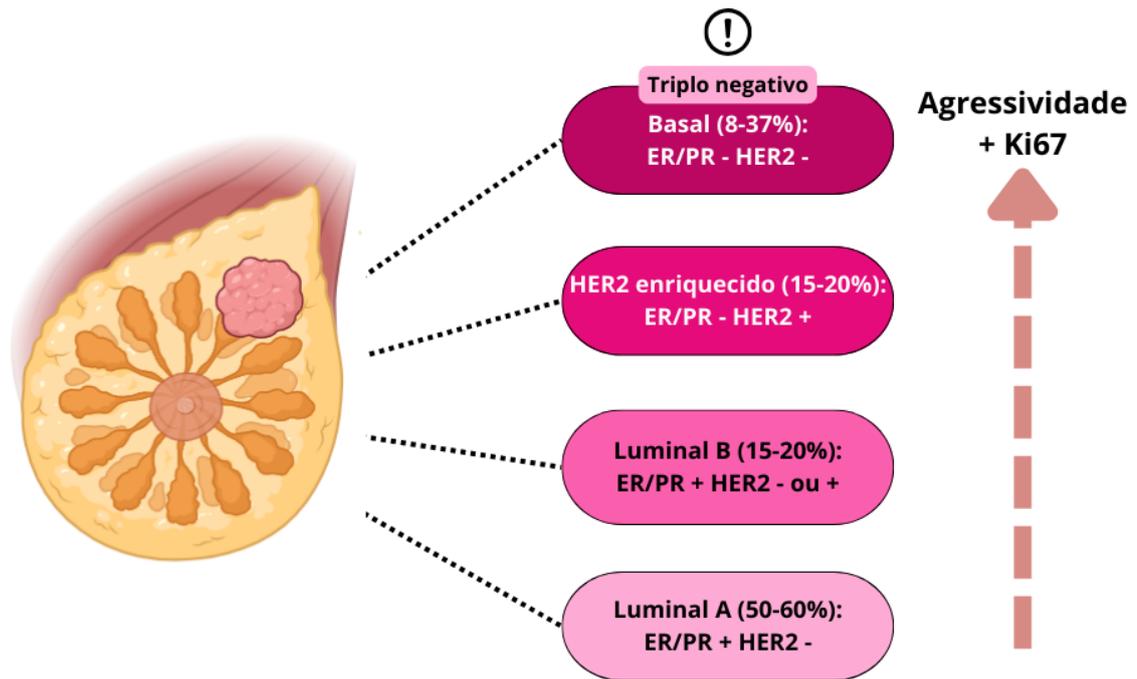
O subtipo HER-2 enriquecido também representa cerca de 15 a 20% dos casos, apresentando um maior fenótipo de agressividade. Esse subtipo é negativo para os receptores ER e PR, e positivo para HER-2. A principal forma de tratamento é a terapia alvo contra a proteína HER-2, com o anticorpo monoclonal Trastuzumabe que reconhece e bloqueia a ação do receptor HER-2.

O subtipo *Basal-like* representa de 8 a 37% dos tumores e é caracterizado pela positividade para marcadores basais (queratinas 5, 14 e 17) e por não expressar os receptores ER, PR e HER-2, também sendo um subtipo com grande agressividade e pior prognóstico. Por ser negativo para os três receptores, também pode ser chamado de triplo negativo. Entretanto, os termos Basal e triplo negativo não são sinônimos, visto que o basal é um subtipo mais específico dentro

dos triplo negativos, o qual é caracterizado pela expressão das queratinas citadas. Por ter ausência dos três receptores, não apresenta um alvo direcionado para a terapia, sendo mais comum o uso de quimioterápicos.

Portanto, a identificação do subtipo é essencial para o melhor diagnóstico e prognóstico do paciente, podendo garantir melhores formas de tratamento e aumentar a sobrevida (YEO; GUAN, 2017).

Figura 1- Os subtipos de câncer de mama.



Legenda: Os cânceres de mama são classificados em quatro principais subtipos de acordo com a expressão de receptores de estrogênio, progesterona e HER-2. O subtipo Luminal A e B apresentam marcação positiva para os receptores hormonais, porém o Luminal B, pode apresentar ou não a expressão de HER-2. O subtipo Luminal A é considerado o de melhor prognóstico e corresponde a maior parte dos tumores, além de ter baixa expressão de Ki67. O subtipo HER-2 enriquecido é negativo para os receptores hormonais, porém apresenta alta expressão de HER-2. Já o subtipo Basal, é triplo negativo, ou seja, não expressa nenhum dos três receptores, sendo considerado o de maior agressividade e pior prognóstico.

Fonte: A autora, 2024.

1.3. Agressividade tumoral

Os subtipos de câncer de mama variam em níveis de agressividade tumoral. Esse fenótipo é normalmente caracterizado pela formação de metástases, processo conhecido como a capacidade das células tumorais invadirem e colonizarem tecidos e órgãos distantes (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

A cascata metastática é um processo complexo, e somente cerca de 0,01% das células que alcançam a circulação sanguínea, conseguirão sobreviver e se instalar em um novo sítio, concretizando assim o processo de metástase. Esse processo ocorre através de uma série de eventos que favorecem a migração das células tumorais para o nicho metastático, um destes é o estímulo para a formação de novos vasos sanguíneos que tem por objetivo aumentar o aporte de nutrientes e oxigênio à massa tumoral.

Parte das células que compõem o tumor adquirem a capacidade de invasão e migração, coordenados por mecanismos celulares e moleculares, os quais permitem o alcance de tecidos adjacentes e a intravasão em vasos sanguíneos e linfáticos. As células tumorais podem passar por uma alteração fenotípica que contribui para sua sobrevivência neste processo. Essa alteração é conhecida como transição epitélio-mesenquimal (TEM), a qual altera substancialmente a plasticidade dessas células.

Chegando ao sítio metastático, as células sobreviventes se aderem ao endotélio que constitui o interior dos vasos sanguíneos e ocorre a extravasão para o novo órgão. Neste sítio, essas células podem retornar ao fenótipo epitelial, realizando o processo inverso conhecido como transição mesênquima-epitelial (TME), voltam a proliferar, e estabelecem um novo microambiente tumoral (FIDLER, 2003; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

A TEM é um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais para a formação de metástases. Nesse processo, as células perdem características epiteliais, com perda da polaridade celular e de marcadores como E-caderina, e adquirem características mesenquimais, passando a apresentar marcadores como N-caderina e vimentina. A partir disso, essas células ganham a capacidade de migração e invasão para atingir outras áreas do organismo. A TEM é um processo reversível e é regulado por diversos fatores de transcrição, como TWIST1, SLUG, SNAIL, ZEB1 e ZEB2 (SIP1) (Zhang and Weinberg 2018).

A migração celular é um processo que pode ocorrer de maneira individual ou coletiva, que envolve a polarização celular, com reorganização do citoesqueleto e formação de protusões de membrana. Esse processo é regulado por proteínas da família RHO, como RHO, RAC e CDC42 (MAYOR; ETIENNE-MANNEVILLE, 2016). Além da capacidade de migrar, as células também podem invadir os tecidos adjacentes, dessa forma, as metaloproteinases que são proteínas importantes para o processo de metástase, também são reguladas durante a TEM. Essas proteínas têm como função a degradação da matriz extracelular, facilitando a passagem das células no processo de migração e invasão (SCHEAU *et al.*, 2019).

Os tumores de mama classificados como triplo negativos são considerados os de maior agressividade, exibem pior prognóstico da doença e maior probabilidade de ocorrência de

metástases (YIN *et al.*, 2020). Por outro lado, o Luminal A que corresponde a maior parte dos casos de câncer de mama e exibe um melhor prognóstico comparado aos outros subtipos, em estágios avançados exibe maior risco de metástase óssea comparado a outros subtipos (WANG *et al.*, 2023). As metástases ósseas são consideradas agressivas e reduzem a sobrevida do paciente (ZULAUF *et al.*, 2019).

Tendo em vista a heterogeneidade tumoral que impacta também em diferentes níveis de agressividade entre os subtipos de câncer de mama, torna-se necessário a descoberta de novos tratamentos e alvos mais eficazes para diminuir a agressividade tumoral. Com isso, a proteína APE1, especificamente sua função redox, tem sido apontada como um possível alvo, devido a seu potencial em favorecer processos de sobrevivência, proliferação, e agressividade, como invasão e migração.

1.4.AP-Endonuclease 1 (APE1/REF-1)

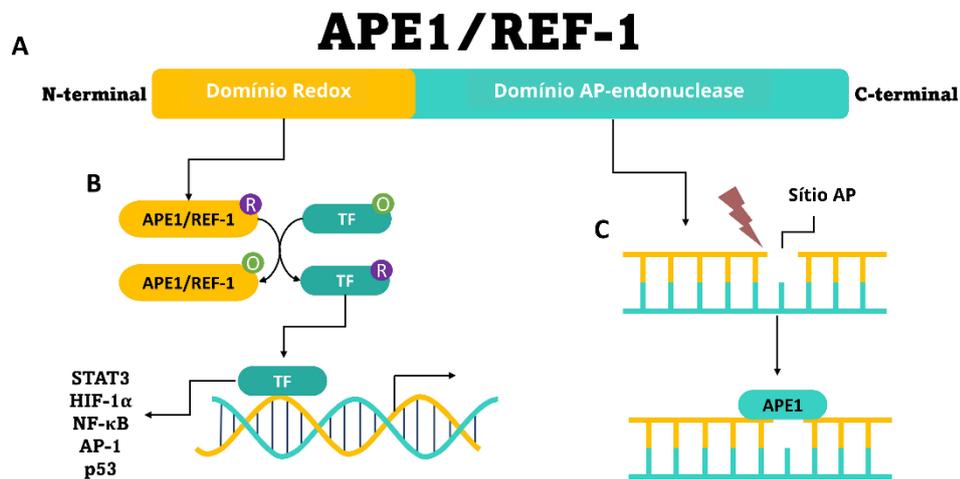
A AP-endonuclease 1 é codificada pelo gene *Apurínico/Apirimidínico Endodeoxirribonuclease 1 (APEX1)*, localizado no cromossomo 14q11.2-q12. A nomenclatura REF-1 faz menção à atividade redox cujo acrônimo é originado de *redox factor 1*. Para tal, as possibilidades encontradas nos artigos para essa proteína são: APE1, REF-1 ou APE1/REF-1. Essa proteína é constituída por dois domínios com funções distintas, como o reparo de DNA e a regulação de fatores de transcrição, sendo essas funções independentes (Fig.2). O domínio C-terminal possui sua tradicional função de reparo de DNA, através do qual APE1 atua na via de reparo por excisão de bases (BER), importante para manter a integridade e sobrevivência celular. Na via de BER, glicosilases reconhecem e removem um dano em bases do DNA, causados por oxidação, alquilação e quebras de fita simples. Essa remoção leva à formação de um sítio apurínico ou apirimidínico (sítio AP), onde a atividade de endonuclease de APE1 irá atuar para reparar o dano, provocando a clivagem do esqueleto fosfodiéster do DNA na porção 5' do sítio AP, posteriormente ocorre a remoção dos resíduos de 5'-fosfato-desoxirribose, síntese de DNA pela DNA polimerase e ligação pela ligase (WHITAKER; FREUDENTHAL, 2018).

Já o domínio N-terminal é responsável pela função redox de APE1, regulando a ativação de fatores de transcrição. Essa ativação ocorre através de reações de oxi-redução, em que APE1 se torna oxidado ao provocar a redução de resíduos de cisteína oxidados de fatores de transcrição.

Dessa forma, esse fator reduzido se torna ativado e é capaz de, no núcleo, se ligar a regiões promotoras de genes alvos, estimulando sua transcrição. Diferentes fatores já foram identificados como regulados por APE1, como o Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3), Fator Induzido por Hipóxia (HIF1A), Fator Nuclear kappa B (NFkB), Proteína Ativadora 1 (AP-1) e TP53 (SHAH *et al.*, 2017a). Ainda, novas funções têm sido descobertas para essa proteína, como o papel de APE1 no metabolismo de RNA (MALFATTI *et al.*, 2023).

Devido a suas múltiplas funções, APE1 tem sido estudada como possível alvo de terapias em diferentes doenças e condições, como retinopatias, neuropatias, inflamação, doenças cardiovasculares e câncer (CHOI; JOO; JEON, 2016; SHAH *et al.*, 2017a).

Figura 2-Representação da estrutura da proteína APE1 e suas atuações.



Legenda: (A) A proteína APE1 apresenta dois principais domínios, o N-terminal com função redox, e o C-terminal com sua função de endonuclease. (B) O domínio redox de APE1 é responsável por promover a redução de resíduos de cisteína de fatores de transcrição, ativando-os. Assim, quando ativados se ligam ao promotor de genes alvos. (C) Já o domínio C-terminal é responsável pela atuação de APE1 no reparo de DNA por excisão de bases. TF: fator de transcrição; R: reduzido; O: oxidado.

Fonte: Modificado de Siqueira *et al.* 2024.

1.5. APE1 no Câncer

A proteína APE1 através de sua função de reparo de DNA e coativação de fatores de transcrição, consegue atuar em diferentes processos celulares importantes, sendo elencada como uma proteína essencial para favorecer os diferentes *Hallmarks* do câncer (SIQUEIRA *et*

al., 2024b). Estudos indicam que diversos tipos tumorais como bexiga, colorretal, pulmão, fígado e mama apresentam altos níveis de APE1 (MALFATTI *et al.*, 2023). Também é comum em tumores, ocorrer alteração na localização celular de APE1, que normalmente é encontrada no núcleo, para o citoplasma. Em amostras de câncer de ovário e fígado, foi demonstrado que os níveis de APE1 no citoplasma se correlacionam com estágios mais avançados da doença, diminuindo a sobrevida do paciente, comparado com aqueles que possuem amostras tumorais com níveis negativos para APE1 citoplasmático (DI MASO *et al.*, 2007; SHENG *et al.*, 2012). Além disso, Wu *et al.* identificaram que a presença de APE1 citoplasmático, é capaz de levar ao crescimento de tumores de pulmão e metástases pulmonares (WU *et al.*, 2010). Ambas as alterações, de localização e níveis proteicos, podem influenciar negativamente no prognóstico da doença, impactando na resposta ao tratamento e agressividade tumoral.

APE1 exerce papel importante tanto em tumores sólidos, quanto em neoplasias hematológicas. Ding *et al.* identificaram maior expressão a nível de mRNA de APE1 em amostras de pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda de células T (LLA-T) comparado com amostras de medula óssea sadia. O tratamento de células leucêmicas com o inibidor redox de APE1, E3330, levou à redução da atividade de NF- κ B, o qual é alvo da função redox de APE1, diminuiu a viabilidade celular e provocou morte celular por apoptose (DING *et al.*, 2017).

Fishel *et al.* demonstraram que APE1 é mais expressa a nível de mRNA e proteína em amostras de pacientes com câncer de bexiga comparado a amostras de tecidos não tumorais e/ou entre linhagens celulares tumorais versus não tumorais. E, a inibição da porção redox de APE1 nas linhagens celulares de câncer de bexiga levou à diminuição de proliferação e causou morte celular por apoptose nessas células. Essa inibição também levou à diminuição no tamanho de esferoides de células de câncer de bexiga (FISHEL *et al.*, 2019). Também foi observado maiores níveis proteicos de APE1 em câncer de ovário e maior localização nuclear de APE1, que foi correlacionado com maior agressividade tumoral, devido a menor tempo de sobrevida dos pacientes com amostras positivas para APE1 (AL-ATTAR *et al.*, 2010).

Em câncer de mama, foi observado maiores níveis de APE1 em tecido tumoral triplo negativo, comparado às amostras não tumorais adjacentes. Esses altos níveis foram correlacionados com diminuição do tempo de sobrevida e pior prognóstico. Os autores também demonstraram que linhagens tumorais de mama, como MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MCF-7, exibem maior expressão de APE1 a nível de mRNA e proteína comparado com linhagem de mama não tumoral (MCF-10). Além disso, a diminuição dos níveis proteicos de APE1 por *knockdown* aumentou a sensibilidade de células triplo negativo ao tratamento com Olaparibe, levando essas células a parada no ciclo celular e morte celular por apoptose (JIAN *et al.*, 2022).

Outro estudo em câncer de mama identificou que o inibidor redox E3330, além de afetar a viabilidade celular, foi capaz de diminuir a migração celular de células triplo negativo de câncer de mama e, quando combinado com docetaxel, reduziu o potencial invasivo dessas células (GUERREIRO *et al.*, 2017).

Tendo em vista o relevante papel do domínio redox de APE1, ele se apresenta como um potencial alvo para tratamentos contra o câncer, visto que é possível atingir as diferentes vias pró-tumorais reguladas por ele, como a sinalização coordenada por STAT3. Essa proteína atua como fator de transcrição e promove processos essenciais para o câncer, incluindo migração celular, inflamação e angiogênese (FISHEL *et al.*, 2019). Portanto, a investigação sobre APE1, e especificamente sobre sua função redox, se trata de uma abordagem importante para identificação de promissoras terapias contra o câncer.

1.6. Inibidores da função redox de APE1

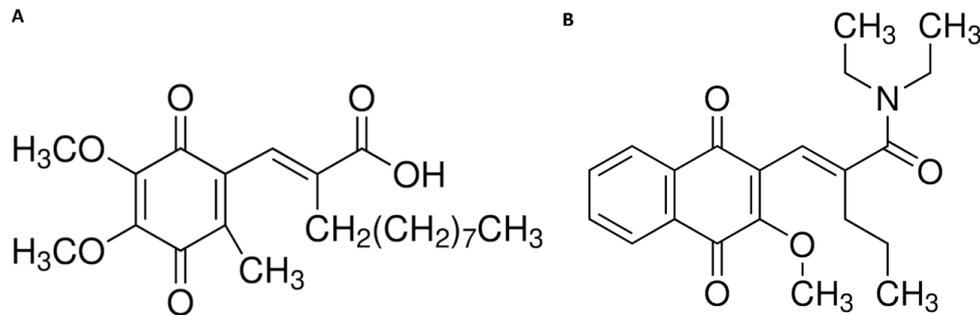
Por ter essa importante atuação em tumores, diversos estudos visam a inibição da proteína APE1 através de diferentes estratégias. É possível realizar o silenciamento de APE1 através de siRNA (pequeno RNA de interferência), CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) e shRNA (*short hairpin RNA*), entretanto, essas metodologias levam à inibição da proteína APE1 inteira, independente dos seus domínios (CHEN *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2017b; TANG *et al.*, 2022; MIJIT *et al.*, 2024). Portanto, inibidores têm sido elaborados, visando a inibição dos domínios específicos da proteína APE1, para inibir a sua atuação no reparo de DNA, ou a sua função redox (MALFATTI *et al.*, 2023).

Um dos inibidores redox mais utilizados é o composto E3330 ou APX3330 (Fig. 3) (NYLAND *et al.*, 2010). Esse inibidor demonstrou ser eficaz em reduzir o crescimento de tumores e a capacidade de migração celular em câncer de pâncreas (ZOU; MAITRA, 2008), mama, pulmão, entre outros (MANGUINHAS *et al.*, 2020). Além de apresentar efeitos *in vitro* e *in vivo*, APX3330 também entrou em estudos clínicos de fase 1 (NCT03375086), sendo aprovado como seguro (CHU *et al.*, 2019).

Diante do sucesso do APX3330, novos análogos inibidores redox de APE1 foram sintetizados, como APX2009 (Fig. 3) e APX2014 (KELLEY *et al.*, 2016; LOGSDON *et al.*, 2018). Em células de câncer de próstata, observaram que o APX2009 foi mais potente em reduzir a proliferação celular e os níveis de Survivina/BIRC5, comparado ao inibidor APX3330 (MCILWAIN *et al.*, 2018). O inibidor APX2009 também induziu a parada de ciclo celular e

reduziu a atividade de NF- κ B nesse tipo tumoral. Resultados similares foram encontrados em células tumorais de bexiga, sugerindo que APX2009 seja mais potente em reduzir a proliferação celular (FISHEL *et al.*, 2019).

Figura 3- Inibidores do domínio redox da proteína APE1.



Legenda: (A) Estrutura química do inibidor da porção redox da proteína APE1, E3330. (B) Estrutura química do inibidor APX2009, que também atua na porção redox da proteína APE1.

Fonte: Sigma, 2024.

Em 2024, o grupo dos autores Fishel e Kelley novamente desenvolveram novos inibidores da função redox de APE1, sendo esses, análogos mais potentes de APX3330, chamados de APX2044, APX2051 e APX2053 (GAMPALA *et al.*, 2024). Esses inibidores também foram capazes de diminuir a atividade transcricional de NF- κ B, STAT3 e HIF-1 α , fatores regulados por APE1 em linhagem de câncer de pâncreas.

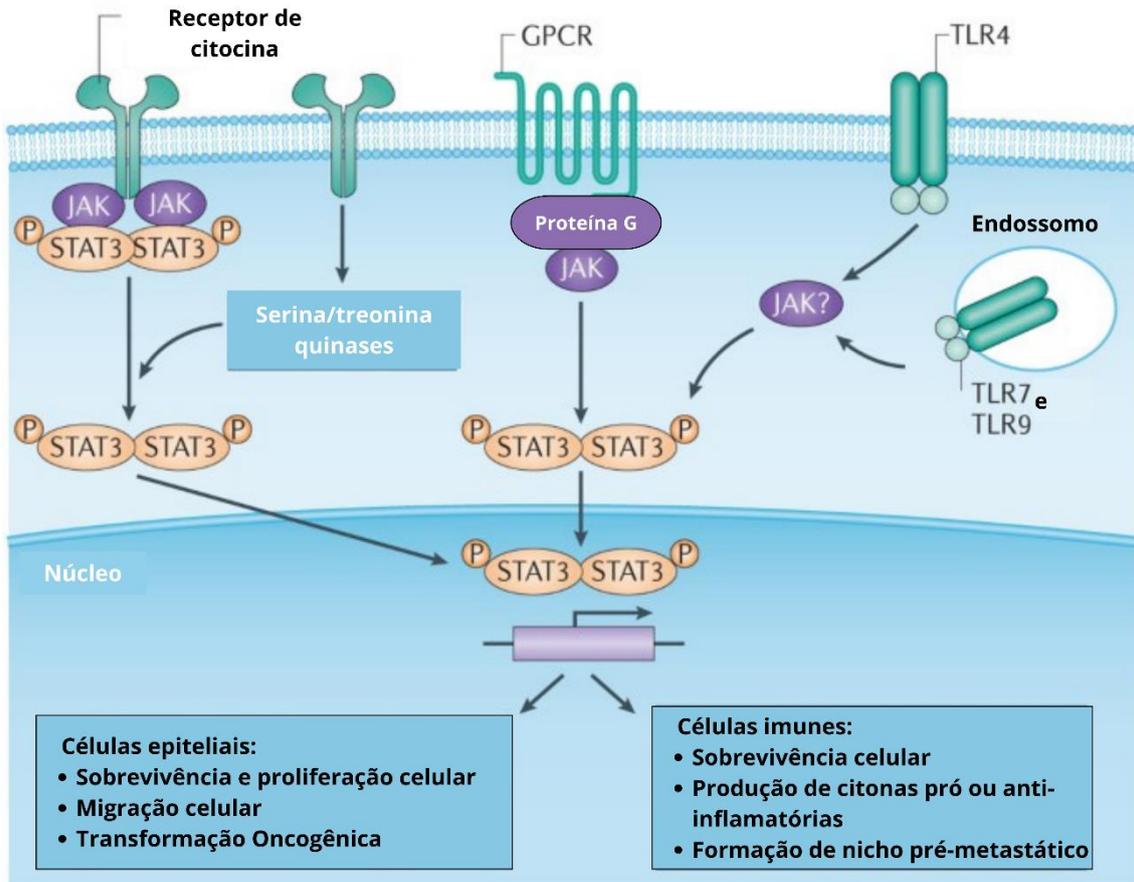
Apesar dos inibidores redox de APE1 se mostrarem promissores contra diversos tipos tumorais, somente dois estudos investigaram o papel da função redox de APE1 em modelos de câncer de mama, incluindo um estudo publicado pelo nosso grupo recentemente (GUERREIRO *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2024a).

1.7. Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3)

A proteína STAT3 é elencada como um dos principais fatores de transcrição associados ao câncer e é descrita sendo coativada pela função redox de APE1. O gene de *STAT3* está localizado no cromossomo 17q21.2, formado por 75245 bases, possui 51 transcritos e 24 exons. Em situações fisiológicas, ela é capaz de favorecer processos como proliferação e sobrevivência celular. STAT3 é uma proteína da família STAT que contém como membros STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Essa proteína participa da via JAK/STAT, a qual é

ativada por citocinas, proteínas oncogênicas, fatores de crescimento e também pode ser ativada por receptores associados à proteína G ou do tipo *Toll* (*Toll like receptors*) (Fig. 4). A Interleucina 6 (IL-6) é uma das principais citocinas que se liga aos receptores, ativando as proteínas *Janus kinases* (JAKs), as quais por sua vez, têm a função de fosforilar STAT3 em resíduos de tirosina (Tyr-705) e/ou serina (Ser-727), sendo esse último responsável por maximizar atividade transcricional deste fator. Ao ser fosforilada, STAT3 se torna ativa e forma homodímeros através de interações entre os domínios de homologia Src 2 (SH2) (MA; QIN; LI, 2020). Ao se dimerizar, STAT3 se desloca do citoplasma para o núcleo, onde irá reconhecer a sequência consenso 5'-TTCN3/4GAA-3' (SEIDEL *et al.*, 1995), através do seu domínio de ligação ao DNA e assim regular o processo de transcrição de genes como *FOS*, *MCL-1* e *AKT* (CARPENTER; LO, 2014). Além disso, STAT3 tem sua atividade regulada negativamente, por inibidores endógenos como o SOCS (do inglês *Suppressors of Cytokine Signaling*), PIAS (do inglês *Protein Inhibitors of Activated STATs*) e as PTPs (do inglês *protein tyrosine phosphatases*) (QIN *et al.*, 2020).

Figura 4-Via de sinalização de STAT3.



Nature Reviews | Cancer

Legenda: A via JAK/STAT é ativada por citocinas que ao se ligarem aos receptores, levam a fosforilação das proteínas JAK. As proteínas JAK fosforilam STAT3, que se dimeriza e se transloca para o núcleo. Neste compartimento celular, STAT3 irá se ligar ao promotor de genes alvos associados às vias de sobrevivência, proliferação, produção de citocinas, iniciação e progressão tumoral. STAT3 também pode ser ativado através de receptores associados a proteína G e *Toll-like*.

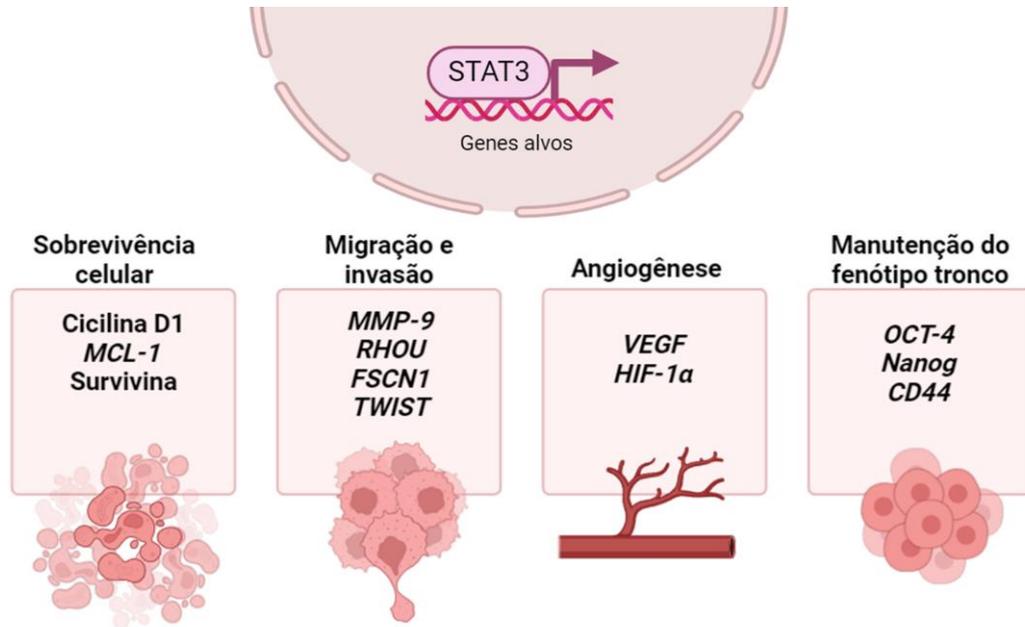
Fonte: Modificado de Yu *et al.* 2014 (Yu *et al.* 2014).

1.8. STAT3 no Câncer

Apesar de estar ativo e funcional fisiologicamente, STAT3 é um oncogene, o qual em tumores está superexpresso e contribui para o processo de progressão e agressividade do câncer (TOLOMEO; CASCIO, 2021). Através do seu papel como regulador transcricional, STAT3 ativa vias essenciais para o câncer (Fig. 5), como proliferação e sobrevivência celular, regulando positivamente genes como *MCL-1*, *BCL-2* e *BIRC-5* (survivina). Além de angiogênese, que regula positivamente *VEGF* e, processos importantes para a cascata metastática, como invasão, através do aumento da expressão de metaloproteinases (MMP)

como *MMP-1*, *2*, *3* e *9*, e migração, também aumentando a expressão de *FSCN1* (Fascina 1) e *RHOA*. Além de elevar os níveis de *TWIST* e *ZEB1*, proteínas envolvidas no processo de transição epitélio-mesenquimal (CARPENTER; LO, 2014).

Figura 5-Processos celulares relevantes para o câncer regulados por STAT3.



Legenda: STAT3 regula genes que participam de processos essenciais para a manutenção e progressão tumoral, como sobrevivência celular, angiogênese, manutenção do fenótipo tronco e processos de agressividade, como migração e invasão.

Fonte: A autora, 2024.

Guan *et al.*, demonstraram que STAT3 está presente em altos níveis em amostras de pacientes com câncer gástrico, comparado a amostras não tumorais, e pacientes com alta expressão de STAT3 exibem pior sobrevida global. Além disso, em linhagens celulares de câncer gástrico, a inibição de STAT3 com XYA-2 reduz significativamente a viabilidade, proliferação e migração celular (GUAN *et al.*, 2023). Já em câncer colorretal, foi demonstrado que a inibição de STAT3 com Stattic, ou seu silenciamento, sensibiliza linhagens celulares ao tratamento com CT/RT (quimiorradioterapia), sugerindo um papel importante de STAT3 na resistência a tratamentos (SPITZNER *et al.*, 2014).

Em outro modelo celular, foi visto que o uso de Astaxantina é capaz de reduzir a proliferação, migração e invasão celular, e induzir apoptose em linhagem de câncer de próstata, através da redução da expressão de STAT3 a nível de mRNA e proteína (SUN *et al.*, 2020).

STAT3 também está altamente expresso no câncer de mama, principalmente nos tumores classificados como triplo negativo, e exibe papel essencial na iniciação e progressão

da doença. Khaki-khatibi *et al* mostraram que o tratamento de células ZR-75-1 de câncer de mama com o inibidor Stattic, reduz a viabilidade celular e induz apoptose. E em combinação com o quimioterápico doxorrubicina, esse efeito foi ainda maior e sinérgico (KHAKI-KHATIBI *et al.*, 2019).

Outro estudo sugeriu o papel de STAT3 na manutenção do fenótipo tronco de células tumorais de mama. Células de câncer de mama induzidas a resistência à doxorrubicina exibiram maiores níveis de STAT3 fosforilado e aumento da expressão de OCT-4 e c-Myc, além do aumento da formação de mamosferas. Em contrapartida, a inibição de STAT3 com WP1066, reduziu os níveis de OCT-4 e c-Myc, além de sensibilizar as células resistentes ao tratamento com doxorrubicina (CHENG *et al.*, 2018).

Além disso, o inibidor 6Br-6^a reduz os níveis de STAT3 fosforilado das linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231, levando a uma diminuição na viabilidade e proliferação celular, e induzindo essas células à apoptose (Liu *et al.* 2020).

1.9. Inibidores de STAT3

Assim como APE1, STAT3 é elencado como um importante alvo para o tratamento do câncer, devido a seu papel nas diferentes vias envolvidas na progressão tumoral. A inibição da via de STAT3 pode ser tanto direta, através da inibição da sua fosforilação, ou interação no domínio SH2, quanto indireta através de inibidores de JAKs, IL-6 e outros componentes da via.

Kim *et al.* demonstraram que o inibidor de JAK2, o Ruxolitinibe é capaz de diminuir os níveis de fosforilação de STAT3 de células de câncer de mama MCF-7 resistentes a tamoxifeno, além de diminuir a proliferação e migração celular (KIM *et al.*, 2019).

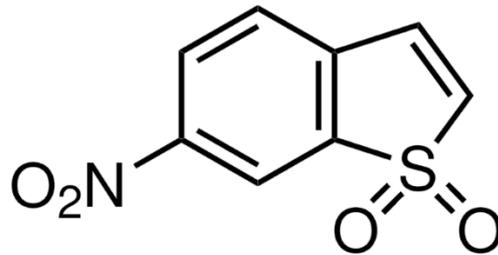
Já para a inibição direta de STAT3, o composto LLL-3 inibe STAT3 através do domínio SH-2, e foi capaz de reduzir a viabilidade celular de diferentes linhagens de câncer como K562 (leucemia mieloide crônica) e DU-125 (próstata) (MENCALHA *et al.*, 2010).

Stattic (Fig. 6) é um dos inibidores mais utilizados e mais recomendados por atuar em várias etapas da sinalização, sendo capaz de inibir a fosforilação, a dimerização e translocação de STAT3 para o núcleo, impedindo sua atividade de regular a transcrição (SCHUST *et al.*, 2006).

Além de compostos químicos, também existem moléculas oriundas de produtos naturais que atuam sobre várias vias, inclusive inibindo a via de STAT3, como a curcumina, a qual leva a redução dos níveis de STAT3 fosforilado (THILAKASIRI *et al.*, 2021). Além disso, alguns inibidores já se encontram em estudos de fase clínica, como IMX-110 (NCT03382340),

AZD9150 (NCT02417753; NCT01839604), Napabucasin (NCT01830621) e OPB-31121 (NCT00955812; NCT01406574; NCT01029509) (ORLOVA *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2021; DINAKAR *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022).

Figura 6- Inibidor seletivo de STAT3.



Legenda: Estrutura química do Stattic, inibidor seletivo de STAT3, que atua impedindo sua ativação por fosforilação, dimerização e translocação para o núcleo.

Fonte: Sigma, 2024.

1.10. A associação entre APE1 e STAT3

A proteína APE1 é necessária para que ocorra a ligação de STAT3 ao DNA, permitindo assim que STAT3 realize seu papel transcricional (RAY *et al.*, 2010). Entretanto, foi demonstrado primeiramente em modelos de câncer de pâncreas, que especificamente a porção redox de APE1 regula o fator de transcrição STAT3. Cardoso *et al.* 2012 demonstraram que a superexpressão de APE1 aumenta a atividade transcricional de STAT3, e ainda que a inibição do domínio redox de APE1 com E3330 diminui a ligação de STAT3 ao DNA (CARDOSO *et al.*, 2012). Apesar de APE1 regular a atividade de STAT3, os estudos sugerem que essa proteína não provoca alterações na expressão e fosforilação de STAT3 (CASTON *et al.*, 2021).

Diversos estudos mostram que a combinação de dois inibidores pode ser mais eficaz para terapias antitumorais. Um estudo identificou que a inibição tanto de APE1 quanto de STAT3 exibe um efeito sinérgico e mais eficaz em diminuir a viabilidade e aumentar apoptose em diferentes linhagens de câncer incluindo bexiga, cólon e pâncreas, sendo uma abordagem importante para linhagens que se mostram mais resistentes aos tratamentos (CASTON *et al.*, 2021). Embora os inibidores de APE1 e STAT3 tenham demonstrado efeito sinérgico contra alguns tipos de câncer, a relação entre essas proteínas ainda não foi elucidada em processos de sobrevivência e agressividade celular no câncer de mama. Com isso, esse trabalho propõe investigar a inter-relação entre APE1 e STAT3 em linhagens de câncer de mama com diferentes

níveis de agressividade, na regulação da proliferação, morte e agressividade celular e avaliar o efeito antitumoral da dupla-inibição de APE1 e STAT3.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral:

Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na inter-relação entre APE1 e STAT3, e a importância dessa sinalização para aquisição de características relacionadas ao fenótipo maligno, em modelos celulares de câncer de mama.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Avaliar a influência de APE1 e STAT3 na viabilidade celular, morte celular e no potencial de formação de colônia, invasão e migração de linhagens celulares de câncer de mama, utilizando inibidores específicos de cada via;
- b) Avaliar a atividade transcricional de STAT3 através do ensaio de *gene reporter*, utilizando inibidores específicos de cada via;
- c) Mensurar os níveis de expressão gênica de genes alvos de STAT3, que participem dos processos de proliferação, migração e invasão, em linhagens celulares de câncer de mama, utilizando inibidores específicos de cada via;
- d) Mensurar os níveis de fosforilação de STAT3 em linhagens e pacientes com câncer de mama utilizando bancos de dados como *Linkedomics* e *The Cancer Proteome Atlas* (TCPA), correlacionar com dados clínicos e moleculares, em que os níveis de fosforilação serão relacionados à genes de proliferação, migração e invasão.

3. METODOLOGIA:

3.1. Cultura celular

As linhagens celulares MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) e MCF-7 (HTB22, ATCC) foram utilizadas como modelos de câncer de mama que exibem diferentes graus de malignidade. A linhagem MCF-7 se assemelha ao subtipo Luminal A, pela presença dos receptores ER e PR, e ausência da expressão de HER-2. Além disso, possui fenótipo bem diferenciado e é considerada como menos agressiva comparada a MDA-MB-231. A MDA-MB-231 é uma linhagem que se assemelha ao subtipo Basal de câncer de mama, e possui ausência da expressão dos receptores ER, PR e HER-2, sendo considerada como Triplo Negativa. Ela possui fenótipo pouco diferenciado e é considerada uma linhagem com altos níveis de agressividade. A linhagem celular HEK293-T (CRL-3216, ATCC), é classificada como uma célula não tumoral de rim embrionário e foi utilizada como modelo para os ensaios de *gene reporter*, pela facilidade de transfecção.

As células foram cultivadas em frascos de cultura com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (LifeTechnologies, Thermo Fisher, cat# 12800017), para MCF-7 e HEK293-T, ou *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) (LifeTechnologies, Thermo Fisher, cat# 31800105), para MDA-MB-231, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion, cat# FB0010S) e 1% de penicilina/estreptomicina (LifeTechnologies, Thermo Fisher, cat# 15240062). Os repiques foram realizados a cada 72 h ou quando a cultura apresentou confluência de aproximadamente 80-90%. As culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. As linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular, coordenado pela professora Thereza Christina Barja-Fidalgo.

3.2. Tratamento com Inibidores

Com o objetivo de inibir o domínio redox de APE1, foi utilizado o inibidor APX2009 (Sigma-Aldrich, cat# SML1887), e para a inibição da atividade de STAT3, foi utilizado o inibidor Stattic (Sigma-Aldrich, cat# S7947). O solvente orgânico DMSO (Dimetilsulfóxido,

MERCK, cat# 102952) foi utilizado como veículo de diluição dos inibidores. As concentrações utilizadas para o inibidor APX2009 foram 0,16, 0,8, 4, 10, 20 e 50 μM e para o inibidor Stattic foram 0,3, 0,6, 6, 10, 30, 60 e 90 μM por 24 horas.

3.3. Ensaio de viabilidade celular por WST-1

A viabilidade celular em resposta aos tratamentos foi determinada através do ensaio de WST-1 (Roche, cat# 5015944001). WST-1 consiste em um ensaio colorimétrico baseado na capacidade de células converterem o sal Tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulphonate) em corante Fomazan, gerando coloração amarela. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial Succinato-tetrazolium redutase e somente ocorre em células viáveis. Com isso, através de variações na coloração do meio contendo WST-1, é possível inferir a proporção de células viáveis comparando as diferentes condições de tratamento. Para os ensaios de WST-1, as células foram semeadas em 150 μl em placas de 96 poços a uma densidade de 7×10^3 células/ cm^2 para a linhagem MDA-MB-231, 12×10^3 células/ cm^2 para a MCF-7, e 1×10^4 células/ cm^2 para a HEK-293T. As células foram tratadas com os respectivos compostos, citados anteriormente. Após os períodos dos tratamentos, foram adicionados 2 μl de WST-1 diluído em 8 μl de meio em cada poço e, em seguida, as placas foram mantidas durante 1 h a 37°C em estufa umidificada contendo 5% CO_2 . A quantificação das variações colorimétricas foi realizada em leitor de Elisa (Polaris) utilizando o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. O DMSO foi utilizado como controle para os tratamentos. A porcentagem de células viáveis, após o período de 24h de tratamento, foi determinada pela razão da absorbância obtida das culturas tratadas em relação às não tratadas.

3.4. Cálculo do IC50

O IC50, concentração necessária para que o tratamento leve a uma redução de 50% da viabilidade celular, foi calculado de acordo com as curvas de concentração obtidas pelo ensaio de viabilidade WST-1. O cálculo foi baseado em uma curva de regressão sigmoidal através do *software GraphPad Prism 8.0.2*.

3.5. Cálculo do Índice de combinação

O Índice de combinação foi calculado com o programa Compusyn (*Version 1.0*), baseado nos efeitos que os compostos provocaram isoladamente e combinados, em cada linhagem. Com valores iguais a 1 o efeito é considerado aditivo, menor que 1 é sinergismo, e maior que 1 é considerado antagonismo. Esse software também gera o isoblograma das combinações, neste gráfico, a linha formada na diagonal representa o efeito aditivo dos compostos, acima dessa linha, o efeito da combinação é caracterizado como antagonismo, e abaixo da linha, classificado como sinergismo (CHOU, 2010).

3.6. Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem

O ensaio de formação de colônia foi realizado para analisar os efeitos dos inibidores APX2009 e Stattic, isoladamente ou combinados, sobre a capacidade de formar colônias das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Para isso, as células foram semeadas em baixa densidade sendo 4×10^3 células para a linhagem MDA-MB-231 e 8×10^3 células para a linhagem MCF-7, em placas de 6 poços. Após 4h, para permitir a aderência das células, elas foram tratadas com os inibidores ou DMSO, como controle. Após 7 dias de cultivo e tratamento, as células foram fixadas com 2 ml de etanol absoluto por 10 minutos e coradas com 1 ml de cristal violeta (0,5% de cristal violeta em 20% de etanol) por 10 minutos. Foram feitas 3 lavagens com água destilada para retirar o excesso de corante. Após esse processo, as colônias foram fotografadas com câmera de digital (Motorola Moto One Action) e, em seguida, eluídas com 1 ml de ácido acético (10% em água) por 15 minutos para quantificação colorimétrica da solubilização do cristal violeta (DE SOUZA *et al.*, 2013). Deste eluído, 150 μ l de cada amostra foram transferidos para placa de 96 poços, em triplicata e as absorbâncias foram medidas em 595nm no leitor ELISA (Polaris). A quantificação foi feita através da razão da absorbância obtida das culturas tratadas com os inibidores em relação às tratadas com o diluente DMSO.

3.7. Ensaio de Migração por *Wound Healing*

Para analisar os efeitos dos inibidores sobre o potencial migratório das células de câncer de mama, foi realizado o ensaio de migração por *Wound Healing*, o qual se baseia na remoção mecânica de células da região central de uma área confluenta utilizando uma ponteira e avaliação do fechamento da área formada. Para esse experimento foram semeadas 6×10^4 células de ambas as linhagens em placas de 6 poços. Após atingir cerca de 90% de confluência, foram feitos dois riscos, perpendiculares e em formato de cruz, para remoção da monocamada de células, para isso foi utilizada a ponteira de 200 μl para a MDA-MB-231 e a ponteira de 10 μl para a MCF-7. O meio de cultura foi retirado, as culturas lavadas com PBS, para remoção das células removidas da placa, e repostos um meio novo com 1% de soro fetal bovino para reduzir a proliferação celular. Neste meio de cultura foram adicionados os inibidores ou o veículo/diluyente correspondente. Os riscos foram fotografados com câmera digital (Motorola Moto One Action), no aumento de 4 e 10 vezes, após procedimento de remoção das células (considerado tempo 0 h) e após 24 h. Para quantificar a migração celular, as áreas livres foram medidas (em pixel), utilizando o tempo 0 h como referência, através do software Image J (Fiji).

3.8. Ensaio de Invasão celular por *Transwell-Matrigel*

O ensaio *Transwell-Matrigel*, foi utilizado para avaliar os efeitos dos inibidores sobre o potencial de invasão das células de câncer de mama. Para isso, câmaras de *Transwell* (Corning) com filtros de policarbonato de 12 mm de diâmetro e poros de 8 μm foram umedecidas com 50 μl de meio de cultura por 4 min, e em seguida foram adicionados 50 μl de Matrigel (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat# CLS354234) 10 vezes e 20 vezes diluído em meio de cultura a 4°C para a linhagem MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. O Matrigel foi utilizado para simulação da matriz extracelular. Para gelificação da matriz foi feita uma incubação a 37 °C por 4 horas para os experimentos onde era utilizada a MDA-MB-231 e *overnight* para os realizados com a MCF-7. Após esse período, as células foram semeadas na porção superior da câmara de *Transwell* em meio contendo 1% de SFB e os respectivos tratamentos. Foram utilizadas 2×10^4 células para a MDA-MB-231 e 20×10^4 células para a MCF-7. Ainda, a porção inferior do

Transwell foi preenchida com meio contendo 10% de SFB para criar um gradiente de concentração de nutrientes, e causar a quimioatração das células.

Após 24 horas de cultura, os meios foram retirados e as células foram fixadas com etanol absoluto por 10 minutos, seguido de coloração com cristal violeta (cristal violeta 0,5% em etanol 20%) por novamente 10 minutos. Foram feitas 3 lavagens com água destilada para retirar o excesso de corante. As células que não atravessaram o Matrigel e a membrana do *Transwell* foram retiradas da porção superior com o auxílio de uma haste flexível com pontas de algodão.

As células com capacidade de invasão foram fotografadas com o microscópio óptico invertido Olympus IX71 (Tóquio, Japão) equipado com fluorescência, e contadas com o software Image J (Fiji).

3.9. Ensaios de morte celular

3.9.1. Marcação de células com Annexin V-FITC e 7-AAD

Foi utilizada a citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences; BD Accuri C6 Flow Cytometer) para analisar se os inibidores utilizados levam as células de câncer de mama à morte celular e avaliar qual o tipo de morte causada por estes tratamentos. Para isso, as células foram semeadas em placas de 6 poços, sendo utilizadas 7×10^3 células/cm² para a MDA-MB-231 e 12×10^3 células/cm² para a MCF-7. Ao atingirem 70% de confluência as células foram tratadas com os inibidores e o veículo, e após 24 horas foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Cerca de 10^5 células foram colhidas e incubadas com 2 µl de Anexina V-FITC (Thermo, cat#A13199) e 2 µl de 7-AAD (Thermo, cat#A1310) por 10 minutos ao abrigo da luz. A Staurosporina (Sigma-Aldrich, cat#S6942) solução a 1 mM foi utilizada como controle positivo para apoptose, 1 µl para MDA-MB-231 e 2 µL para MCF-7, e Triton™ X-100 0,1% (Sigma-Aldrich, cat#T8787) como controle positivo para necrose. As células foram analisadas por citometria de fluxo, onde foram coletados 10.000 eventos, os softwares utilizados para análise foram Floreada.io (<https://floreada.io>), BD CellQuest Pro e BD CSampler.

3.9.2. Ensaio de citotoxicidade por LDH (LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay)

O LDH-Glo™ Cytotoxicity Kit (Promega) Assay é um ensaio baseado na quantificação de luminescência, pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura após dano à membrana plasmática, indicativo de células em necrose. Foram semeadas 7×10^3 células/cm² para a MDA-MB-231 e 12×10^3 células/cm² para a MCF-7 em placas de 96 poços, e ao atingir 70% de confluência, foram tratadas com os inibidores e o veículo. O Triton™ X-100 0,2% foi utilizado como controle positivo. A luminescência foi medida pelo leitor de placas multimodo EnVision XCite 2105 (Perkin Elmer).

3.10. **Ensaio de gene repórter**

3.10.1. Expansão e extração de plasmídeos

O plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc (Addgene, #8688) (Fig. 7) foi utilizado para analisar a atividade transcricional de STAT3, visto que o mesmo apresenta 4 sítios de ligação para STAT3 retirados do promotor do gene alvo *FOS*. As bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram recebidas na forma de *Stab* e cultivadas em placa com meio LB + ágar. Após a visualização de colônias, uma colônia foi selecionada, e a mesma foi expandida em meio LB, suplementado com antibiótico ampicilina, durante 12 h a 37°C em agitadora tipo Shaker (Cienlab) com a rotação 150 rpm. Para obtenção do DNA plasmidial, o kit PureYield™ Plasmid Midiprep System foi utilizado. Para confirmação da presença do plasmídeo de interesse, foi realizada a linearização do plasmídeo com as enzimas KpnI e PvuII, além de uma dupla digestão com essas enzimas de restrição, seguida de eletroforese em gel de agarose 0,8%, além de qPCR, com primers específicos para três regiões do plasmídeo (Tabela 1).

3.10.2. Eletroforese em gel de agarose

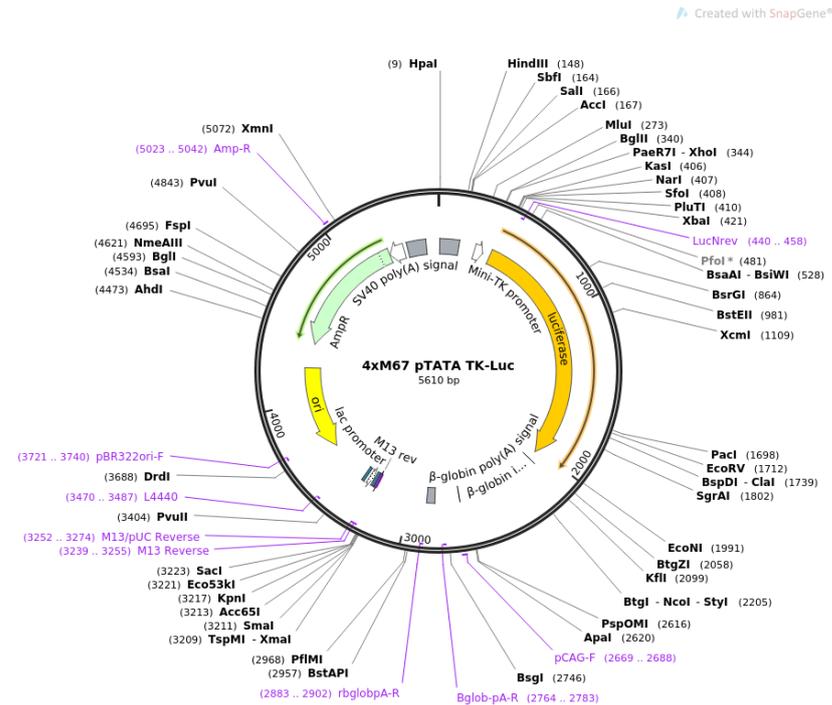
Para análise dos plasmídeos, foi feita uma mistura contendo 2 µL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, Glicerol 30%), 0,5 µL de GELRED (Biotium, Inc., cat#41003) e 5 µL das amostras. Para determinação do tamanho, 5 µL de padrão

de peso molecular Lambda/Hind III (Thermo, cat#AM7720), foi aplicada no gel de agarose 1% em tampão TAE [Tris-Acetato 40 mM e EDTA 1 mM pH (potencial hidrogeniônico) 8,0]. Após a migração das amostras no gel a 90V, foi utilizado o transiluminador (Dual LED Blue/White Light Transilluminator, KASVI) para obtenção das imagens dos padrões de migração no gel. Foram capturadas imagens desse gel utilizando câmera digital (Motorola Moto One Action).

3.10.3. Transfecção e quantificação da Luminescência

As células foram cultivadas em uma placa de 96 poços, sendo utilizadas 25×10^3 células/cm² para a MCF-7 e 26×10^3 células para a HEK293-T. Após 24 horas de cultivo, as células foram co-transfectadas com o plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc (Addgene, #8688) e pRL-TK (Promega, E224A) com auxílio do reagente de transfecção lipofectamina 3000 (Invitrogen, cat#L3000008) de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, um plasmídeo contendo GFP foi utilizado para verificar a eficiência da transfecção por microscopia de fluorescência. Após 24 horas de transfecção foram realizados os tratamentos com inibidores e com IL-6 (Sigma-Aldrich, cat#H7416), controle positivo para ativação de STAT3. Novamente após 24 horas, foi feita a quantificação da luminescência para análise da atividade de STAT3. Para essa quantificação foi utilizado o kit Dual-Glo® Luciferase Assay System seguindo as instruções do fabricante, no qual o substrato foi utilizado para gerar luminescência, através da luciferase. O plasmídeo pRL-TK foi utilizado como controle interno da reação. A luminescência foi medida pelo leitor de placas multimodo EnVision XCite 2105 (Perkin Elmer). Os valores obtidos foram utilizados para calcular a razão entre a luminescência emitida pelo plasmídeo *reporter* e o plasmídeo controle, contendo renila para normalização.

Figura 7- Esquema da estrutura do plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc.



Legenda: Estrutura do plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc, o qual contém 4 sítios de ligação para STAT3, seguido da sequência de luciferase.

Fonte: Addgene, 2024.

3.11. Análise dos níveis de mRNA

3.11.1. Extração de RNA

A extração de ácido ribonucleico (RNA) foi realizada para mensuração da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) por RT-qPCR. Inicialmente, o meio de cultivo foi descartado e as culturas foram lavadas 2 vezes com PBS. Após o descarte do PBS, foram adicionados 500 µl do reagente TRIzol Reagent® (Invitrogen), o qual permitiu a lise das células aderidas. Em seguida, o TRIzol foi transferido para tubos 1,5 mL e submetido à centrifugação por 10 minutos, a 13.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C (Centrífuga Thermo, Modelo Fresco17), para remoção de debris celulares. Após essa etapa, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, onde adicionou-se 100 µl de clorofórmio (Merck), com posterior centrifugação por 15 minutos, 13.000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e a esta foi adicionado 250 µl de Isopropanol (Sigma-Aldrich, cat#288306). O material foi novamente centrifugado a 13.000 rpm a 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500 µl de etanol 80%. Por fim, seguiu-se para

centrifugação a 13.000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi reconstituído com água tratada com Dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC, Sigma-Aldrich cat#693520). Para quantificação e avaliação de pureza, foi realizada espectrofotometria com o aparelho NanoVue (G&E healthcare), sendo utilizado 5 µl de água tratada com 0,1 % de DEPC para o branco e 2 µL da amostra. A quantificação foi obtida no $\lambda=260\text{nm}$, e a pureza com as razões $\lambda=260/230$ e $\lambda=260/280$, para detecção de solventes e proteínas, respectivamente. As amostras foram consideradas com qualidade para seguir com os demais experimentos quando os valores foram > 1.5 para razão $\lambda=260/230$, e > 1.8 para razão $\lambda=260/280$. Em seguida o RNA foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.11.2. Síntese de cDNA (DNA complementar)

Para a avaliação dos níveis de mRNA, os RNAs foram utilizados para a síntese de DNA complementar (cDNA). Cerca de 2 µg de RNA foram tratados com DNase (DNase I Amplification Grade Kit, Thermo), para remoção de resquícios de DNA. Para tal, utilizou-se 1 U da enzima DNase e 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, ajustando o volume final da reação com Água-DEPC para 10 µL, com posterior incubação a 24°C por 15 min. A reação foi finalizada com a inativação da DNase, adicionando 1 µL de *Stop Solution* e incubação por 10 min a 65°C. Para etapa de síntese de cDNA, foram adicionados ao volume da reação da etapa de DNase, 1 µl de OligodT (500 µg/mL, Thermo, cat# 18418020) e 1 µl dNTP (N= A, T, C e G, 10 mM de cada, Thermo cat# 18427089) para a fase de anelamento, com incubação por 5 minutos a 65°C. Após o anelamento, foi adicionado 0,5 µl de SuperScript IV Reverse Transcriptase 200 U/µl (RT, Thermo), 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNaseOUT (Thermo, cat#10777019) e 4 µl de 5X RT buffer, com incubação por 20 minutos a 55°C seguida de 10 minutos a 80°C. As incubações foram realizadas no termociclador SimpliAmpli Themocycler (Applied Biosystems).

3.11.3. Desenho de iniciadores (primers)

Os primers (tabela 1) foram elaborados *in silico*, baseando-se nas sequências de nucleotídeos da espécie estudada. Foi realizada uma pesquisa nos bancos de dados que fornecem as sequências de cada RNA ou DNA alvo de estudo (NCBI GENE). Os *primers* foram

sintetizados em pares, sendo um *forward* e outro *reverse*. Foram selecionados primers de 18 a 23 pares de bases (bp), localizados preferencialmente em éxons adjacentes. Foram avaliados temperatura de *melt* (temperatura entre 55 a 60°C), *harpin* ($T_m > 37^\circ\text{C}$ e $\Delta G > 0.20$ kcal/mol), *self-dimer*, *hetero-dimer* ($\Delta G > -10$ kcal/mol) dos *primers*, através da ferramenta *Oligoanalyzer* da IDT. Em seguida estes primers foram utilizados para análise de nível de mRNA por PCR em tempo real (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction RT-qPCR*).

Tabela 1-Sequências de primers utilizados para RT-qPCR.

PRIMER	SEQUÊNCIA FORWARD 5'-3'	SEQUÊNCIA REVERSA 5'-3'	CICLAGEM
B2M	AGATGAGTATGCCTGCCGTG	ACATGTCTCGATCCCCTTAACCT	1
STAT3*	AGGCGTCACTTTCCTTGGG	TGTATGGTCCACGGACTGG	1
APEX1	ATACTGGTCAGCTCCTTCGG	GCATAGGCGATGAGGAGCA	1
MKI67*	ATCGTCCCAGTGGAAGAGTT	GACCCCGCTCCTTTTGATAG	1
FOS*	GCTGACTGATACTCCAAGCG	GAGCTGCCAGGATGAACTCTAG	1
FSCN1*	CCTCCAAGAAGAATGGGCAG	CTGGAAGACGTCATAGCTGG	1
RHOA*	CATCCCACTGACTGTATGGC	CTTTCCTCCGCATAGCACTT	1
MMP9	CGACCTCAAGTGGCACCA	TAGTTGGCGGTGGTGGCG	2
BIRC5	CCGCATCTCTACATTCAAGAACTG	AAGTCTGGCTCGTTCTCAGT	1
CCND1	CTGGTGAACAAGCTCAAGT	TTGCGGATGATCTGTTTGT	2
SNAIL (SNAIL)	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	AGATGAGCATTGGCAGCGAG	2
CDH1 (E-CAD)	AGAGGACCAGGACTTTGACTTG	TTCATCGGGATTGGCAGGG	2
CDH2 (N-CAD)	ACCAGGACTATGACTTCGAGCC	GGCGTGGATGGGTCTTTCA	2
VIMENTINA (VIM)	GCCAGATGCGTGAAATGGAA	CTGTCCATCTCTAGTTTCAACCG	2
FIBRONECTINA (FN1)	CACCTTGAATGACAATGCTCGGAG	GACCCAGGCTTCTCATACTTGATG	2
LUC_4XM67TKLUC*	CGACAAGGATATGGGCTCACTG	GTCAATCAAGGCGTTGGTCG	3
AMP_4XM67TKLUC*	TCAAGGCGAGTTACATGATCCC	CAGTGCTGCCATAACCATGA	3
INSERT_4XM67TKLUC*	TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG	TGGACATCTGGATCATTACG GG	3

Legenda: *Primers elaborados pela autora, 1: primers com perfil de ciclagem 95°C por 30s, 60°C por 30s, 2: primers com perfil de ciclagem 95°C por 20s, 55°C por 30s, 72°C por 30s, 3: primers com perfil de ciclagem: 95°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 45s.

Fonte: A autora, 2024.

3.11.4. RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada a fim de avaliar quantitativamente as variações nos níveis de mRNA de *STAT3*, *APEX1* e genes relacionados aos processos de proliferação (*mKi67*), migração (*RHOA* e *FSCN1*) e invasão (*MMP9*), alvos de *STAT3*. Para isso, as amostras de cDNA foram diluídas cerca de 5 vezes e utilizadas para amplificação por qPCR utilizando o GoTaq Sybr PCR Master Mix (Promega). As reações das qPCRs foram realizadas em volumes finais de 10 µl contendo 0,5 µM de cada primer (Fow/Rev). As RT-qPCRs foram realizadas no termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen). As análises foram realizadas com auxílio do programa Rotor-Gene 6000 Series Software (Qiagen) e foram realizadas 40 ciclagens (95°C por 30s, 60°C por 30s ou 95°C por 20s, 55°C por 30s, 72°C por 30s). Os níveis de mRNA para os genes de interesse foram comparados entre os controles e os tratamentos a fim de mensurar os níveis de expressão dos genes nas células em cultivo. Os níveis de mRNA foram normalizados pelos níveis de Beta-2-Microglobulina (*B2M*), o qual foi utilizado como gene de referência. As quantificações foram determinadas através do cálculo de *Delta-delta Cycle threshold* ($\Delta\Delta CT$) (LIVAK; SCHMITTGEN; 2001).

3.12. **Análises *in silico***

Foram utilizados bancos de dados públicos de pacientes com câncer de mama para analisar os níveis de mRNA, proteína, fosforilação e características fenotípicas do câncer, como subtipo e grau tumoral. Os dados de pacientes com câncer de mama foram obtidos a partir do TCGA (The Cancer Genome Atlas Program), TCPA (The Cancer Proteome Atlas) e CPTAC (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium), nas coortes BRCA e *Breast invasive carcinoma prospective cohort*, respectivamente. As análises foram realizadas através de duas plataformas online: UCSC Xena (Goldman *et al.*, 2020) e LinkedOmics (Vasaikar *et al.*, 2018). Com essas plataformas, foi possível analisar os níveis de expressão gênica a nível de mRNA, proteína, nível de fosforilação pelo fosfoproteoma e, além disso, utilizar assinaturas gênicas. As assinaturas foram formadas por uma equação que envolve genes regulados positiva ou negativamente, representando a atividade do gene/proteína de interesse. A equação gerou um resultado e os pacientes foram agrupados em altos (*high*) e baixos (*low*) níveis da assinatura, de acordo com o quartil de 25 % (*low*) e de 75% (*high*). Para esse trabalho foi utilizada a assinatura

gênica relacionada a atividade redox da proteína APE1, correspondendo a equação: = *-ITGA1 -PRDX5 -SIPA1 -RAB3D* (SHAH *et al.*, 2017b), a assinatura gênica relacionada a atividade de STAT3, correspondendo a equação: = + *STAT3 + ELK3 +SNX7 +CAST +DTX3L + AIDA +CTDSP2 + NEDD9 +KLHDC8A +TWSG1 +KLHL7 +RPS6KA3 + C12orf32 +CAPNS1 +SYT11 +NEDD4 +PSMA7 +MYO1C +HMMR +SWAP70 +WIPF1 +SH3PXD2B +FLOT1 +TM4SF1 +SEPT6 +ITGB5 +SLC35F5 +SMS +ACPL2 +PLEKHG1 +STARD3NL +MATN2 +HERC5 +PSMA7 +RBBP8 +RGS3 + KIAA0494 +C5orf15 +ZMYM6 + TMEM35 +TPM4 +PL-5283 +RUNX2 +MESDC2 +SNORD118 +TMEM107 + BORCS8 + BORCS8-MEF2B +KIAA1143 +SNAP23 +FAM100B +TICAM2 +TMED7-TICAM2 +BRIP1 +RHOJ +HMG20B +ZDHHC5 +AFF1 +ZCCHC9 +PDGFC +NAMPT +QKI +C19orf53 +MRII +KDELR3 +ITGB1 +ITGB1BP1 +DENR +PSKH1 +IFT57 +NCAPH +PTPN1 +UBA6 +POLE3 +CEP152 +STAU1 +FRMD3 +BIRC2 +BACE2 +PALLD +AP1M1 +ITFG3 +AGXT2L2 +METTL1 +GATAD2A +GNG12 +PECI +NRM + KIAA1949+CTNNA1 +IGF2BP2 +NUP37 +SLC43A3 +SGMS2 +SNRPC +CDC6 +ARHGAP17 +AGFGI +GMPPA +BRCA1 +TMEM51 +TANC1 +C6orf145 +POLR2D +EXOSC9 +FAM119A +STK17A +ZNF101 +KCTD5 +TTC23 +SEC24A +ABHD11 +NAGA +TAPBP +DNM2 +ZNF747 +RPN2 +MAPK14 +RFC2 +DNAJC14 +ACLY +TMX1 +C1orf144+FZD1 +PTPN12 +BATF3 +ROD1 +SHQ1 +RIN3 +EIF4G2 +NAA38 +PRR11 +HAUS1 +MKI67IP +HNIL - FOXN3 -WIPF2 -ASB13 -WDR37 -USP31 -C2orf69 -KIAA1045 -GPRC5B - AKAP1 - PEBP1 - PEBP1P2 -RETSAT - FAMI79B -IKZF5 -SLC41A3 -ABCC5 -TBC1D4 -STOX2 - RICTOR -BAG1 -C16orf52 -BRWD1 -ZCCHC14 -C5orf41 -RAB15 -AGPAT3 - AKT3 -LCOR - ATXN7L3B - HIC2 - PID1 - MKRN1 - KIAA1467 -AUH - ANKRD40 - COX7C - BIN1 -DAP (TAN *et al.*, 2019). Além das assinaturas de proliferação e EMT, correspondendo respectivamente as equações: = +*BUB1B +CCNA2 +CCNB2 +FANCI +MELK +NCAPH +RRM2 +SKA3 +UBE2C +UBE2T* (STARMANS *et al.*, 2012) e = *ADAM12 + ADAMTS12 + ADAMTS2 + AEBP1 + ANGPTL2 + ANTXR1 - AP1G1 - ATP8B1 + AXL + BNC2 + CALD1 - CDH1 + CDH2 - CDS1 - CGN - CLDN4 + CMTM3 - CNOT1 + CNRIP1 + COL10A1 + COL1A1 + COL1A2 + COL3A1 + COL5A1 + COL5A2 + COL6A1 + COL6A2 + COL6A3 + COL8A1 - CTNND1 + DACT1 - DYNC1LI2 + EMP3 - ERBB3 - ESRP1 - ESRP2 - F11R + FAP + FBNI + FNI + FSTL1 - GALNT3 + GPC6 - GPR56 - GRHL2 + GYPC - HOOK1 + HTRA1 + INHBA - IRF6 + ITGA11 + LOXL2 + LRRC15 - MAP7 - MARVELD2 - MARVELD3 + MMP2 + MSRB3 - MYO5B + NAP1L3 + NID2 - OCLN + OLFML2B + PCOLCE + PDGFRB + PMP22 + POSTN - PRSS8 + SPARC - SPINT1 + SPOCK1 + SULF1 + SYT11 + THBS2 + VCAN + VIM + ZEB2* (MAK *et al.*, 2016).*

Para as análises foram considerados pacientes do sexo feminino e amostras de tumor primário. Além disso, foram feitas análises de correlação entre os níveis de fosforilação de STAT3 no resíduo Y705, com os níveis de proteína de *MMP9*, *FSCN1* e *RhoU*, relacionadas à migração e invasão celular, *MKi67*, *BIRC5* e *CCND1*, relacionadas à proliferação e sobrevivência celular. Além de *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *FNI* e *SNAI1*, relacionadas ao processo de TEM, e *APEXI* e *FOS*, relacionadas a múltiplas vias.

3.13. Análises Estatísticas

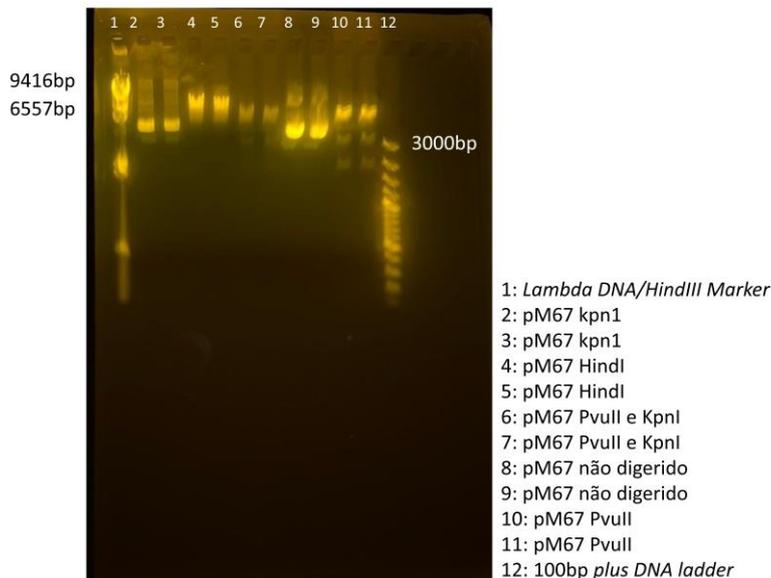
As análises comparativas entre dois grupos experimentais foram realizadas com o teste de Mann Whitney, e para três ou mais grupos experimentais utilizou-se o teste de Kruskal- Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, para experimentos não paramétricos. Para os experimentos que passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, para um tamanho de amostras pequeno, ou pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson para um $n > 100$, as análises foram realizadas com o teste t de Student para dois grupos experimentais e ANOVA para comparação de três ou mais grupos experimentais, seguido do pós-teste de Dunnett. Para análises de correlação, foi realizado o teste de normalidade, seguido da correlação de Spearman para dados não paramétricos e correlação de Pearson para dados paramétricos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos adotando o valor de $p < 0,05$. Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão de três a cinco experimentos individuais, em triplicatas.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da atividade transcricional de STAT3 em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

Para avaliar o funcionamento dos inibidores e se estes influenciam a atividade transcricional de STAT3, foi realizado o ensaio de gene *repórter*. Para isso, o plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc (Addgene, #8688) foi obtido comercialmente e a confirmação da especificidade foi feita pela dupla digestão com as enzimas de restrição PvuII e KpnI (Fig. 8). A confirmação também foi feita por qPCR (Fig. 9), indicada pela amplificação do trecho do DNA plasmidial que continha parte do gene da *ampicilina* e *luciferase*, além da amplificação de um trecho que inclui o inserto do promotor de *c-FOS*. Feita a confirmação, os experimentos foram realizados. A quantificação é baseada na luminescência, a qual é emitida pela transcrição da enzima luciferase, localizada logo após a sequência do alvo regulado por STAT3 no plasmídeo. Ou seja, ao estimular a transcrição de *c-FOS*, a luciferase também é transcrita e traduzida.

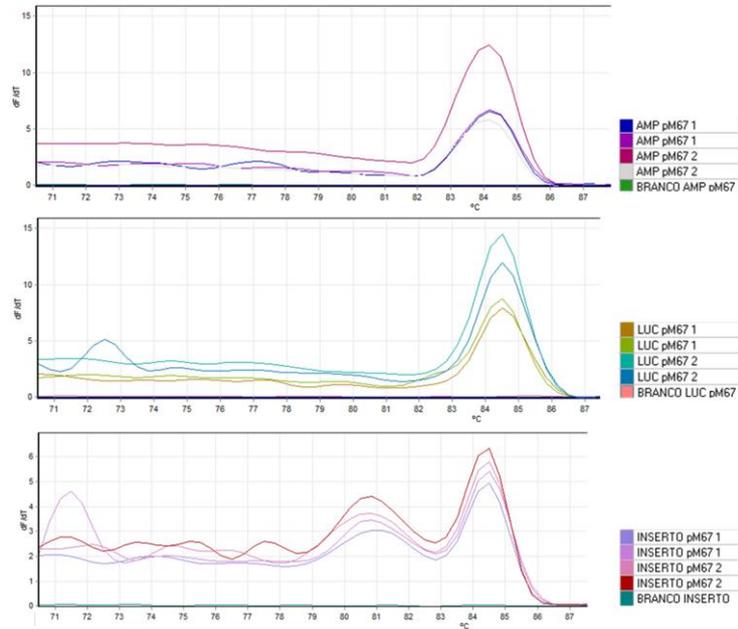
Figura 8-Perfil eletroforético do plasmídeo pM67 pTATA TK-Luc.



Legenda: Eletroforese do plasmídeo pM67 pTATA TK-Luc não digerido, após digestão simples com as enzimas de restrição KpnI, HindI e PvuII, e após dupla digestão com as enzimas de restrição PvuII e KpnI. Foram utilizados os marcadores de peso molecular *Lambda DNA/HindIII marker* e *100bp plus DNA ladder*.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 9- Curvas de melting dos primers utilizados para detecção da especificidade do plasmídeo 4X pM67 pTATA TK-Luc.

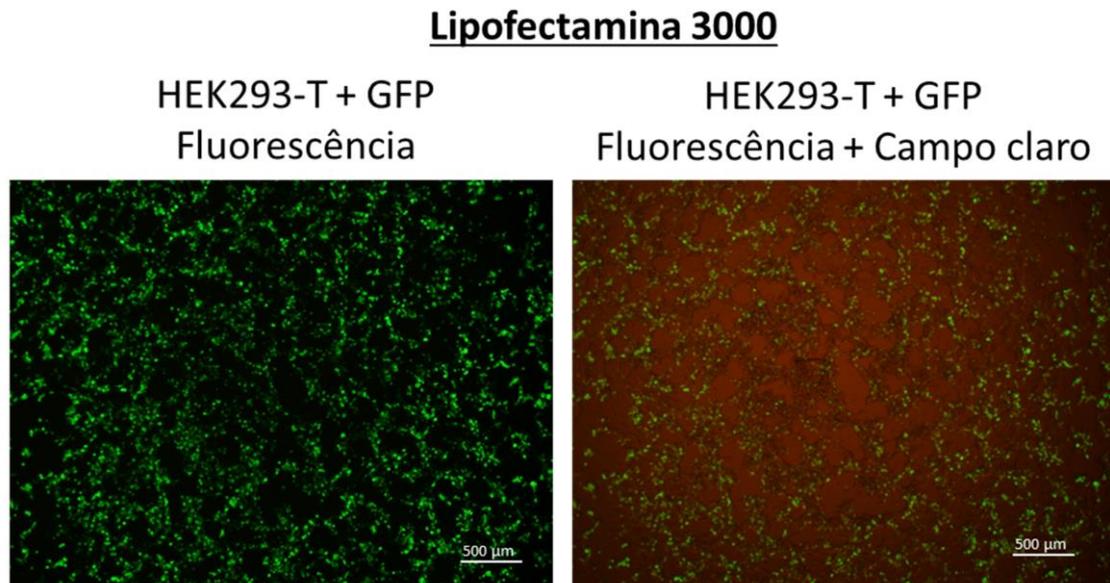


Legenda: Curvas de melting, obtidas através de PCR em tempo real, dos primers específicos para as regiões do gene de ampicilina e luciferase do plasmídeo pM67 pTATA TK-Luc, além de um primer para uma região onde foi inserido o inserto contendo a sequência alvo de STAT3 no plasmídeo. A formação de um único pico indica especificidade.

Fonte: A autora, 2024.

A linhagem celular HEK-293T foi utilizada como modelo tradicional de transfecção. Para isso, foi utilizada a lipofectamina 3000 para a transfecção do plasmídeo GFP, para visualização das células transfectadas, com o auxílio do microscópio de fluorescência (Fig. 10).

Figura 10- Transfecção da linhagem HEK293-T com o plasmídeo EGFP.

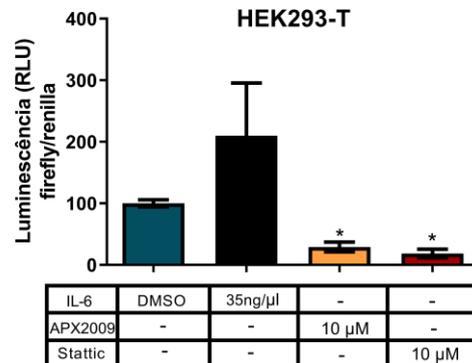


Legenda: Transfecção da linhagem HEK293-T com o plasmídeo GFP, com lipofectamina 3000. As imagens foram capturadas com microscópio óptico equipado com fluorescência. Foi realizado o *merge* das imagens de campo claro e fluorescência.

Fonte: A autora, 2024.

As concentrações de APX2009 e Stattic foram definidas de acordo com uma curva de viabilidade celular pelo ensaio WST-1. Dessa forma, foi visto que a concentração não letal, de 10 μM de APX2009 e de Stattic, foram capazes de reduzir significativamente a luminescência relativa ao plasmídeo repórter de STAT3, sugerindo redução da atividade transcricional de STAT3 (Fig. 11).

Figura 11-Quantificação da atividade transcricional de STAT3 por ensaio de *gene reporter* na linhagem HEK293-T.

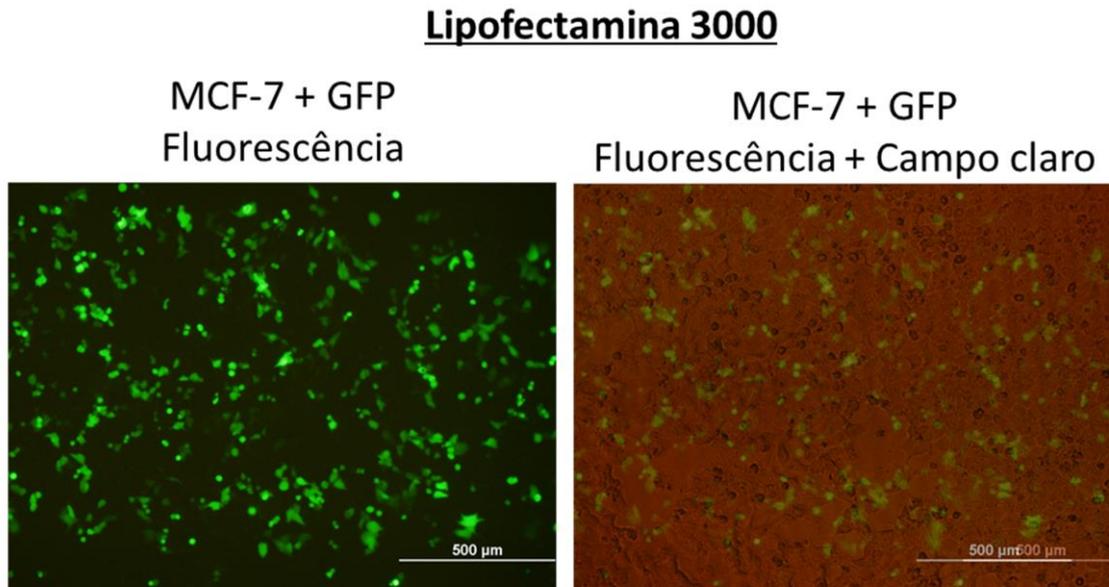


Legenda: Ensaio de *gene reporter* para avaliar a atividade transcricional de STAT3 na linhagem HEK293-T, pela transfecção com o plasmídeo pM67 pTATA TK-Luc, após 24 horas de tratamento com Stattic e APX2009. IL-6 a 35 ng/μl por 30 minutos foi utilizada como controle de indução de STAT3. A quantificação foi baseada na luminescência, foi feita a normalização com a renila e calculada a razão em relação ao DMSO, usado como controle. O valor foi considerado estatisticamente significativo com $p < 0,05$ (*).

Fonte: A autora, 2024.

Para a linhagem MCF-7, também foi utilizada a lipofectamina 3000 para a transfecção do plasmídeo GFP. A visualização das células transfectadas foi realizada com o auxílio do microscópio de fluorescência (Fig. 12). Para este ensaio foi realizada a co-transfecção com o plasmídeo de interesse e seu normalizador (renila).

Figura 12-Transfecção da linhagem MCF-7 com o plasmídeo GFP.

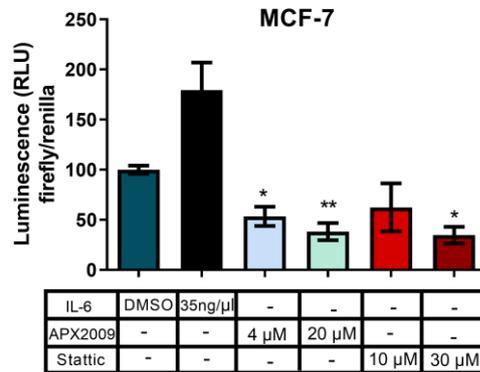


Legenda: Transfecção da linhagem MCF-7 com o plasmídeo GFP, com lipofectamina 3000. As imagens foram capturadas com microscópio óptico equipado com fluorescência. Foi realizado o *merge* (imagem a direita) das imagens de campo claro e fluorescência.

Fonte: A autora, 2024.

O tratamento com Stattic reduziu significativamente a atividade de STAT3 comparado ao controle. Além disso, o tratamento com 4 e 20 μM de APX2009 também reduziu significativamente a atividade transcritora de STAT3, sugerindo uma regulação desse fator de transcrição pelo domínio redox de APE1 (Fig. 13).

Figura 13-Quantificação da atividade transcricional de STAT3 por ensaio de *gene reporter* na linhagem MCF-7.

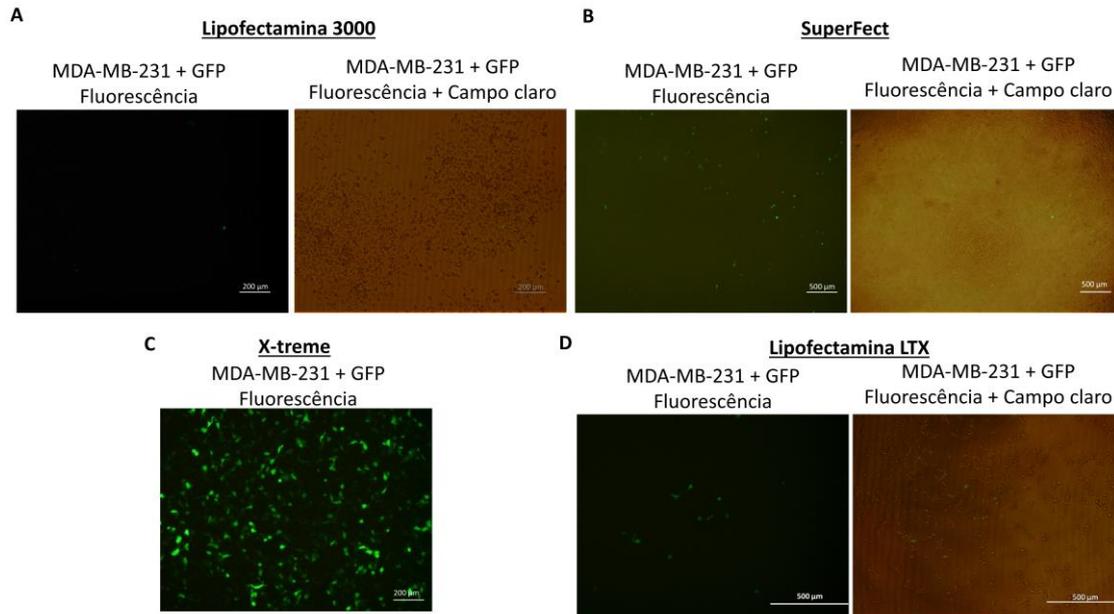


Legenda: Ensaio de *gene reporter* para avaliar a atividade transcricional de STAT3 na linhagem MCF-7, pela transfecção com o plasmídeo pM67 pTATA TK-Luc, após 24 horas de tratamento com Stattic e APX2009. IL-6 a 35 ng/μl por 30 minutos foi utilizada como controle de indução de STAT3. A quantificação foi baseada na luminescência, foi feita a normalização com a renila e calculada a razão em relação ao DMSO, usado como controle. O valor foi considerado estatisticamente significativo com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

Fonte: A autora, 2024.

Já para a linhagem MDA-MB-231, foram realizados testes com o plasmídeo GFP para avaliar a eficiência de transfecção. A Lipofectamina 3000, utilizada para a HEK293-T e MCF-7, não atingiu a eficiência necessária para execução dos experimentos (Fig. 14), para isso foram testados outros reagentes de transfecção, como o SuperFect Transfection Reagent (Qiagen #cat 301305), que também não exibiu boa eficiência, e o X-treme GENE™ HP DNA Transfection Reagent (Roche), o qual foi possível detectar a fluorescência emitida pelo plasmídeo GFP (Fig. W), entretanto o mesmo não ocorreu com o plasmídeo 4xM67 pTATA TK-Luc. A lipofectamina LTX (ThermoFisher) também não foi eficiente na transfecção do plasmídeo GFP na linhagem MDA-MB-231 (Fig. 14). Diante das diversas tentativas de transfectar MDA-MB-231 e sem sucesso nesse processo, a avaliação da atividade transcricional nessa linhagem ficou limitado.

Figura 14-Transfecção da linhagem MDA-MB-231 com o plasmídeo GFP.



Legenda: Transfecção da linhagem MDA-MB-231 com o plasmídeo GFP, com (A) lipofectamina 3000, (B) Superfect, (C) X-treme e (D) Lipofectamina LTX. As imagens foram capturadas com microscópio óptico equipado com fluorescência. Foi realizado o *merge* das imagens de campo claro e fluorescência.

Fonte: A autora, 2024.

4.2. Análise da viabilidade celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

Previamente nosso grupo mostrou que após 24 horas APX2009 reduz de forma dose-dependente a viabilidade das células MDA-MB-231 e MCF-7. O tratamento das células MDA-MB-231 a partir de 10 μM de APX2009 reduz significativamente a viabilidade dessas células. Enquanto para a linhagem MCF-7, o tratamento com 50 μM de APX2009 reduz significativamente a viabilidade celular, sugerindo que essas células sejam mais resistentes ao tratamento, comparado à MDA-MB-231 (SIQUEIRA *et al.*, 2024a). Além disso, também mostramos que o tratamento com 30 μM de Stattic reduz a viabilidade das culturas de células da linhagem MDA-MB-231, porém para a cultura de MCF-7, é necessária uma concentração maior, de 90 μM , para redução significativa da viabilidade, sugerindo que essa célula é mais resistente a inibição de STAT3. A tabela 2 indica os valores de IC50 encontrados para os tratamentos em cada célula e, apesar de baixas concentrações de APX2009 serem necessárias

para reduzir significativamente a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231, o IC50 de ambas as linhagens são próximos.

Tabela 2- IC50 dos inibidores Stattic e APX2009 nas linhagens de câncer de mama.

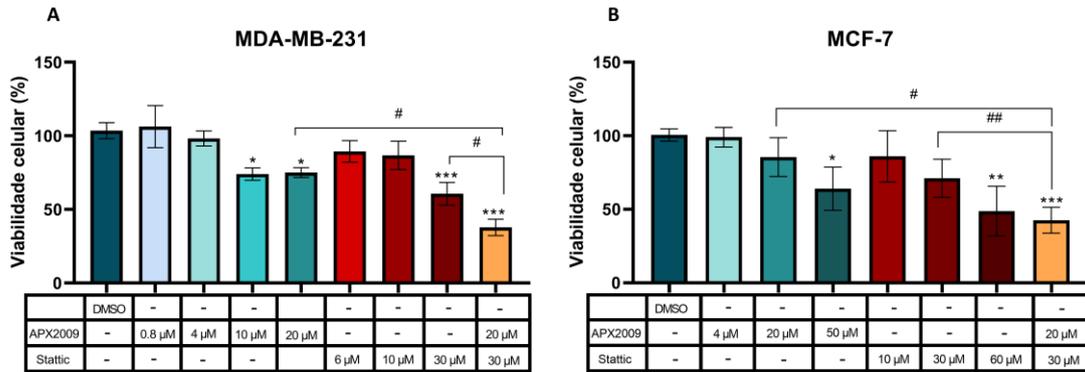
LINHAGEM CELULAR	COMPOSTO	IC50
MDA-MB-231	Stattic	53,55
MDA-MB-231	APX2009	71,5
MCF-7	Stattic	58
MCF-7	APX2009	76,03

Legenda: A tabela indica o IC50, obtido através da curva dose-resposta dos compostos, Stattic e APX2009, avaliados pelo ensaio WST-1, na linhagem MDA-MB-231 e MCF-7.

Fonte: A autora, 2024.

Além de isoladamente, o efeito combinado dos inibidores APX2009 e Stattic foi testado para avaliar a atuação conjunta desses compostos no processo de viabilidade celular. O tratamento combinado com 20 μ M de APX2009 e 30 μ M de Stattic foi capaz de reduzir ainda mais a viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 comparado aos tratamentos onde foram testados somente um dos inibidores (Fig. 15). Para descrever melhor a atuação desses inibidores, foi calculado o índice de combinação, o qual indicou sinergismo entre os dois compostos (Fig. 16). Para a linhagem MDA-MB-231, as duas concentrações isoladamente reduziram a viabilidade celular e quando combinadas geraram um efeito ainda maior na redução, comparado aos tratamentos isolados. Enquanto para a MCF-7, as duas concentrações isoladamente não eram capazes de reduzir a viabilidade, mas combinadas passam a ter um efeito significativo, quando comparado ao controle e aos tratamentos isolados (Fig. 15).

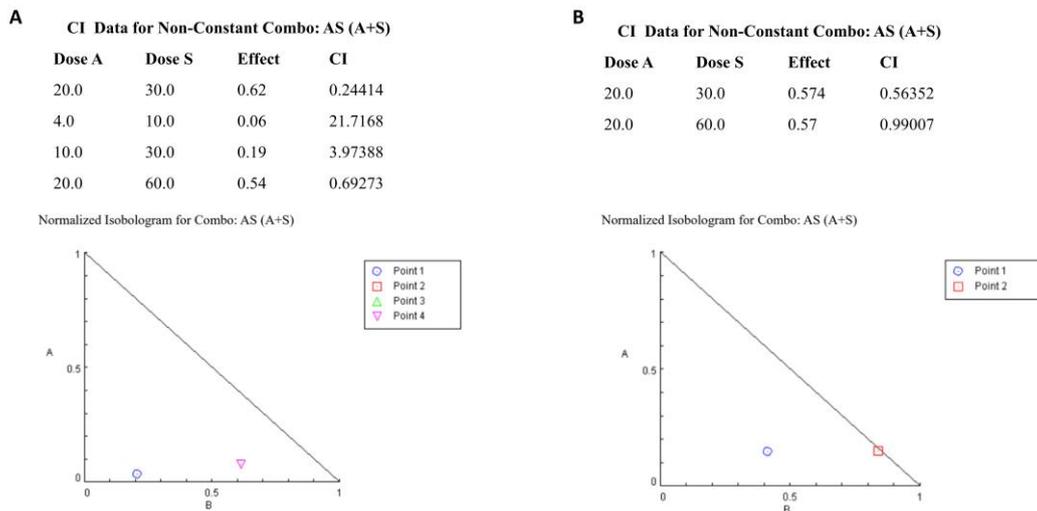
Figura 15- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, na viabilidade celular das linhagens de câncer de mama.



Legenda: Viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B) após tratamento de 24 horas com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,8, 4, 10, 20 e 50 µM e Stattic, nas concentrações de 6, 10, 30 e 60 µM, individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). As comparações entre os tratamentos foram consideradas estatisticamente significativas com valores de $p < 0,05$ (#) e $p < 0,01$ (##).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 16- Índice de combinação dos inibidores Stattic e APX2009 nas linhagens de câncer de mama.



Legenda: Índice de combinação dos tratamentos com os inibidores APX2009 (dose A) e Stattic (dose S) nas linhagens MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B). O efeito (*effect*) é indicado pela porcentagem de células não viáveis obtida pelo ensaio de WST-1. E CI indica o índice de combinação calculado pelo programa compusyn. Valores acima de 1 foram considerados como antagonismo, igual a 1 considerado como efeito aditivo, e abaixo de 1 considerados como sinergismo.

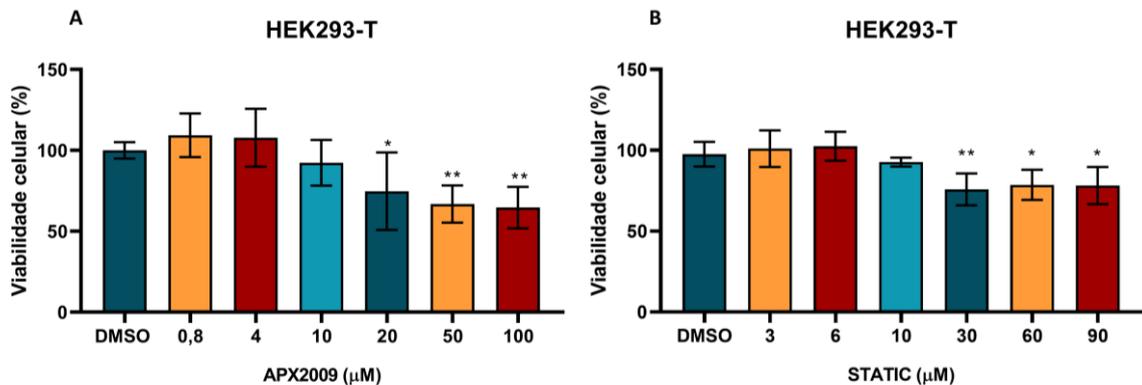
Fonte: A autora, 2024

4.3. Análise da viabilidade das células HEK293-T em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

Para avaliar os possíveis efeitos adversos da inibição redox de APE1 e da inibição de STAT3 em uma linhagem celular não tumoral e estabelecer uma curva de viabilidade, foi realizado o ensaio WST-1 nas células HEK293-T.

O tratamento dessas células com APX2009 foi significativo em reduzir a viabilidade celular nas concentrações de 20, 50 e 100 μM . O tratamento com o inibidor Stattic também foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular das células HEK293-T nas concentrações de 30, 60 e 90 μM (Fig. 17). Entretanto, apesar de a redução na viabilidade celular ser significativa, ambos os inibidores não atingem o IC50 ($> 100 \mu\text{M}$ para APX2009 e $> 90 \mu\text{M}$ para Stattic) nas concentrações testadas na linhagem não tumoral HEK293-T, mostrando ser mais seletivos contra as células tumorais.

Figura 17- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009 na viabilidade celular da linhagem celular HEK293-T.



Legenda: Viabilidade celular da linhagem HEK293-T após tratamento de 24 horas com os inibidores APX2009 (A), nas concentrações de 0,8, 4, 10, 20, 50 e 100 μM e Stattic (B), nas concentrações de 6, 10, 30, 60 e 90 μM . O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

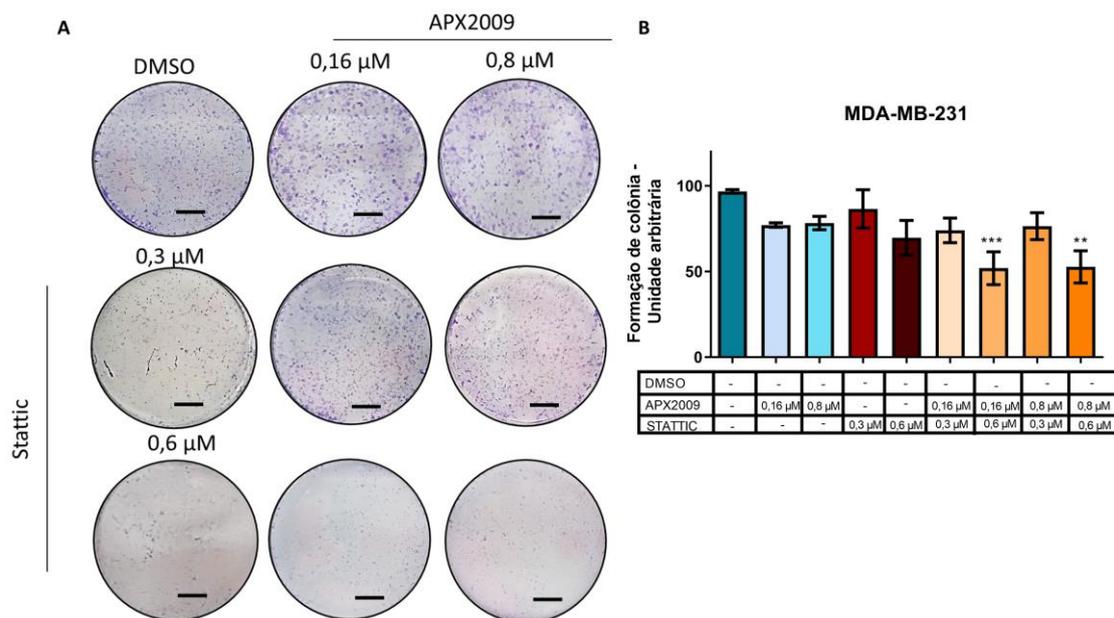
Fonte: A autora, 2024.

4.4. Análise do potencial de formação de colônia de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

Para analisar o efeito dos inibidores APX2009 e Stattic sobre a capacidade de formação de colônias, foi realizado o ensaio de formação de colônias. Para isso, foram determinadas novas concentrações dos inibidores, visto que esse ensaio utiliza uma baixa densidade de células. Em dados recentes do nosso grupo de pesquisa, mostrou que para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 o tratamento com 4 μM de APX2009 foi capaz de reduzir significativamente o potencial de formação de colônia dessa célula, sugerindo redução na proliferação celular (SIQUEIRA *et al.*, 2024a). Enquanto as concentrações de 0,6 a 3 μM de Stattic para a MCF-7, e 3 μM de Stattic para a MDA-MB-231, foram capazes de reduzir o potencial de formação de colônia dessas linhagens (Fig. 18).

Com esses resultados, foi feito o ensaio de formação de colônia em resposta ao tratamento combinado dos inibidores APX2009 e Stattic nas duas linhagens tumorais. Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento combinado com concentrações que isoladamente não exibem redução da proliferação, 0,16 μM de APX2009 e 0,6 μM de Stattic, reduziu significativamente o potencial de formação de colônias dessa célula (Fig. 18).

Figura 18- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de formação de colônias da linhagem MDA-MB-231.

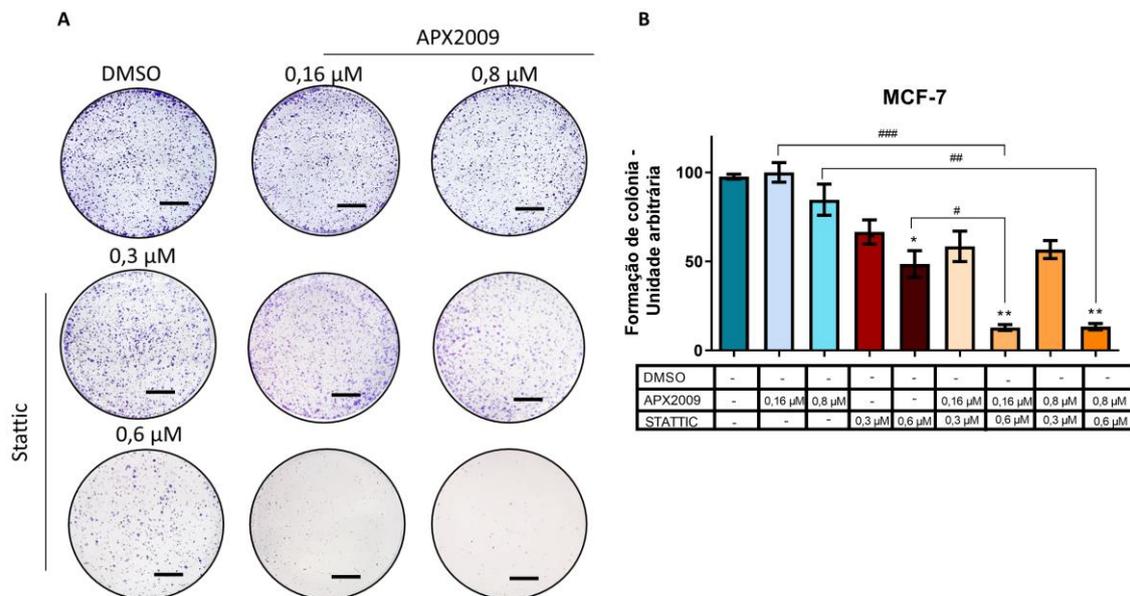


Legenda: Ensaio de proliferação por formação de colônias da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,16 e 0,8 μM e Stattic, nas concentrações de 0,3 e 0,6 μM , individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). (A) imagens das colônias formadas após os tratamentos. (B) quantificação das colônias formadas após os tratamentos, através da eluição com ácido acético. Barras= 5000 μm .

Fonte: A autora, 2024.

Enquanto para MCF-7, linhagem que se mostrou mais sensível neste ensaio ao tratamento com Stattic, o tratamento combinado com 0,16 μM de APX2009 e 0,6 μM de Stattic também foi capaz de reduzir ainda mais o potencial clonogênico dessas células, comparado ao tratamento individual (Fig. 19).

Figura 19- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de formação de colônias da linhagem MCF-7.



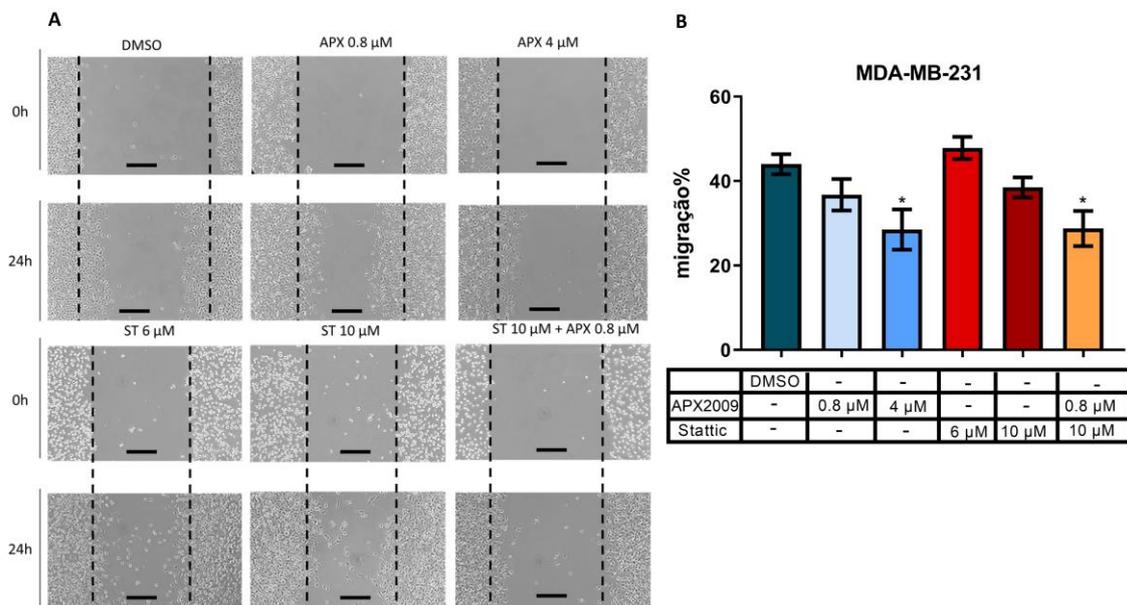
Legenda: Ensaio de proliferação por formação de colônias da linhagem MCF-7 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,16 e 0,8 μM e Stattic, nas concentrações de 0,3 e 0,6 μM , individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). A comparação entre os tratamentos foi considerada estatisticamente significativa com valores de $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##) e $p < 0,001$ (###). (A) imagens das colônias formadas após os tratamentos. (B) quantificação das colônias formadas após os tratamentos, através da eluição com ácido acético. Barras= 5000 μm .

Fonte: A autora, 2024.

4.5. Análise do potencial de migração celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

O ensaio *Wound Healing* foi utilizado para avaliar os efeitos do tratamento com os inibidores APX2009 e Stattic no potencial de migração das células MDA-MB-231 e MCF-7. Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 6 e 10 μM de Stattic após 24 horas não afetou significativamente a migração dessas células em comparação com o controle. Em contrapartida, o tratamento dessas células com 4 μM de APX2009 reduziu significativamente a migração celular em comparação com o controle. O tratamento combinado com as concentrações que não afetam a migração individualmente, 0,8 μM de APX2009 e 10 μM de Stattic, foi capaz de reduzir significativamente a migração comparado ao controle, mas não se mostrou mais eficaz comparado ao tratamento com somente 4 μM de APX2009 (Fig. 20).

Figura 20- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, na capacidade migratória da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.

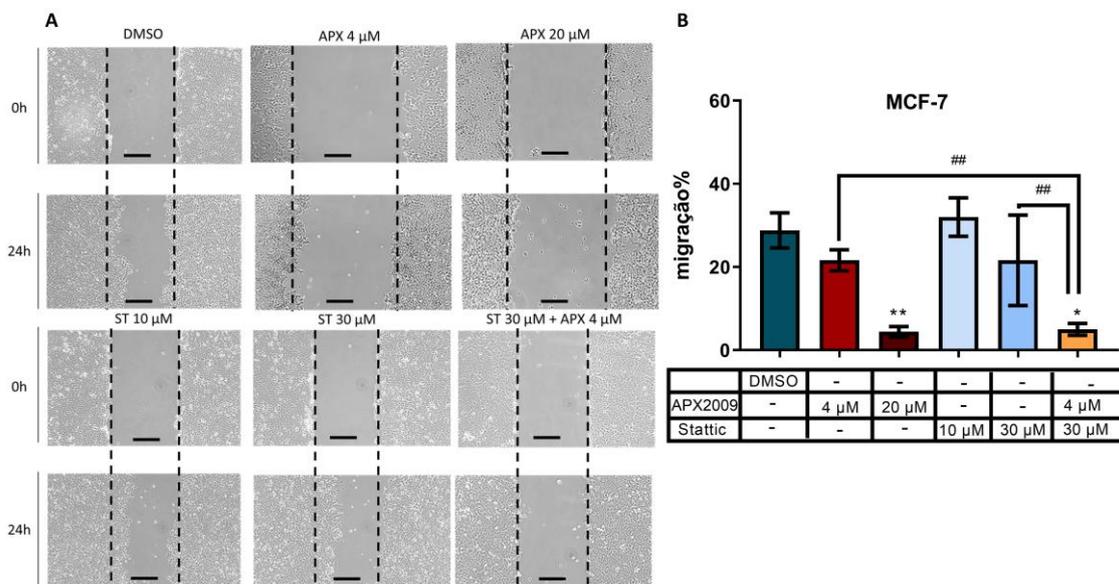


Legenda: Ensaio de migração celular por *Wound Healing* da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,8 e 4 μM e Stattic, nas concentrações de 6 e 10 μM , individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*). (A) imagens das áreas livres após os tratamentos. (B) quantificação da área livre após os tratamentos, através do software ImageJ. Barras= 200 μm .

Fonte: A autora, 2024.

Para a linhagem MCF-7, o tratamento com 10 e 30 μM de Stattic também não foi capaz de afetar significativamente a migração celular comparado ao controle, porém o tratamento com 20 μM de APX2009 reduziu significativamente a migração dessas células. Além disso, o tratamento combinado, utilizando concentrações que não mostraram efeitos isoladamente, como 4 μM de APX2009 e 30 μM de Stattic reduziu significativamente a migração das células MCF-7 comparado ao controle e aos tratamentos isoladamente, sugerindo que o co-tratamento das células é mais eficaz em reduzir a migração celular (Fig. 21).

Figura 21-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, na capacidade migratória da linhagem de câncer de mama MCF-7.



Legenda: Legenda: Ensaio de migração celular por *Wound Healing* da linhagem MCF-7 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 4 e 20 μM e Stattic, nas concentrações de 10 e 30 μM , individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). As combinações entre os tratamentos foram consideradas estatisticamente significativas com valores de $p < 0,01$ (##). (A) imagens das áreas livres após os tratamentos. (B) quantificação da área livre após os tratamentos, através do software ImageJ. Barras= 200 μm .

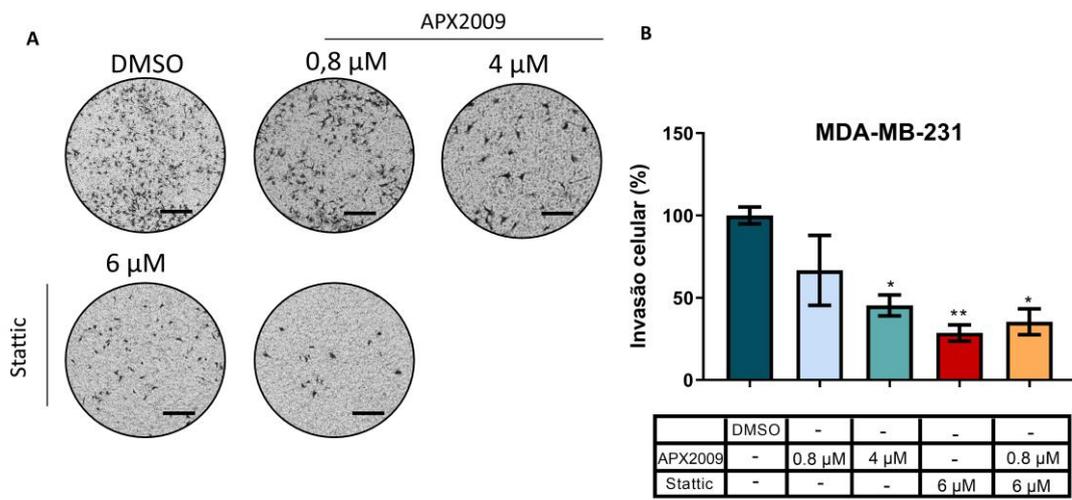
Fonte: A autora, 2024.

4.6. Análise da invasão celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

Para avaliar os efeitos da inibição redox de APE1 e inibição de STAT3 na invasão celular, foi realizado o ensaio de *Transwell Matrigel*. Para esse ensaio foram utilizadas concentrações não letais de ambos os inibidores, para que o efeito observado não seja decorrente de morte

celular. Para a linhagem celular MDA-MB-231, tanto o tratamento com 6 μM de Stattic, quanto o tratamento com 4 μM de APX2009 após 24 horas foram capazes de reduzir significativamente a invasão dessas células comparado ao controle. O tratamento combinado com 0,8 μM de APX2009 e 6 μM de Stattic também reduziu significativamente a invasão celular, porém não foi mais eficaz comparado ao tratamento individual com 6 μM de Stattic (Fig. 22).

Figura 22-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de invasão da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.

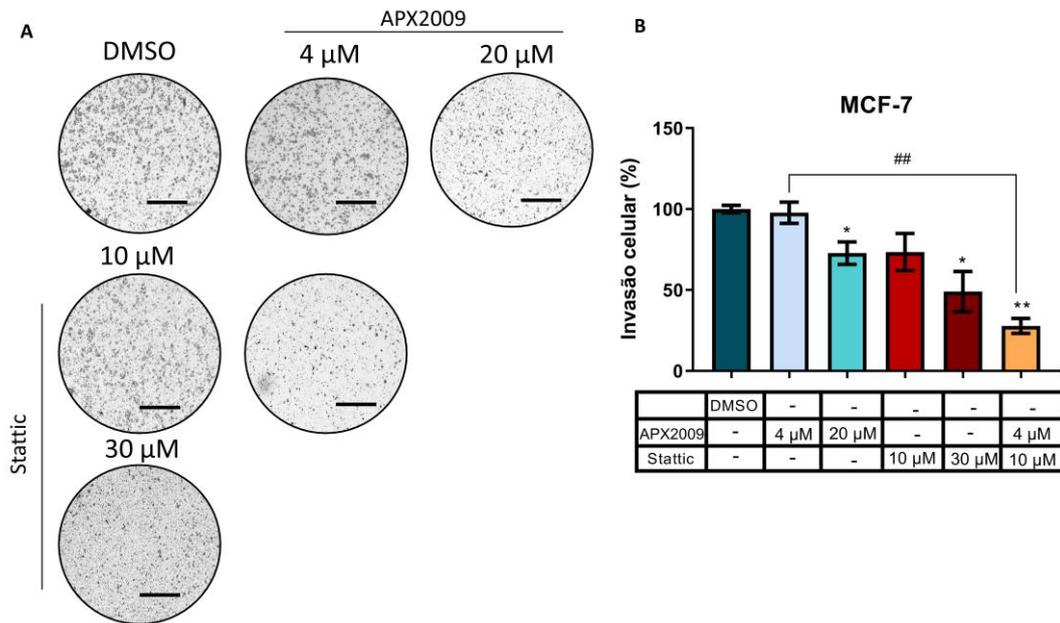


Legenda: Legenda: Ensaio de invasão celular por *Transwell Matrigel* da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,8 e 4 μM e Stattic, na concentração de 6 μM , individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). (A) imagens da porção inferior do *Transwell* com as células que tiveram capacidade de invadir após o tratamento. (B) quantificação das células que invadiram após os tratamentos, através do software ImageJ. Barras= 200 μm .

Fonte: A autora, 2024.

Já para a linhagem MCF-7, as maiores concentrações testadas, 20 μM de APX2009 e 30 μM de Stattic também reduziram significativamente a invasão celular comparado ao controle. E, o tratamento combinado com concentrações que individualmente não afetam a invasão, como 4 μM de APX2009 e 10 μM de Stattic, reduziu significativamente a invasão celular comparado ao controle e aos tratamentos individuais. Sugerindo novamente que o tratamento combinado é mais eficaz em reduzir o potencial migratório de células MCF-7 (Fig.23).

Figura 23-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, no potencial de invasão da linhagem de câncer de mama MCF-7.



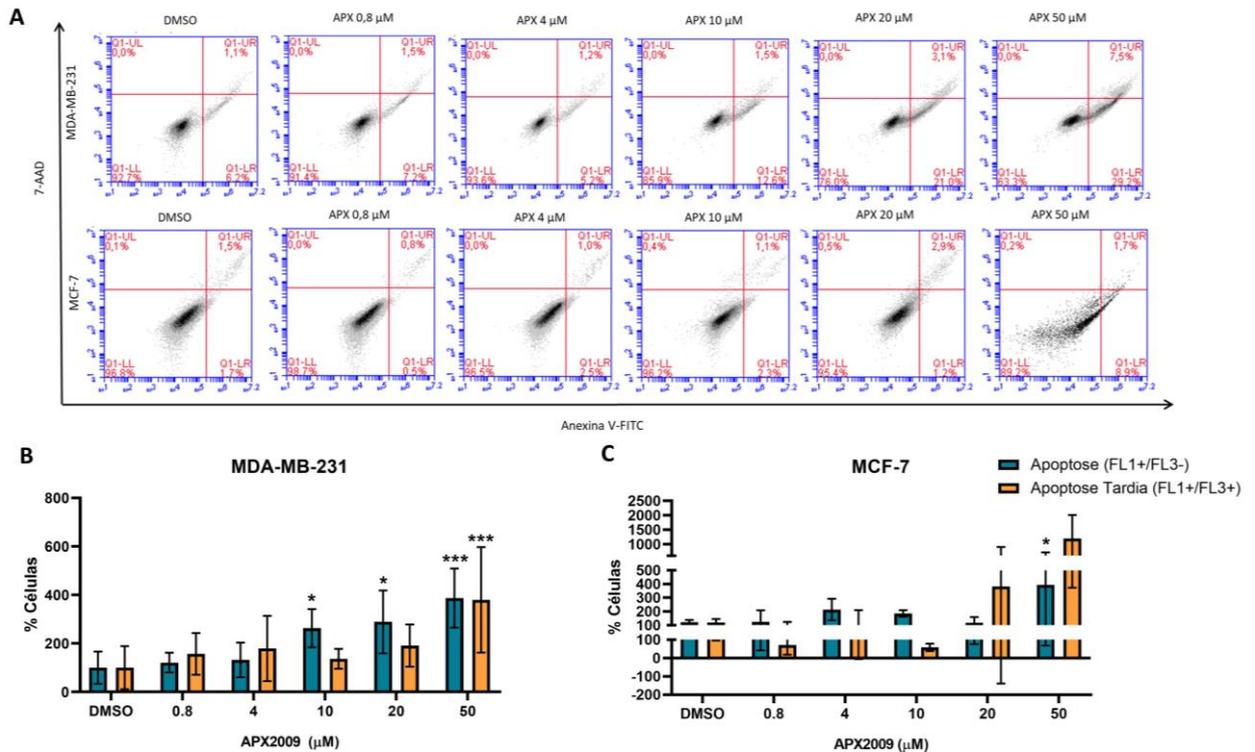
Legenda: Legenda: Ensaio de invasão celular por *Transwell Matrigel* da linhagem MCF-7 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 4 e 20 μ M e Stattic, nas concentrações de 10 e 30 μ M, individualmente ou combinados. O DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). (A) imagens da porção inferior do *Transwell* com as células que tiveram capacidade de invadir após o tratamento. (B) quantificação das células que invadiram após os tratamentos, através do software ImageJ. Barras= 200 μ m.

Fonte: A autora, 2024.

4.7. Análise da indução de morte celular de células de câncer de mama em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic

Para avaliar os efeitos da inibição redox de APE1 e inibição de STAT3 na morte celular, foram realizados ensaios de citometria de fluxo. Para avaliar morte celular por apoptose, a anexina V-FITC foi utilizada, e morte por necrose foi avaliada pela marcação com 7-AAD. Inicialmente os resultados foram obtidos utilizando o citômetro BD Accuri C6 e indicaram que para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 10, 20 e 50 μ M de APX2009 promove o aumento da porcentagem de células marcadas com anexina, sugerindo morte celular por apoptose, enquanto a concentração de 50 μ M de APX2009 também indica apoptose tardia, comparado com o controle (Fig. 24). Entretanto para a linhagem MCF-7 somente a concentração de 50 μ M de APX2009 foi capaz de provocar apoptose (Fig. 24).

Figura 24- Efeito do inibidor APX2009 na morte celular das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

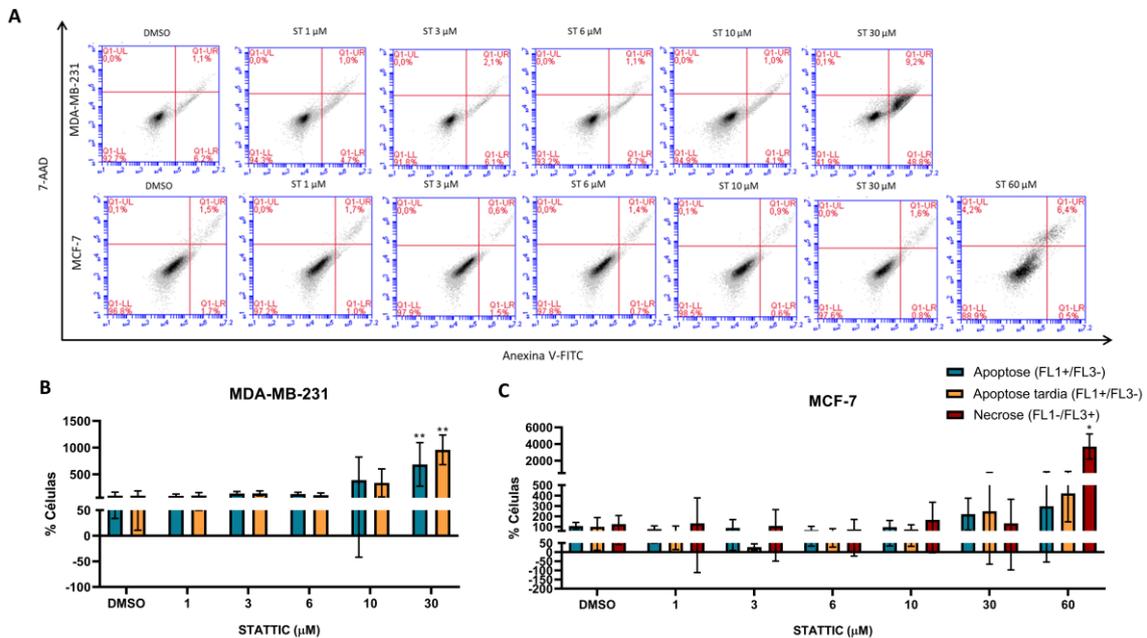


Legenda: (A) Ensaio de morte celular por citometria de fluxo das linhagens MDA-MB-231 (B) e MCF-7 (C) após tratamento com o inibidor APX2009, nas concentrações de 0,8, 4, 10, 20 e 50 μM . O DMSO foi utilizado como controle. A porcentagem das células foi calculada pela razão de células marcadas no grupo tratado pelo grupo controle. As células positivas para FL1 e negativas para FL3 foram consideradas como apoptose, e as positivas para FL1 e FL3, foram consideradas como apoptose tardia. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (***) . Imagens geradas pelo BD CSampler software.

Fonte: A autora, 2024.

O tratamento com 30 μM de Stattic também foi capaz de provocar apoptose e apoptose tardia nas células MDA-MB-231, e 60 μM deste inibidor foi capaz de provocar morte por necrose na linhagem MCF-7 (Fig. 25).

Figura 25-Efeito do inibidor Stattic na morte celular das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

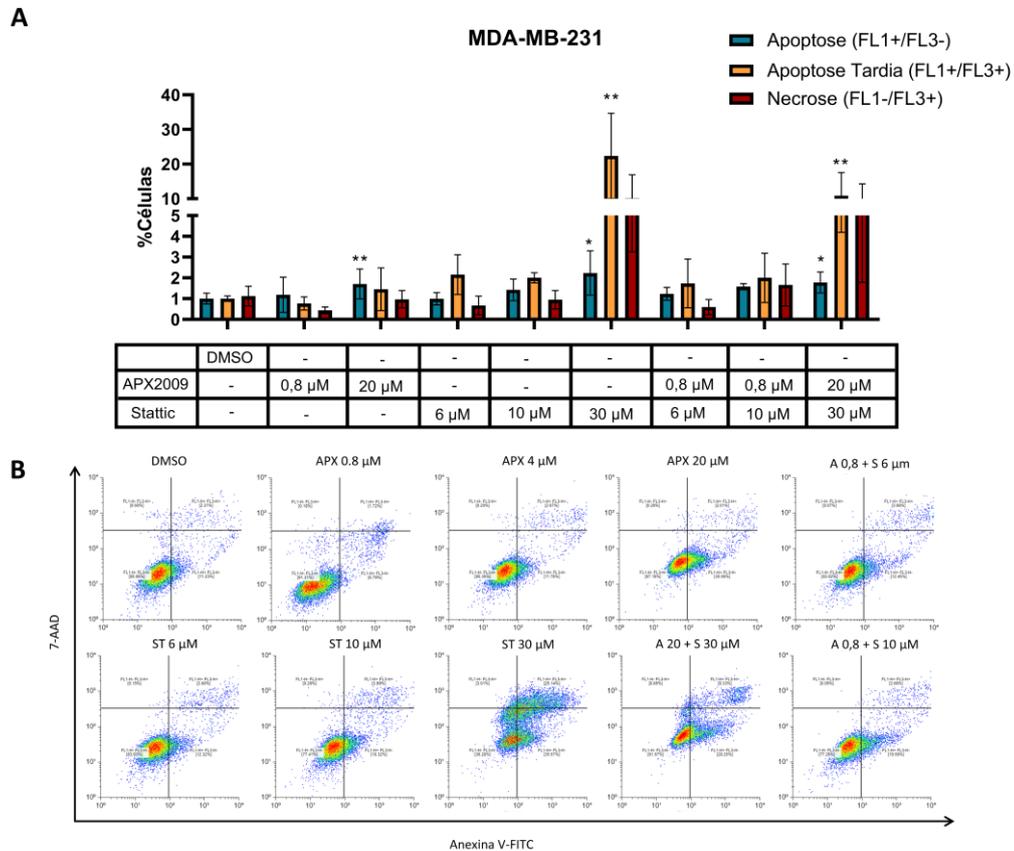


Legenda: (A) Ensaio de morte celular por citometria de fluxo das linhagens MDA-MB-231 (B) e MCF-7 (C) após tratamento com o inibidor Stattic, nas concentrações de 1, 3, 6, 10, 30 e 60 µM. O DMSO foi utilizado como controle. A porcentagem das células foi calculada pela razão de células marcadas no grupo tratado pelo grupo controle. As células positivas para FL1 e negativas para FL3 foram consideradas como apoptose, e as positivas para FL1 e FL3, foram consideradas como apoptose tardia. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Imagens geradas pelo BD CSampler software.

Fonte: A autora, 2024.

Já o tratamento combinado indicou que para a linhagem MDA-MB-231, as concentrações utilizadas para os ensaios de migração e invasão, 0,8 µM de APX2009 combinado com 6 ou 10 µM de Stattic, não foram capazes de levar a morte celular, enquanto a combinação que reduz a viabilidade celular (20 µM de APX2009 e 30 µM de Stattic) provoca morte celular por apoptose e apoptose tardia comparado ao controle, porém não é um efeito estatisticamente diferente dos tratamentos isolados (Fig. 26).

Figura 26- Efeito da combinação dos inibidores APX2009 e Stattic na morte celular da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.

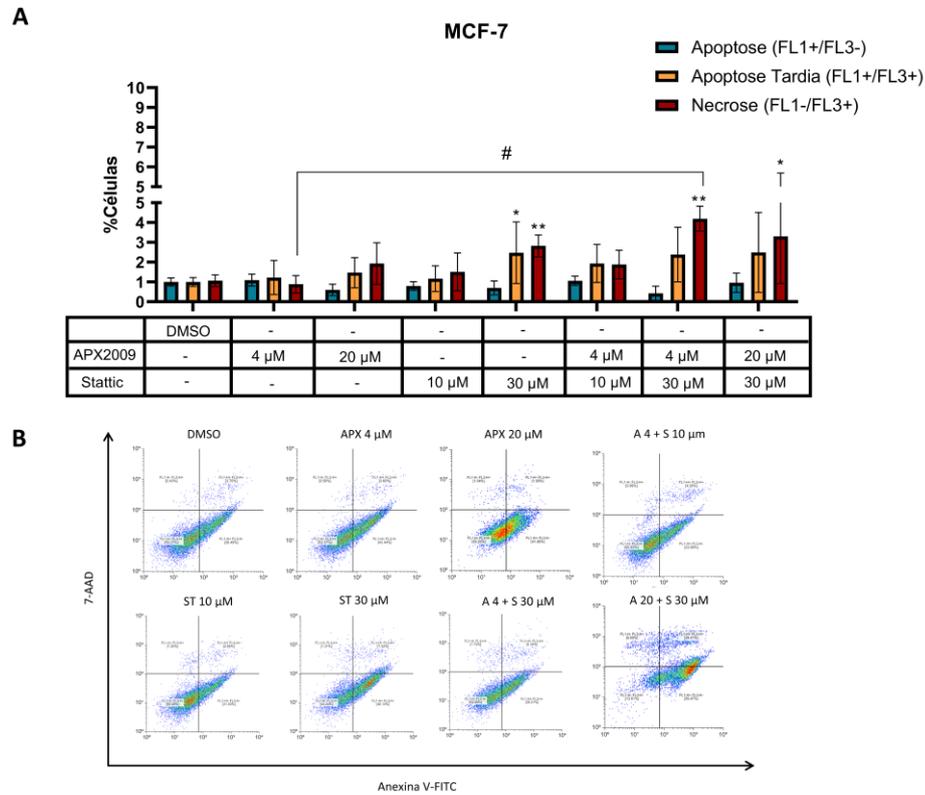


Legenda: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,8, 4 e 20 μ M, e Stattic nas concentrações de 6, 10 e 30 μ M. O DMSO foi utilizado como controle. A porcentagem das células foi calculada pela razão de células marcadas no grupo tratado pelo grupo controle. As células positivas somente para FL1 foram consideradas como apoptose, as positivas somente para FL3 como necrose, e as positivas para FL1 e FL3, foram consideradas como apoptose tardia. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Imagens geradas pelo software Floreada.io.

Fonte: A autora, 2024.

Em contrapartida, o tratamento combinado na linhagem MCF-7, nas concentrações de 4 μ M de APX2009 e 30 μ M de Stattic foi capaz de provocar morte por necrose, comparado ao controle e ao tratamento com somente APX2009. Além disso, as concentrações que reduzem a viabilidade celular, 20 μ M de APX2009 e 30 μ M de Stattic, também provocaram morte celular por necrose. O tratamento com Stattic 30 μ M, que anteriormente utilizando o citômetro BD Accuri C6 (Fig. 25) não indicava morte, passou a indicar significativamente morte por apoptose tardia e necrose (Fig. 27).

Figura 27- Efeito da combinação dos inibidores APX2009 e Stattic na morte celular da linhagem de câncer de mama MCF-7.

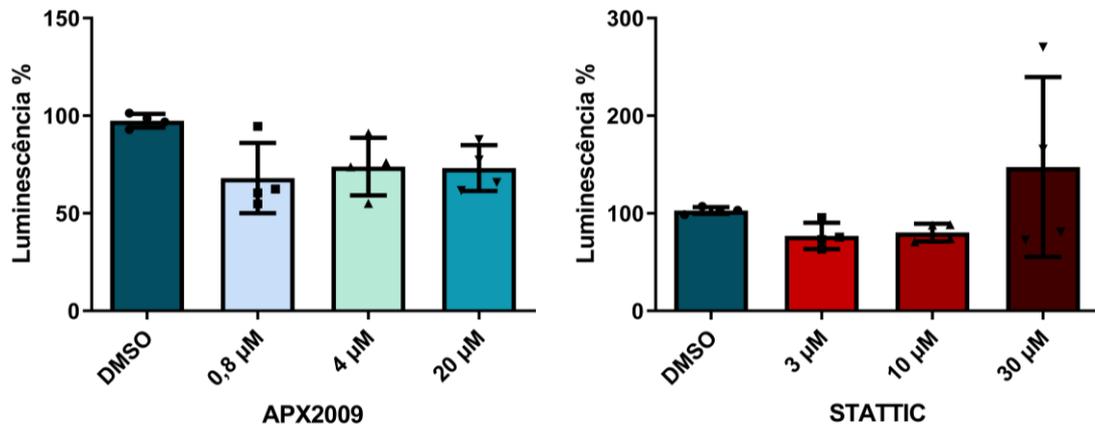


Legenda: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 4 e 20 μM , e Stattic nas concentrações de 10 e 30 μM . O DMSO foi utilizado como controle. A porcentagem das células foi calculada pela razão de células marcadas no grupo tratado pelo grupo controle. As células positivas somente para FL1 foram consideradas como apoptose, as positivas somente para FL3 como necrose, e as positivas para FL1 e FL3, foram consideradas como apoptose tardia. Os dados foram considerados estatisticamente significativos comparados ao DMSO com valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Imagens geradas pelo software Floreada.io.

Fonte: A autora, 2024.

Outra metodologia utilizada para avaliar morte celular por necrose foi mensurar os níveis de LDH pelo LDH-Glo™ Cytotoxicity Kit (Promega). De acordo com (CHAN; MORIWAKI; DE ROSA, 2013), o LDH é uma das moléculas liberadas no processo de permeabilização de membrana após morte por necrose. Para a linhagem MDA-MB-231, os inibidores APX2009 e Stattic não foram capazes de promover aumento nos níveis de LDH, sugerindo que não provocam morte celular por necrose nesta célula (Fig. 28).

Figura 28- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009 no nível de LDH liberado pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.

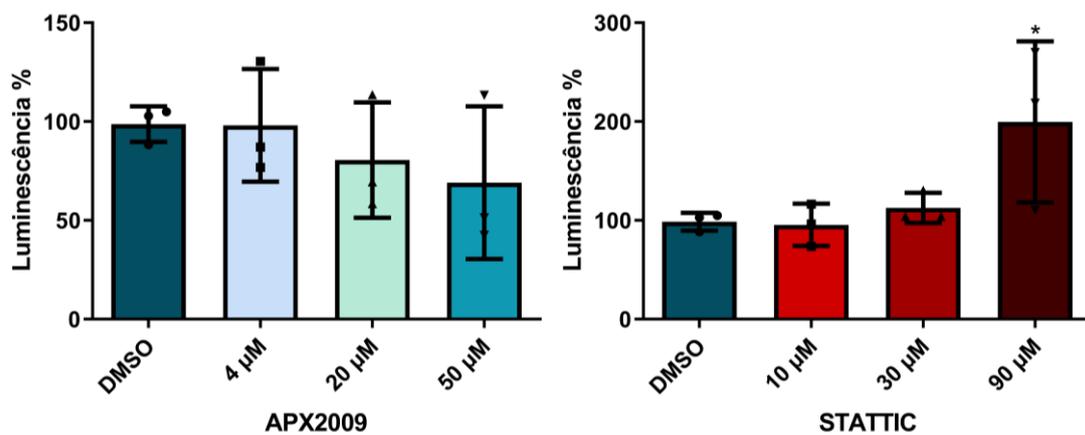


Legenda: Morte celular por necrose pelo ensaio de LDH da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 0,8, 4 e 20 µM, e Stattic nas concentrações de 3, 10 e 30 µM. O DMSO foi utilizado como controle. A porcentagem das células foi calculada pela razão de células marcadas no grupo tratado pelo grupo controle.

Fonte: A autora, 2024.

Na linhagem MCF-7, APX2009 também não elevou os níveis de LDH, entretanto 90 µM de Stattic aumentou significativamente os níveis de LDH, sugerindo morte celular por necrose (Fig. 29).

Figura 29-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009 no nível de LDH liberado pela linhagem de câncer de mama MCF-7.



Legenda: Morte celular por necrose pelo ensaio de LDH da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com os inibidores APX2009, nas concentrações de 4, 20 e 50 µM, e Stattic nas concentrações de 10, 30 e 90 µM. O DMSO foi utilizado como controle. A porcentagem das células foi calculada pela razão de células marcadas no grupo tratado pelo grupo controle.

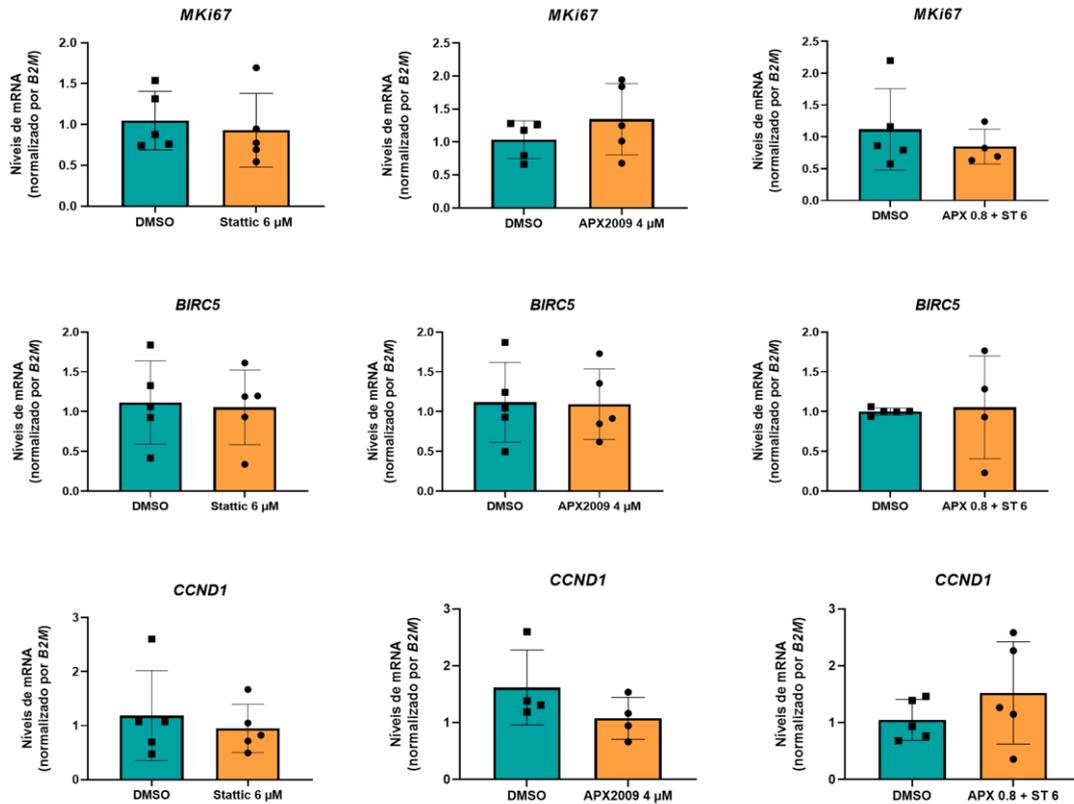
Fonte: A autora, 2024.

4.8. **Análise dos níveis de mRNA de genes que regulam positivamente a proliferação, migração e invasão, em resposta ao tratamento com APX2009 e Stattic**

A PCR em tempo real foi realizada para avaliar possíveis alterações moleculares envolvidas na regulação dos eventos celulares observados após o tratamento com o inibidor redox APX2009 e o inibidor de STAT3, Stattic. Foram analisados os níveis de mRNA de genes alvos de STAT3, como *RHOA* e *FSCN1*, relacionados à migração celular, e *MMP-9*, relacionada à invasão celular. Genes envolvidos diretamente no processo de EMT, como Vimentina (*VIM*), Fibronectina (*FNI*), E-caderina (*CDH1*), N-caderina (*CDH2*) e Snail (*SNAIL*). Além de genes relacionados à proliferação e morte celular, como *MKi67*, *BIRC5* e *CCND1*, e genes com múltiplas funções como *APEX1*, *STAT3* e *c-FOS*.

O tratamento isolado e o combinado com APX2009 ou Stattic, não foi capaz de alterar os níveis de mRNA dos genes avaliados, na MDA-MB-231 (Fig. 30, 31, 32 e 33).

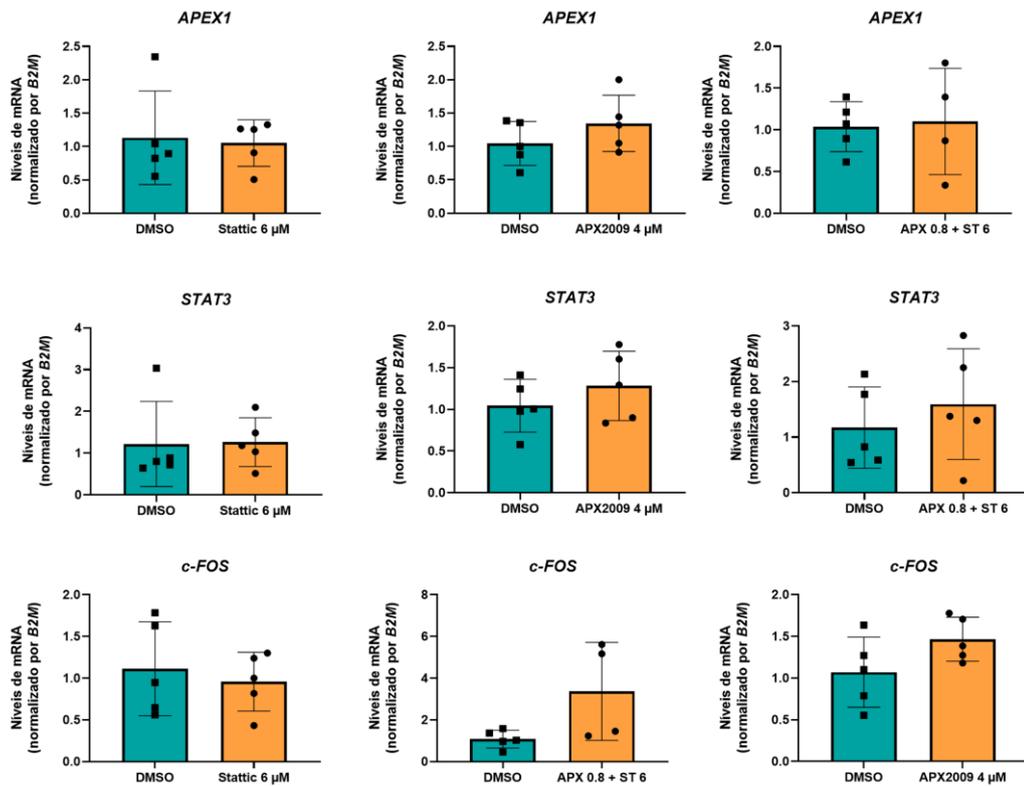
Figura 30-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular, na linhagem MDA-MB-231.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *MKI67*, *BIRC5* e *CCND1* quantificados por RT-qPCR da linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 4 μM e Stattic na concentração de 6 μM, individualmente, e combinados na concentração de 0,8 e 6 μM de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta CT$.

Fonte: A autora, 2024.

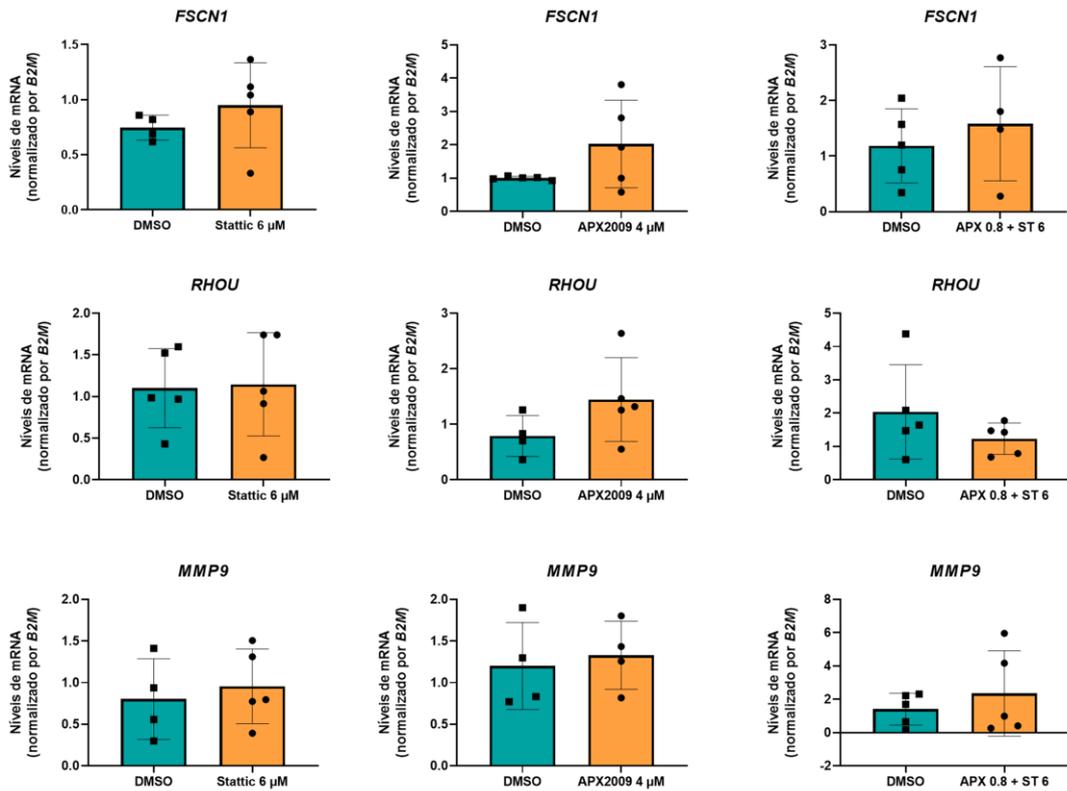
Figura 31-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam múltiplas vias, na linhagem MDA-MB-231.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *APEX1*, *STAT3* e *c-FOS* quantificados por RT-qPCR da linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 4 μM e Stattic na concentração de 6 μM, individualmente, e combinados na concentração de 0,8 e 6 μM de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta CT$.

Fonte: A autora, 2024.

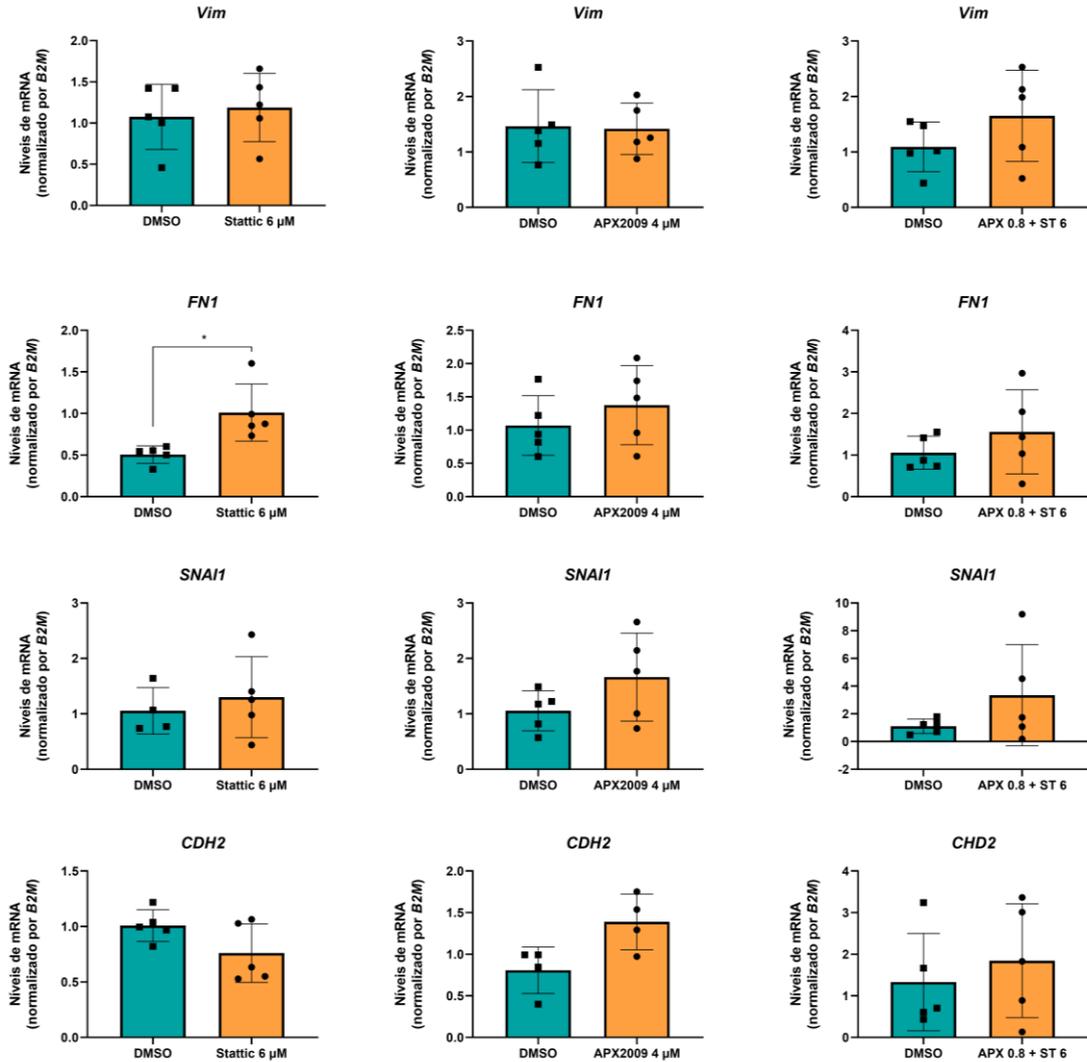
Figura 32-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a migração e invasão, na linhagem MDA-MB-231.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *FSCN1*, *RHOU* e *MMP9* quantificados por RT-qPCR da linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 4 μM e Stattic na concentração de 6 μM, individualmente, e combinados na concentração de 0,8 e 6 μM de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta CT$.

Fonte: A autora, 2024.

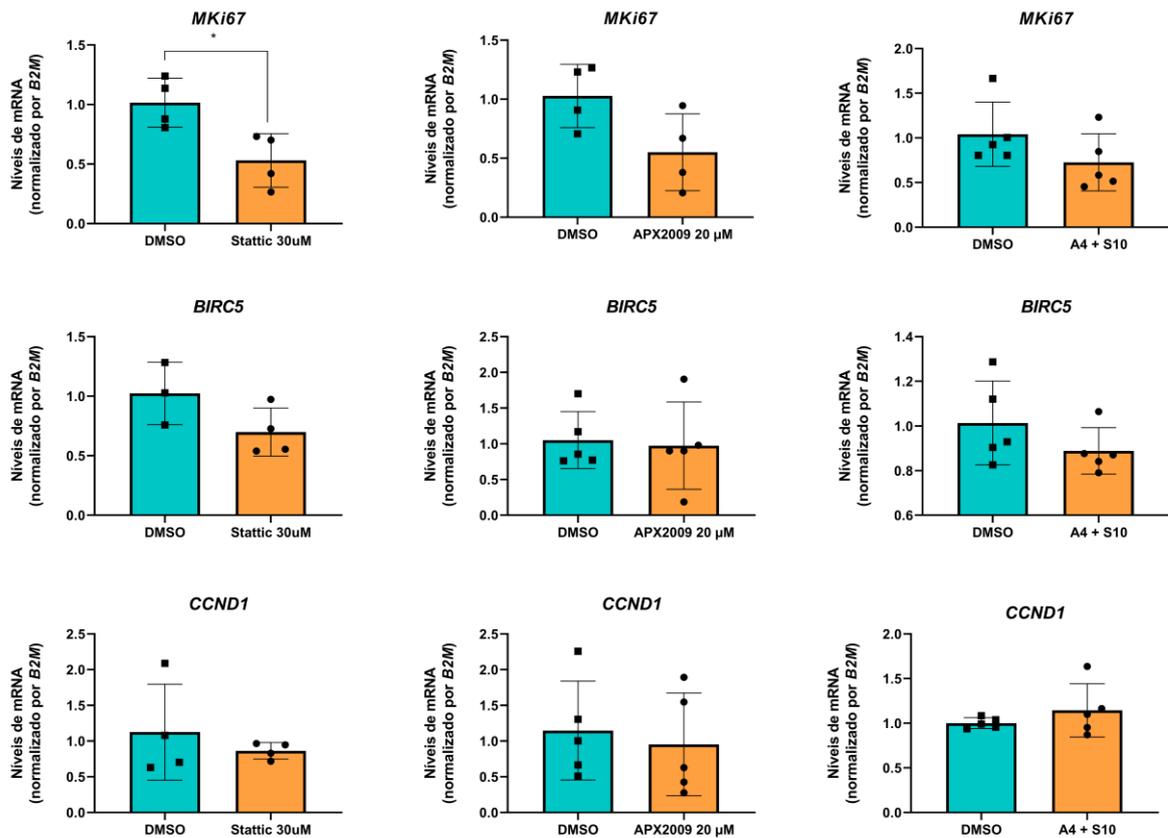
Figura 33-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam classicamente a Transição epitélio-mesenquimal, na linhagem MDA-MB-231.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *VIM* (vimentina), *FN1* (fibronectina), *SNAI1* (Snail) e *CDH2* (N-CAD) quantificados por RT-qPCR da linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 4 µM e Stattic na concentração de 6 µM, individualmente, e combinados na concentração de 0,8 e 6 µM de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta CT$.
Fonte: A autora, 2024.

Enquanto na MCF-7, o tratamento com 30 µM de Stattic reduziu significativamente os níveis do marcador de proliferação *MKi67* (Fig. 34), e do marcador mesenquimal Vimentina (Fig. 37), porém não alterou os níveis dos outros genes, assim como o tratamento com APX2009 (Fig. 34, 35, 36 e 37). Além disso, o tratamento combinado com APX2009 e Stattic foi capaz de reduzir significativamente os níveis dos marcadores mesenquimais Vimentina e Fibronectina (Fig. 37).

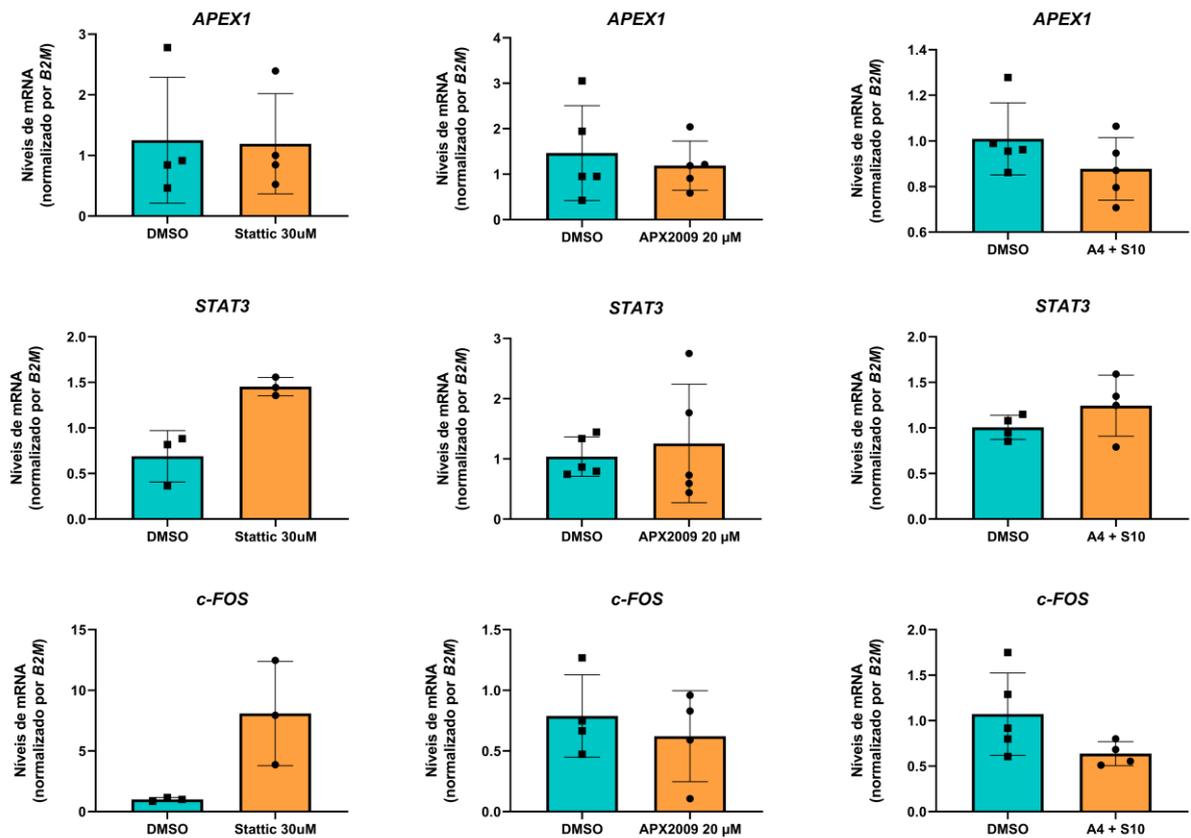
Figura 34-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação, na linhagem MCF-7.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *MKi67*, *BIRC5* e *CCND1* quantificados por RT-qPCR da linhagem MCF-7 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 20 μ M e Stattic na concentração de 30 μ M, individualmente, e combinados na concentração de 4 e 10 μ M de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta$ CT.

Fonte: A autora, 2024.

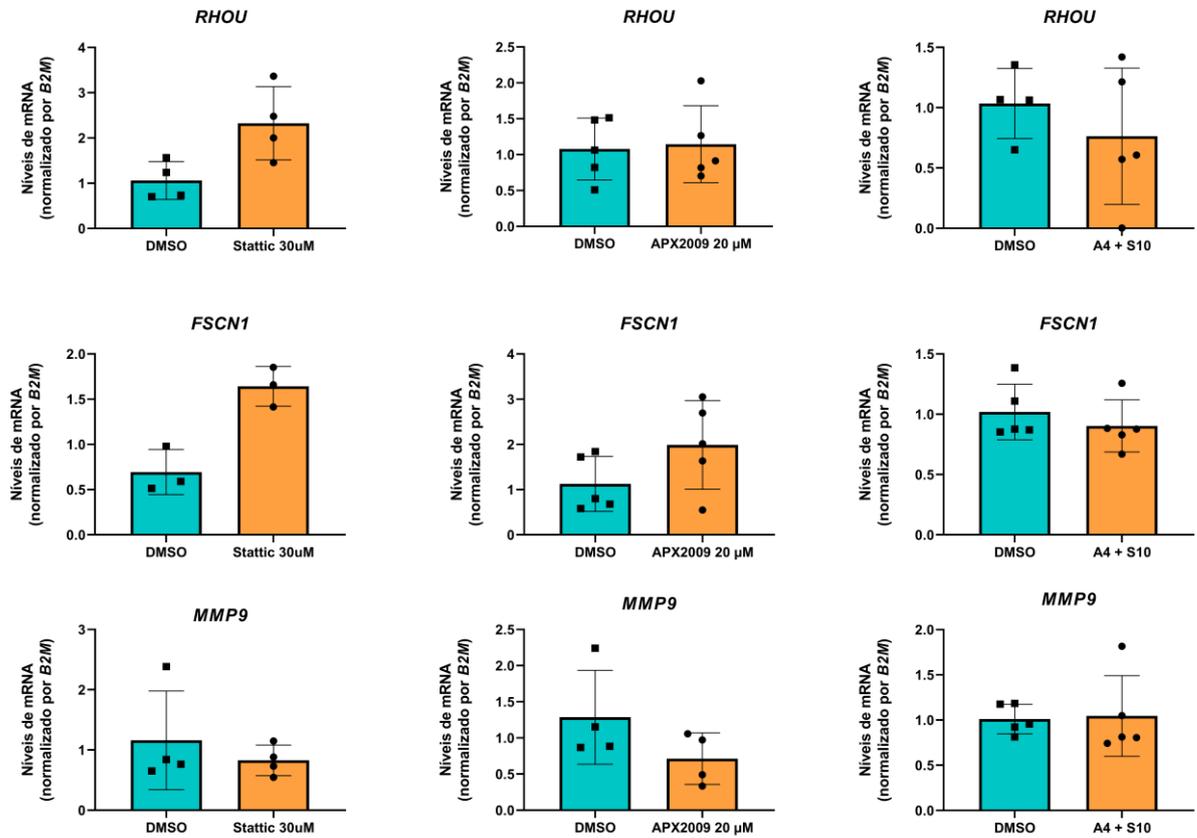
Figura 35-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam múltiplas vias, na linhagem MCF-7.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *APEX1*, *STAT3* e *c-FOS* quantificados por RT-qPCR da linhagem MCF-7 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 20 μ M e Stattic na concentração de 30 μ M, individualmente, e combinados na concentração de 4 e 10 μ M de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta$ CT.

Fonte: A autora, 2024.

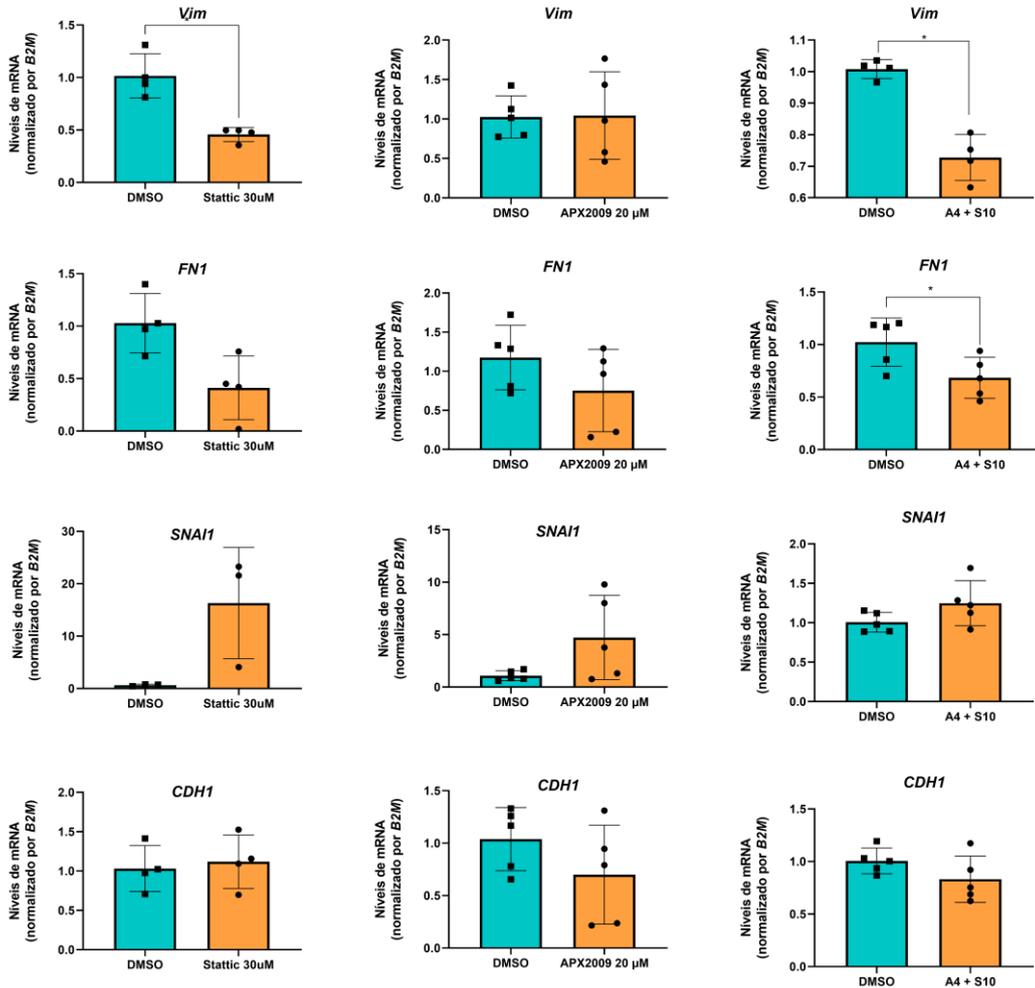
Figura 36-Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam a migração e invasão, na linhagem MCF-7.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *Rhou*, *FSCN1* e *MMP9* quantificados por RT-qPCR da linhagem MCF-7 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 20 μM e Stattic na concentração de 30 μM, individualmente, e combinados na concentração de 4 e 10 μM de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta CT$.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 37- Efeito dos inibidores Stattic e APX2009, isolados ou combinados, nos níveis de mRNA de genes que regulam classicamente a transição epitélio-mesenquimal, na linhagem MCF-7.



Legenda: Níveis de mRNA dos genes *VIM* (vimentina), *FN1* (fibronectina), *SNAI1* (Snail) e *CDH1* (E-CAD) quantificados por RT-qPCR da linhagem MCF-7 após o tratamento com os inibidores APX2009, na concentração de 20 μ M e Stattic na concentração de 30 μ M, individualmente, e combinados na concentração de 4 e 10 μ M de APX2009 e Stattic respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle. A quantificação foi normalizada pelo gene *B2M*, e o cálculo foi realizado pelo método $\Delta\Delta$ CT.

Fonte: A autora, 2024.

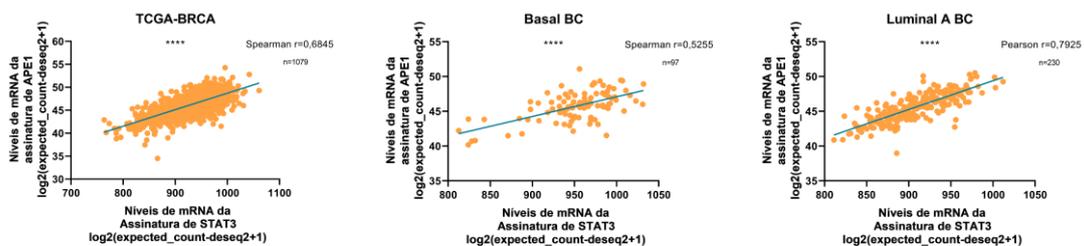
4.9. Correlação entres os níveis de mRNA das assinaturas de atividade de STAT3 e da atividade redox de APE1

Para comparar os dados obtidos *in vitro* com dados de pacientes com câncer de mama, foi utilizado o banco de dados TCGA TARGET GTEx através da plataforma UCSC XENA. Deste banco, foram selecionadas as amostras de tumor primário (TCGA-BRCA) de pacientes do sexo

feminino. Foram realizadas análises de correlação entre os níveis de mRNA de uma assinatura gênica de atividade redox de APE1 e de atividade de STAT3 para avaliar se esses fatores são associados clinicamente. Além disso, as amostras foram divididas de acordo com o subtipo tumoral (PAM50), sendo feita a comparação entre os subtipos Luminal A e Basal, visto que eles representam respectivamente as linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

Os resultados demonstram que existe uma correlação positiva de moderada a forte entre as assinaturas de atividade redox de APE1 e de atividade de STAT3, sugerindo uma associação entre essas sinalizações, no câncer de mama. O subtipo luminal A foi o que apresentou maior nível de correlação, sendo classificada como forte, o que pode indicar uma maior interação entre a sinalização redox de APE1 e STAT3 neste subtipo (Fig. 38).

Figura 38- Correlação dos níveis de mRNA da assinatura da atividade redox de APE1 e da atividade de STAT3 em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama.



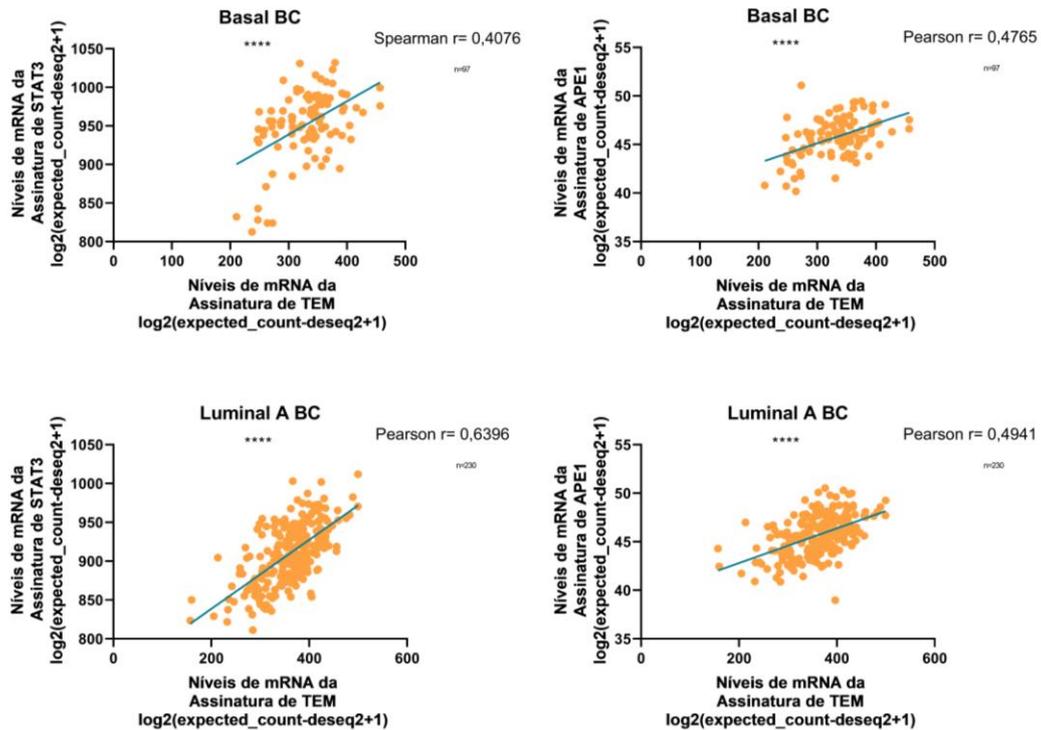
Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 com os níveis da assinatura de atividade de STAT3 em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. As análises foram feitas em todas as amostras de câncer de mama (BC), e separadamente no subtipo basal e luminal A. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

4.10. Análise da associação entre os níveis de mRNA das assinaturas de TEM e proliferação e os níveis de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3

Além das assinaturas de APE1 e STAT3, foram realizadas análises de correlação entre os níveis de mRNA dessas assinaturas com os níveis de assinaturas de proliferação celular e transição epitélio-mesênquimal (TEM). Os dados obtidos indicam uma correlação positiva e moderada entre os níveis da assinatura de STAT3 e APE1 com a assinatura de TEM, tanto no subtipo basal quanto no subtipo Luminal A. Sendo a correlação mais forte entre STAT3 e a assinatura de TEM no subtipo Luminal A (Fig. 39).

Figura 39- Correlação entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com os níveis de mRNA da assinatura de TEM em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama.

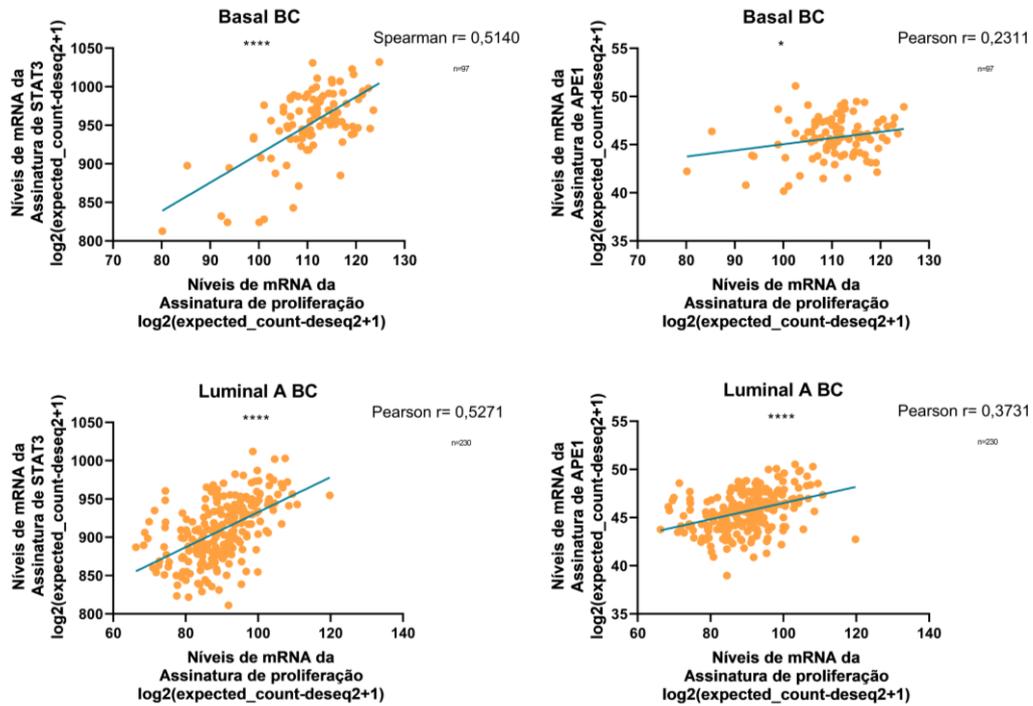


Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de uma assinatura de TEM em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. As análises foram feitas separadamente no subtipo basal e luminal A. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Para a assinatura de proliferação, os dados também indicaram uma correlação positiva de nível fraco a moderado, tanto comparada a assinatura de STAT3 quanto de APE1, em ambos os subtipos de câncer de mama (Fig. 41). Novamente a correlação mais forte foi encontrada entre a assinatura de STAT3 com a assinatura de proliferação, no subtipo Luminal A (Fig. 40).

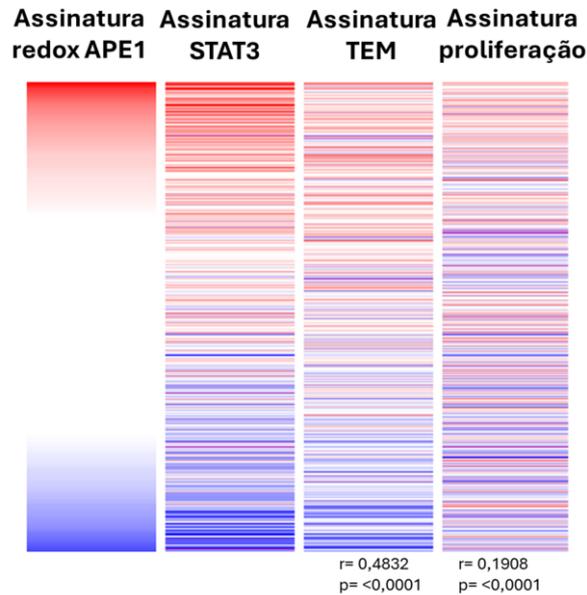
Figura 40- Correlação entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com os níveis de mRNA da assinatura de proliferação em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama.



Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de uma assinatura de proliferação em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. As análises foram feitas separadamente no subtipo basal e luminal A. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 41- *Heatmap* das correlações entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com as assinaturas de proliferação e TEM em amostras de câncer de mama.

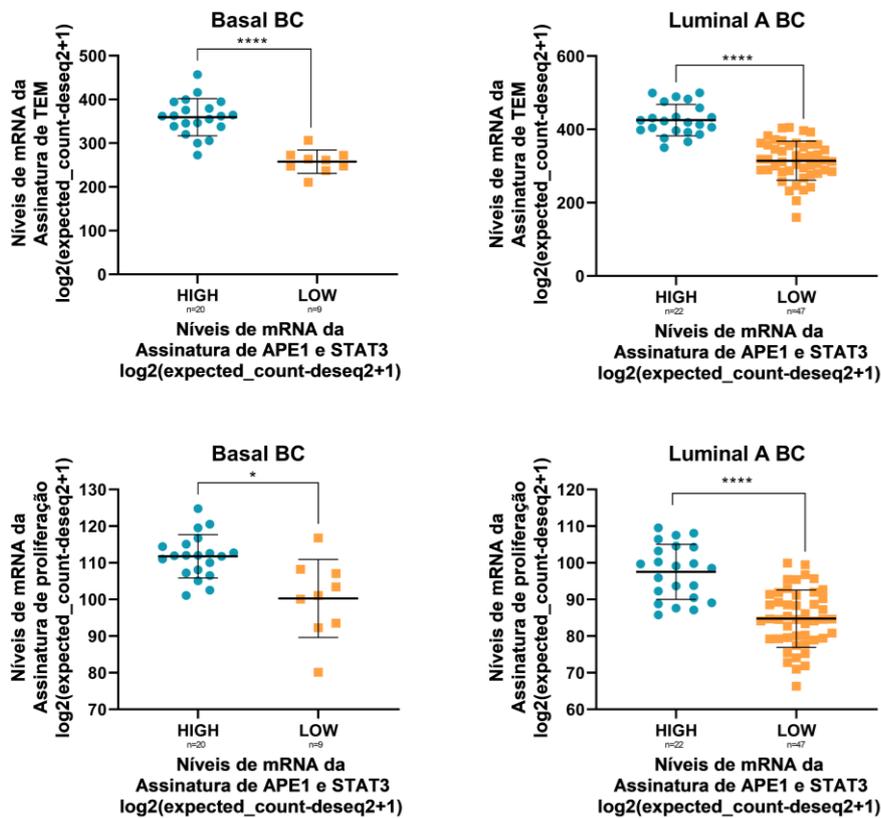


Legenda: *Heatmap* da correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de uma assinatura de proliferação e de TEM em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Para avaliar o papel da sinalização e interação entre a atividade redox de APE1 e STAT3 nos níveis das assinaturas de proliferação e TEM, as amostras foram separadas em grupos de alta expressão das assinaturas de STAT3 e APE1 (*HIGH*) e baixa expressão (*LOW*). Nossos resultados mostraram que as amostras que exibem alta expressão tanto da assinatura de APE1 quanto de STAT3 também exibem altos níveis de mRNA das assinaturas de TEM e proliferação, no subtipo basal e luminal A (Fig. 42).

Figura 42-Níveis de mRNA das assinaturas de proliferação e de TEM de acordo com os níveis das assinaturas de STAT3 e APE1 combinadas em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama.



Legenda: Correlação a nível de mRNA em pacientes com alta e baixa expressão de ambas as assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de uma assinatura de TEM e de proliferação em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. As análises foram feitas separadamente no subtipo basal e luminal A. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,0001$ (****).

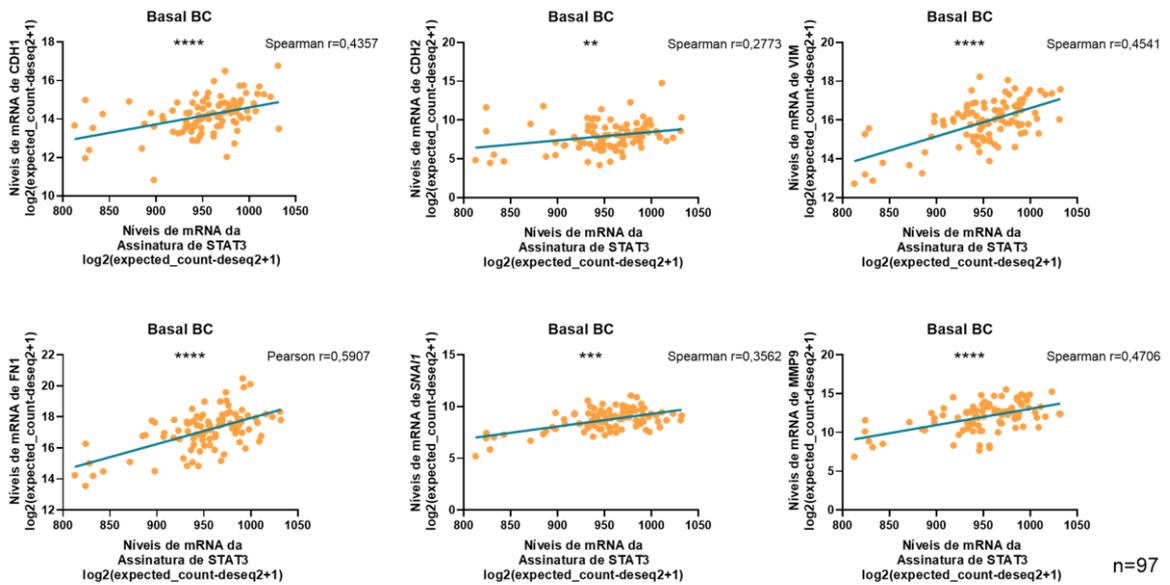
Fonte: A autora, 2024.

4.11. Análise dos níveis de mRNA dos genes relacionados a sobrevivência, migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal em relação aos níveis de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3

A plataforma XENA também foi utilizada para avaliar os níveis de mRNA dos genes analisados *in vitro*, com o objetivo de comparar os dados obtidos nas linhagens celulares com amostras de pacientes com câncer de mama dos subtipos correspondentes, basal e luminal A. Além disso foram utilizadas assinaturas de atividade redox de APE1 e atividade de STAT3, para simular a sinalização dessas proteínas.

No subtipo de câncer de mama basal, foi observada uma correlação positiva de nível fraco a moderado, da assinatura de STAT3 com os genes que regulam positivamente o processo de TEM, como *CDH2*, *Vim*, *FNI*, *MMP9* e *SNAI1*, e negativamente como *CDH1* (Fig. 43). O mesmo foi observado para o subtipo Luminal A, porém as correlações foram positivas de fracas a forte (Fig. 44).

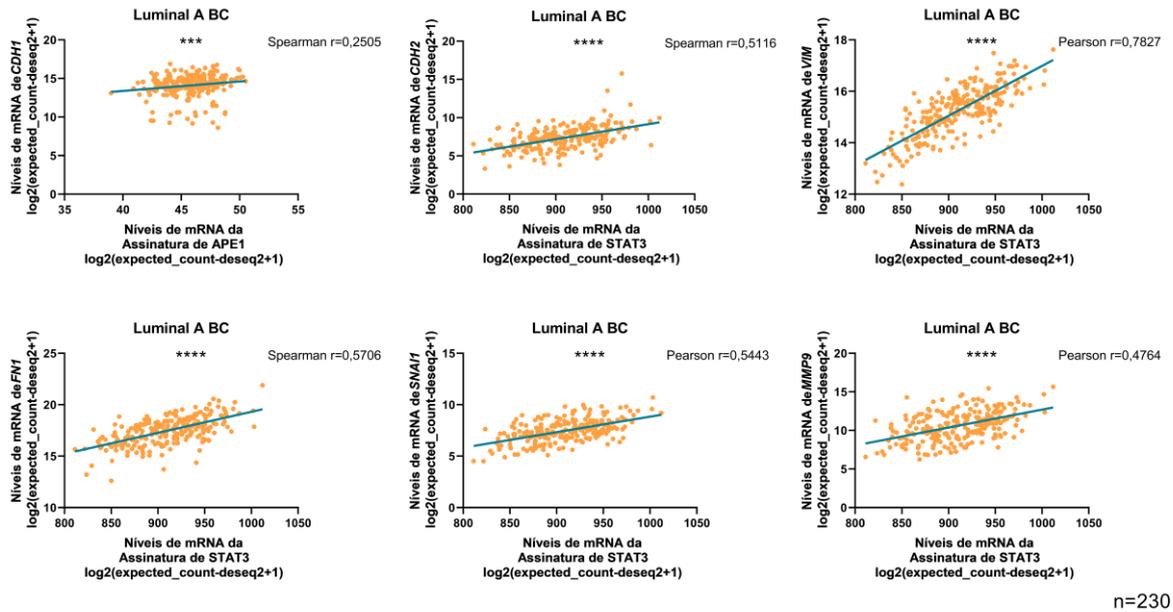
Figura 43-Correlação entre os níveis da assinatura de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo basal.



Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade de STAT3 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do subtipo basal do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 44-Correlação entre os níveis da assinatura de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo luminal A.

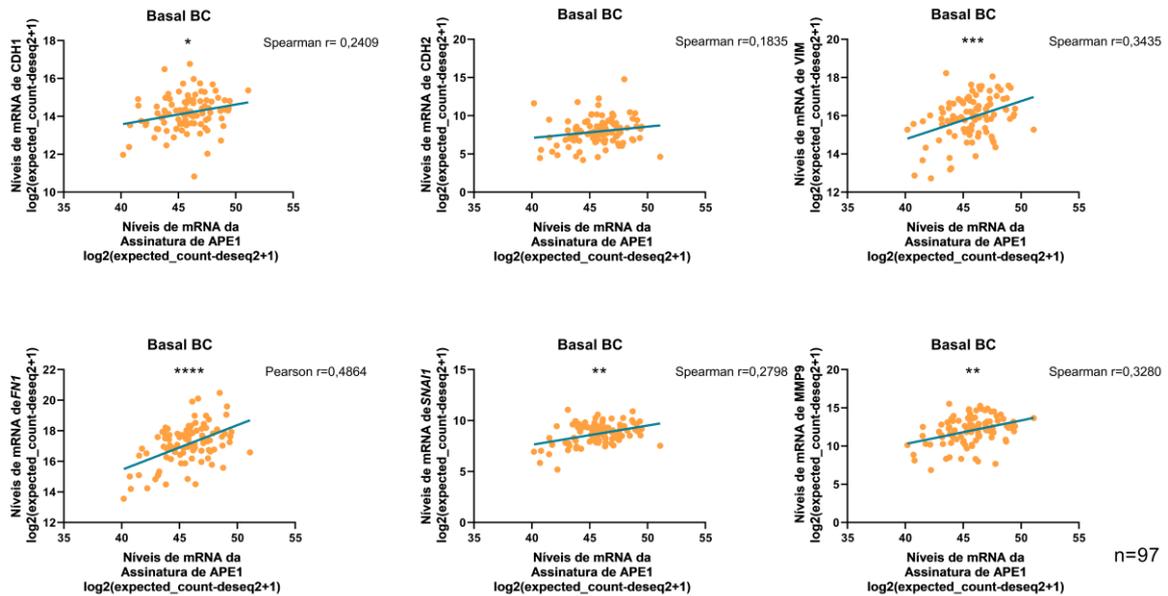


Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade de STAT3 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do subtipo luminal A do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Já para a assinatura de APE1, no subtipo basal foram encontradas correlações positivas de fracas a moderadas nos genes *CDH1*, *Vim*, *FNI*, *MMP9* e *SNAI1* (Fig. 45).

Figura 45-Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo basal.

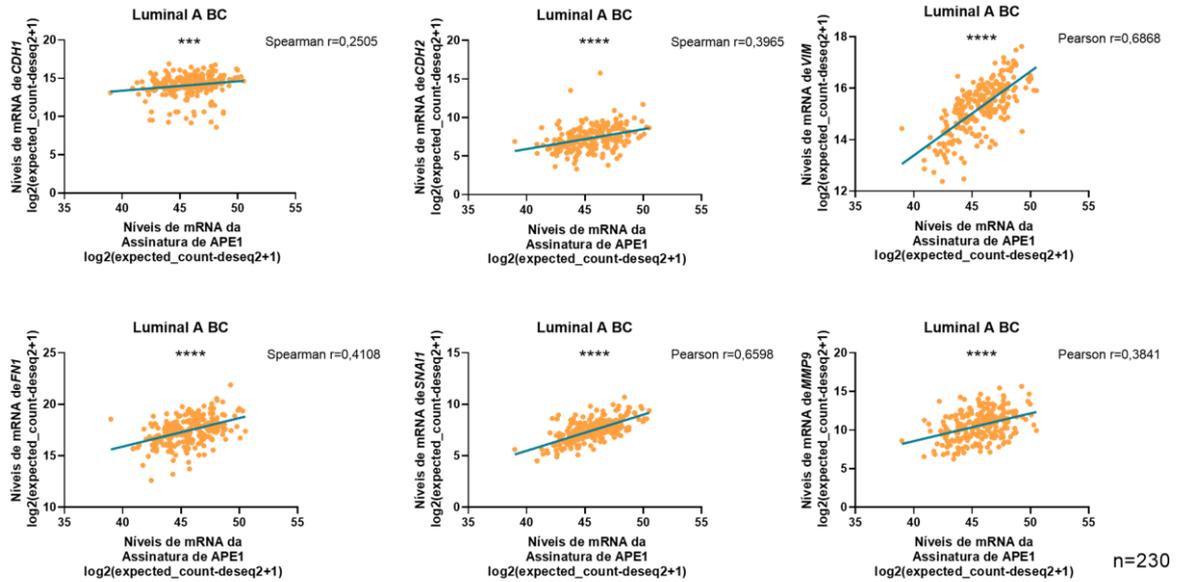


Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do subtipo basal do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***) e $p<0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Enquanto que no subtipo Luminal A, as correlações encontradas com a assinatura de APE1 foram de fracas a moderadas em todos os genes analisados que participam da regulação do processo de TEM (Fig. 46).

Figura 46-Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 com os níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo luminal A.

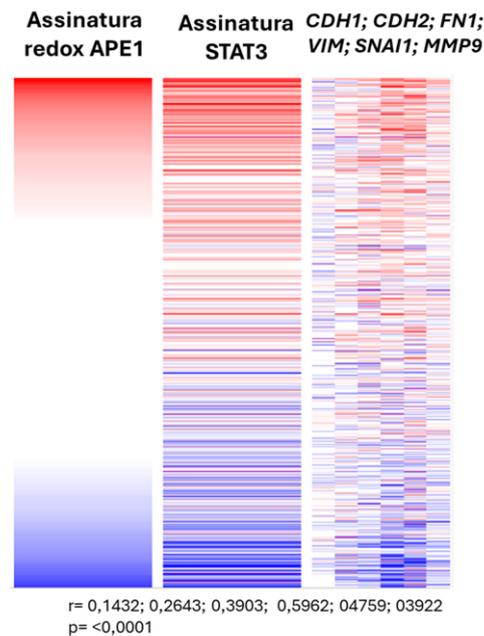


Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do subtipo luminal A do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

O *heatmap* abaixo demonstra as correlações positivas encontradas entre as assinaturas de APE1 e de STAT3 com os genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama (Fig. 47).

Figura 47- *Heatmap* das correlações entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama.

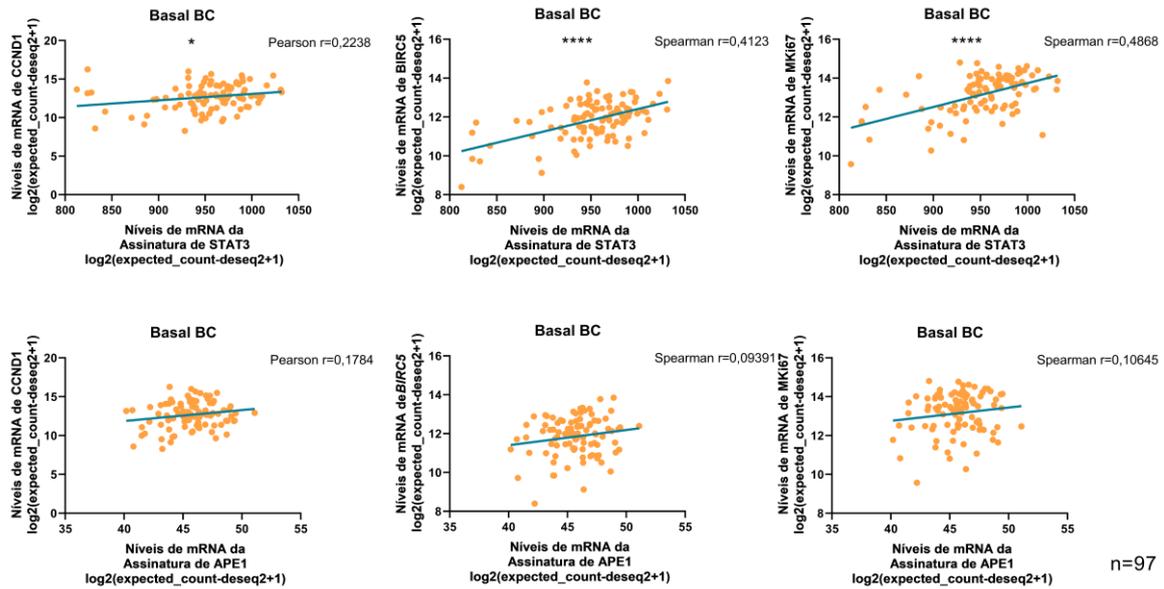


Legenda: *Heatmap* da correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,0001$ (***).

Fonte: A autora, 2024.

Para os processos de proliferação e sobrevivência, foi observado que no subtipo basal existe uma correlação positiva, de níveis fraco a moderado, da assinatura de STAT3 com os genes *MKi67*, *BIRC5* e *CCND1* (Fig. 48). Entretanto, neste subtipo não foram observadas correlações significativas entre a assinatura de APE1 e os genes analisados (Fig. 48).

Figura 48-Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais do subtipo basal.

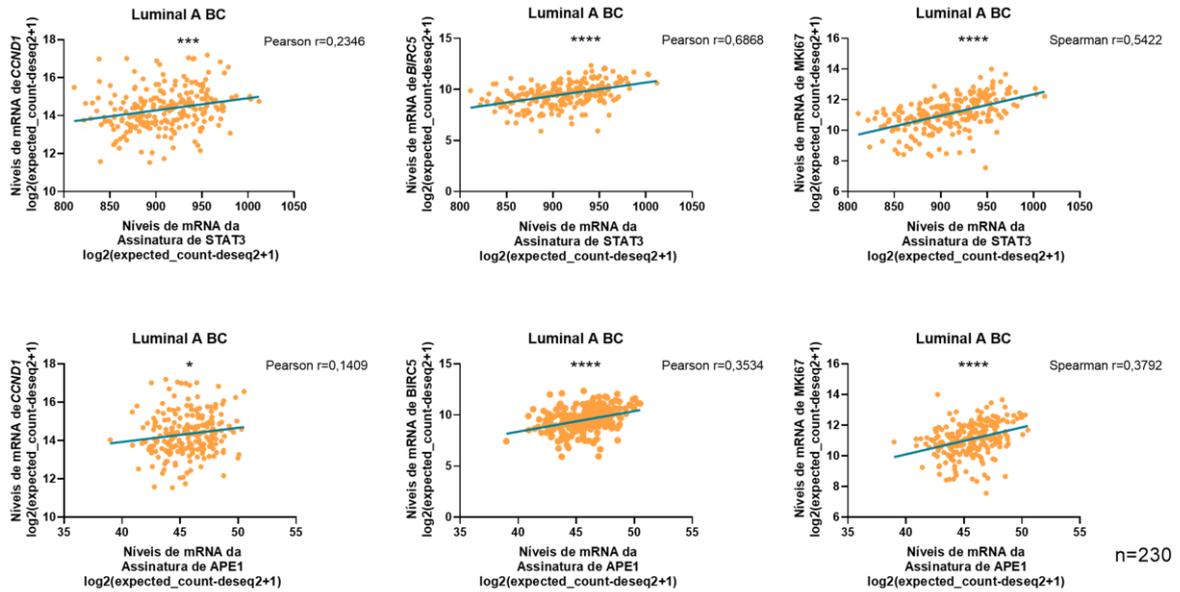


Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 separadamente com os níveis de mRNA dos genes que regulam a proliferação e sobrevivência em amostras de câncer de mama do subtipo basal do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Em contrapartida no subtipo luminal A, tanto a assinatura de STAT3 quanto de APE1 se correlacionam positivamente, de fraca a moderada, com os genes analisados, *MKI67*, *BIRC5* e *CCND1* (Fig. 49).

Figura 49-Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais do subtipo luminal A.

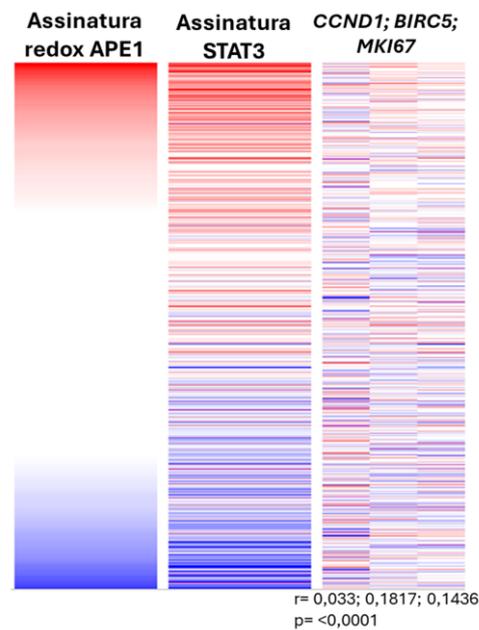


Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 separadamente com os níveis de mRNA dos genes que regulam a proliferação e sobrevivência em amostras de câncer de mama do subtipo luminal A do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024

O *heatmap* abaixo demonstra as correlações positivas encontradas entre as assinaturas de APE1 e de STAT3 com os genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras de câncer de mama (Fig. 50).

Figura 50- Heatmap das correlações entre os níveis de mRNA das assinaturas de APE1 e STAT3 com genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras de câncer de mama.

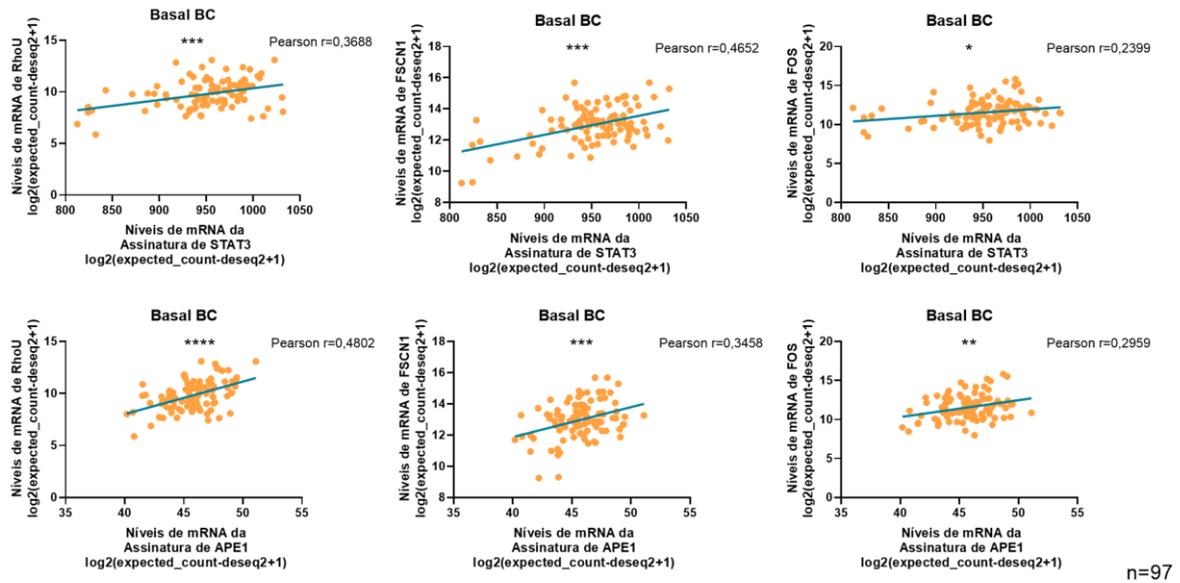


Legenda: *Heatmap* da correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Os genes que regulam os processos de migração, *RHOU* e *FSCN1*, além de *FOS*, alvo de STAT3, também são positivamente correlacionados com as assinaturas de STAT3 e APE1, nos subtipos Basal (Fig. 51) e Luminal A (Fig. 52), demonstrado também pelo *heatmap* de correlações (Fig. 53).

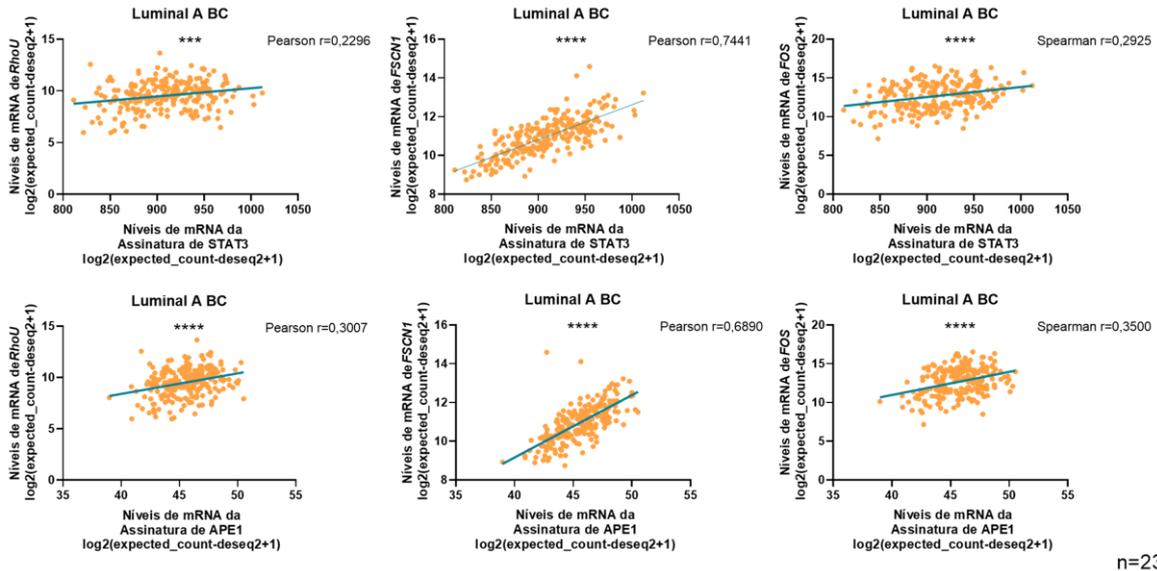
Figura 51-Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a migração celular em amostras tumorais do subtipo basal.



Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 separadamente com os níveis de mRNA dos genes que regulam a migração, além de *c-FOS* (*FOS*) em amostras de câncer de mama do subtipo basal do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

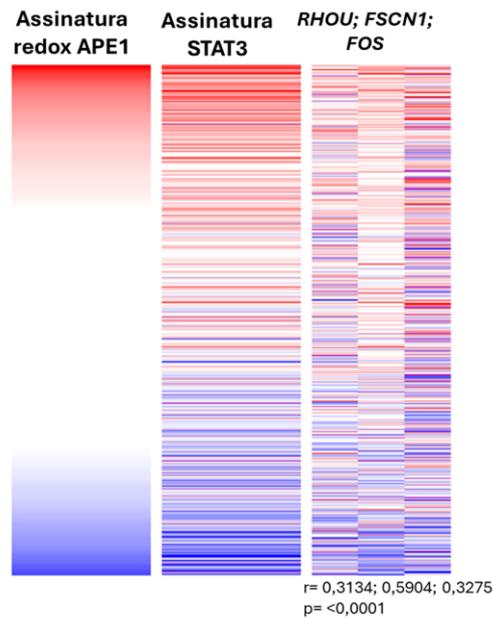
Figura 52-Correlação entre os níveis da assinatura redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA de genes que regulam a migração celular em amostras tumorais do subtipo luminal A.



Legenda: Correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 separadamente com os níveis de mRNA dos genes que regulam a migração, além de *c-FOS* (*FOS*) em amostras de câncer de mama do subtipo luminal A do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de (**), $P<0,001$ (***) e $p<0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 53- Heatmap das correlações entre as assinaturas de APE1 e STAT3 e os genes que regulam a migração em amostras de câncer de mama.

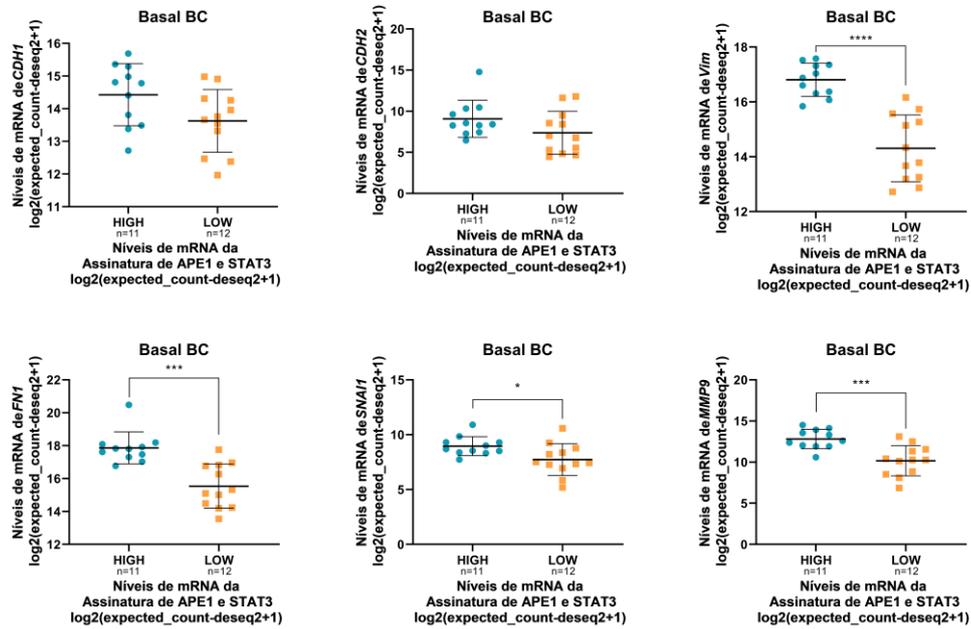


Legenda: *Heatmap* da correlação a nível de mRNA das assinaturas de atividade redox de APE1 e assinatura de atividade de STAT3 com os níveis de genes que regulam a migração celular em amostras de câncer de mama do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,0001$ (***).

Fonte: A autora, 2024.

Além de analisar a influência das sinalizações de STAT3 e APE1 isoladamente nos genes que regulam a TEM, proliferação e migração celular, foi realizada uma análise dos níveis desses genes em amostras que possuem uma alta expressão concomitantemente das duas assinaturas, comparada a amostras que possuem baixa expressão. Com isso os resultados indicaram que amostras que possuem altos níveis das duas assinaturas exibem significativamente altos níveis de genes que regulam positivamente a TEM, como *VIM*, *FNI*, *SNAIL* e *MMP9* no subtipo basal (Fig. 54). E altos níveis de todos os genes analisados, sendo *CDH1*, como marcador epitelial, e *CDH2*, *VIM*, *FNI*, *MMP9* e *SNAIL*, como marcadores mesenquimais, reguladores positivos da TEM no subtipo luminal A (Fig. 55).

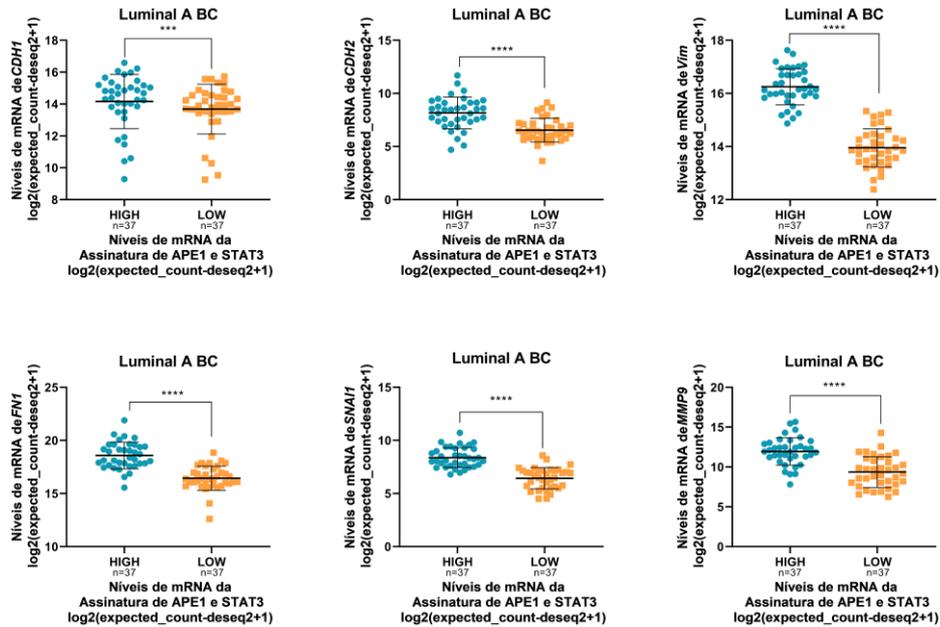
Figura 54- Níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo basal de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3.



Legenda: Correlação a nível de mRNA em pacientes com alta e baixa expressão de ambas as assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do subtipo basal do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*), $P < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 55-Níveis de mRNA de genes que regulam a TEM em amostras tumorais do subtipo luminal A de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3.

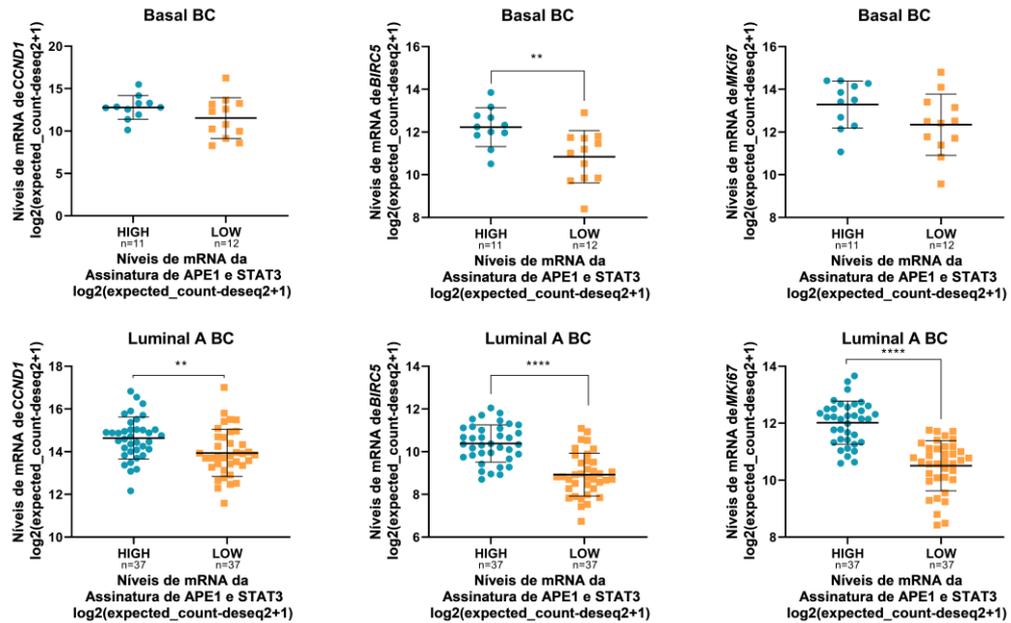


Legenda: Correlação a nível de mRNA em pacientes com alta e baixa expressão de ambas as assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a TEM em amostras de câncer de mama do subtipo luminal A do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $P < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

Além disso essas amostras também exibem altos níveis de genes que regulam positivamente a sobrevivência e proliferação, como *BIRC5*, no subtipo basal, *CCND1*, *BIRC5* e *MKi67* no subtipo Luminal A (Fig. 56).

Figura 56- Níveis de mRNA de genes que regulam a proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais do subtipo basal e luminal A de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3.

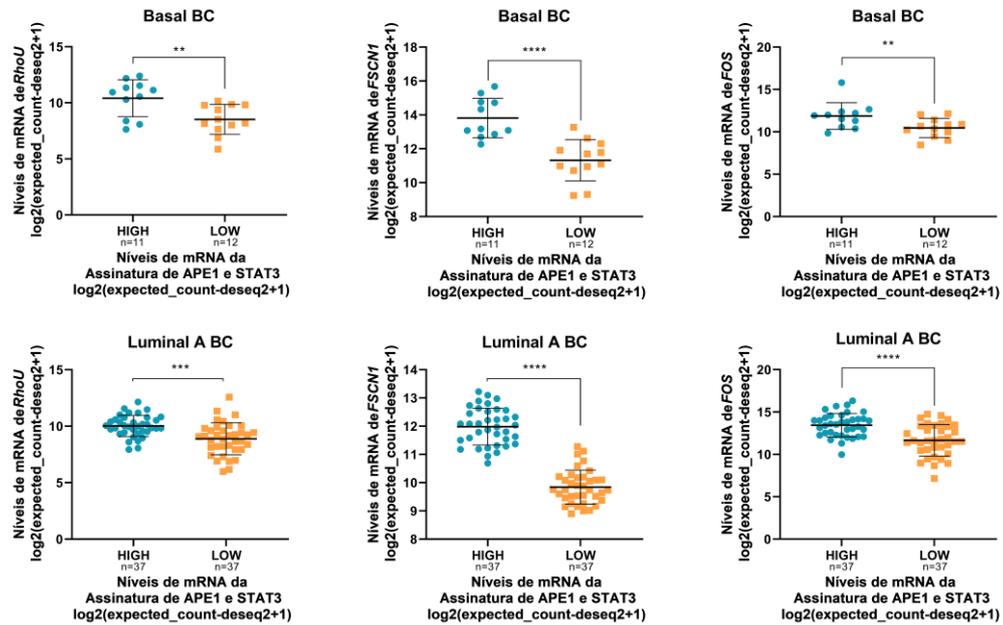


Legenda: Correlação a nível de mRNA em pacientes com alta e baixa expressão de ambas as assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a proliferação e sobrevivência em amostras de câncer de mama do subtipo basal e luminal A do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ (*), $P < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Fonte: A autora, 2024.

E dos genes que regulam positivamente a migração, *RHOU* e *FSCN1*, além de *FOS*, em ambos os subtipos (Fig. 57).

Figura 57-Níveis de mRNA de genes que regulam a migração celular em amostras tumorais do subtipo basal e luminal A de acordo com os níveis das assinaturas de APE1 e STAT3.



Legenda: Correlação a nível de mRNA em pacientes com alta e baixa expressão de ambas as assinaturas de atividade redox de APE1 e de STAT3 com os níveis de mRNA dos genes que regulam a migração, além de *FOS* em amostras de câncer de mama do subtipo basal e luminal do TCGA, através da plataforma UCSC XENA. A correlação foi estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

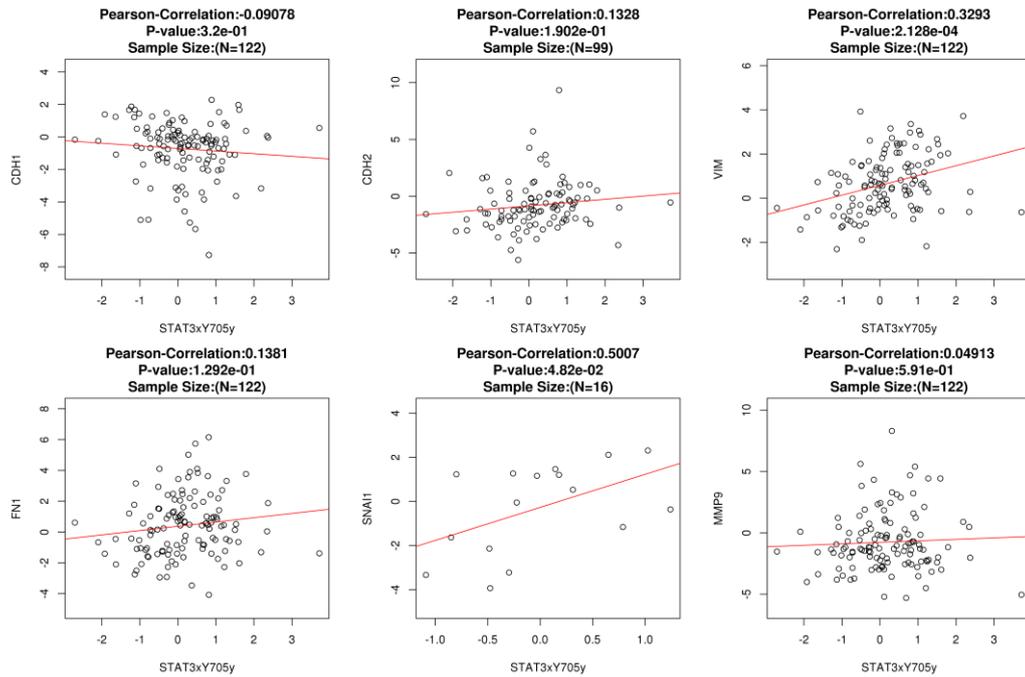
Fonte: A autora, 2024.

4.12. Análise de correlação entre os níveis de proteínas que regulam a sobrevivência celular, migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal e os níveis de fosforilação de STAT3

STAT3 é uma proteína que se torna ativa e realiza suas funções após ser fosforilada (Ma *et al.*, 2020). Com isso, além de utilizar uma assinatura relacionada a atividade de STAT3, também foram analisados os níveis de STAT3 fosforilado em resíduos de tirosina (Tyr-705), através da plataforma LinkedOmics, em pacientes com câncer de mama do banco de dados CPTAC BRCA. Para avaliar os níveis de fosforilação de STAT3 e os níveis de proteínas relacionadas, os dados foram submetidos a uma análise de correlação.

Os níveis de STAT3 fosforilado são de forma significativa, positivamente correlacionados com os níveis proteicos do marcador mesenquimal, Vimentina e do fator de transcrição promotor de TEM, Snail (Fig. 58).

Figura 58-Correlação entre os níveis de STAT3 fosforilado com os níveis proteínas que regulam a TEM em amostras tumorais de câncer de mama.

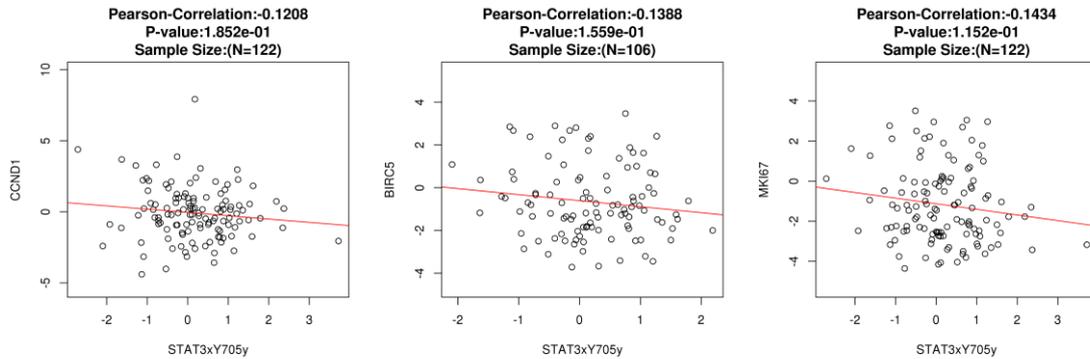


Legenda: Níveis de STAT3 fosforilado no resíduo Y705 em amostras de pacientes com câncer de mama do banco de dados CPTAC, através da plataforma LinkedOmics, correlacionado com os níveis de proteínas que regulam a TEM. O valor de p foi considerado significativo com valores $p < 0,05$.

Fonte: LinkedOmics, 2024.

Em contrapartida, os níveis de STAT3 fosforilado não exibem uma correlação significativa com os níveis das proteínas que regulam positivamente a proliferação e sobrevivência, *CCND1*, *BIRC5* e *MKi67* (Fig. 59).

Figura 59- Correlação entre os níveis de STAT3 fosforilado com os níveis de proteínas que regulam processos de proliferação e sobrevivência celular em amostras tumorais de câncer de mama.

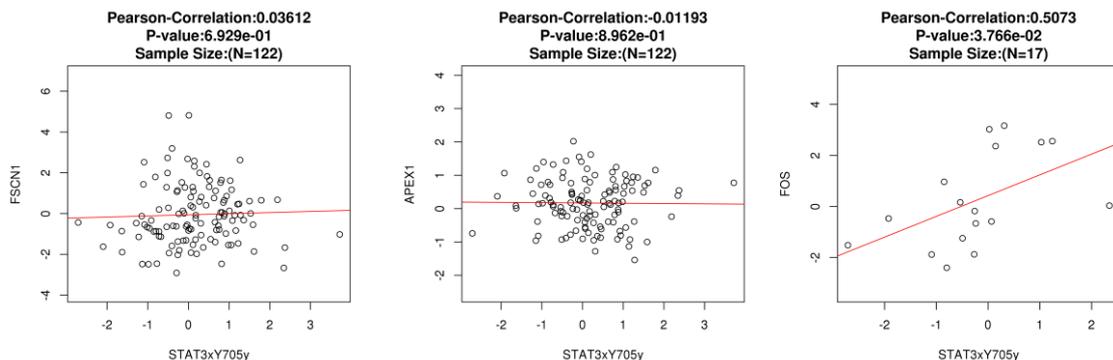


Legenda: Níveis de STAT3 fosforilado no resíduo Y705 em amostras de pacientes com câncer de mama do banco de dados CPTAC, através da plataforma LinkedOmics, correlacionado com os níveis de proteínas que regulam a proliferação e sobrevivência. O valor de p foi considerado significativo com valores $p < 0,05$.

Fonte: LinkedOmics, 2024.

Além disso, STAT3 fosforilado é positivamente correlacionado com seu alvo C-FOS, mas não exibe correlação significativa com os níveis de proteínas de fascina 1 (*FSCN1*) e APE1 (*APEX1*). O banco de dados não possui informações de níveis proteicos de RHOA (Fig. 60).

Figura 60- Correlação entre os níveis de STAT3 fosforilado com os níveis de proteínas que regulam diversos processos em amostras tumorais de câncer de mama.



Legenda: Níveis de STAT3 fosforilado no resíduo Y705 em amostras de pacientes com câncer de mama do banco de dados CPTAC, através da plataforma LinkedOmics, correlacionado com os níveis de proteínas que regulam diversos processos, como migração (*FSCN1*), alvos de STAT3 (*FOS*) e APE1. O valor de p foi considerado significativo com valores $p < 0,05$.

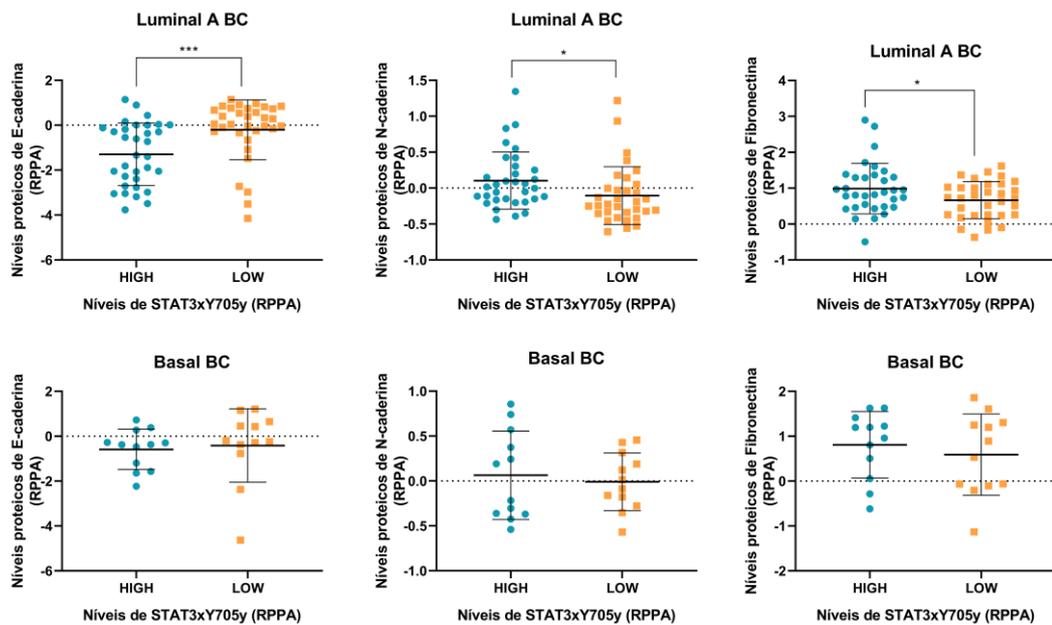
Fonte: LinkedOmics, 2024.

O banco de dados TCPA também foi utilizado para analisar os níveis de STAT3 fosforilado, pela opção de separar as amostras em subtipos basal e luminal A. Entretanto esse banco de dados não oferece informações e quantificação de todas as proteínas, portanto só foi

possível realizar a análise dos níveis de E-caderina (CDH1), N-caderina (CDH2) e fibronectina, proteínas que regulam a TEM.

Os resultados indicam que no subtipo luminal A, os níveis de STAT3 fosforilado estão diretamente relacionados aos níveis de proteínas que regulam positivamente o fenótipo mesenquimal, como a n-caderina e fibronectina, que exibem maiores níveis em amostras com altos níveis de STAT3 fosforilado. E está inversamente relacionado a proteínas que regulam o fenótipo epitelial, como a e-caderina, que exibe menores níveis em amostras com altos níveis de STAT3 (Fig. 61).

Figura 61- Níveis de proteínas que regulam a TEM de acordo com os níveis de STAT3 fosforilado em amostras de câncer de mama.



Legenda: Níveis proteicos de e-caderina, n-caderina e fibronectina de acordo com os níveis de STAT3 fosforilado no resíduo Y705 em amostras de pacientes com câncer de mama do banco de dados TCPA. O valor de p foi considerado significativo com valores $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (***)

Fonte: A autora, 2024.

5. DISCUSSÃO:

Apesar dos avanços nos tratamentos de neoplasias, ainda são numerosos os casos em que os tumores se tornam resistentes às terapias convencionais (LIN-RAHARDJA *et al.*, 2023). Nesse contexto, é essencial a identificação de possíveis proteínas que possam ser utilizadas como alvos adicionais para o tratamento contra o câncer. Diversos estudos indicam que o uso combinado de diferentes compostos pode contribuir para o tratamento do câncer, aumentando sua eficácia, levando à redução da proliferação e de características agressivas dos tumores (LIN-RAHARDJA *et al.*, 2023). Além disso, a terapia alvo, baseada no uso de compostos que visam proteínas diferencialmente expressas nos tumores, é uma importante estratégia para o tratamento do câncer (LEE; TAN; OON, 2018). No câncer de mama, os tumores triplo negativos, que não expressam os receptores hormonais, seguem sem um alvo específico para seu tratamento. No entanto, os tumores luminais, que expressam os receptores de estrogênio e progesterona, apesar de se beneficiarem da terapia hormonal, em estágios avançados podem se tornar agressivos e resistentes ao tratamento (FISUSI; AKALA, 2019; YE *et al.*, 2023). Apesar de existirem fármacos e protocolos clínicos voltados ao tratamento de câncer de mama, essa ainda é uma doença que tem elevado número de óbitos e requer atenção quanto às novas e eficazes propostas terapêuticas.

Dessa forma, a proteína STAT3 é estudada em diferentes tipos tumorais, incluindo o câncer de mama, pelo seu papel em promover processos de proliferação, sobrevivência, angiogênese e metástase. STAT3 é um dos fatores de transcrição que pode ser coativado pela proteína APE1 (MA; QIN; LI, 2020). APE1 é amplamente estudada pela sua função de reparo de DNA pela via de BER, entretanto, sua função redox, capaz de regular a coativação de fatores de transcrição, tem sido elencada como um importante alvo contra o câncer, pela sua capacidade de regular fatores envolvidos com a progressão tumoral (SIQUEIRA *et al.*, 2024b).

Tanto APE1 quanto STAT3 têm sua expressão a nível de mRNA aumentada e também altos níveis proteicos em tecidos tumorais comparado a tecidos não tumorais, e estão superexpressas no câncer de mama. Anteriormente, demonstramos que linhagens de câncer de mama com diferentes níveis de malignidade e diferentes subtipos, tratadas com o inibidor redox de APE1, APX2009, combinado com o inibidor de STAT3, Stattic, têm a viabilidade celular reduzida. Entretanto, os efeitos desses compostos sobre a proliferação, morte e processos de agressividade celular ainda não foram elucidados no câncer de mama. Portanto nosso objetivo

foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos na inter-relação entre APE1 e STAT3, e a importância dessa sinalização para a agressividade, em modelos celulares de câncer de mama.

Para avaliar o papel do domínio redox de APE1 e de STAT3 no câncer de mama, foram utilizadas duas linhagens com perfis moleculares e de agressividade diferentes, sendo a MCF-7 uma linhagem de câncer de mama do subtipo Luminal A, considerada menos agressiva e a linhagem MDA-MB-231, do subtipo Basal, considerada triplo negativa e com maior nível de agressividade.

Somente dois trabalhos avaliaram o efeito da inibição do domínio redox de APE1 em câncer de mama, e nenhum avaliou o efeito da inibição redox de APE1 com a inibição de STAT3 neste tipo tumoral (GUERREIRO *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2024). Nosso grupo observou que o tratamento de células de câncer de mama com o inibidor redox APX2009 é capaz de reduzir a viabilidade celular, e que a linhagem MDA-MB-231 se mostrou mais sensível ao tratamento com 10 μM , comparada a linhagem MCF-7, em que o efeito só é significativo a partir de concentração maior de 50 μM (SIQUEIRA *et al.*, 2024a). Apesar de a concentração para reduzir a viabilidade da MCF-7 ser maior, o IC50 do APX2009 é próximo entre as duas linhagens. Esse efeito sugere que o APX2009 é um inibidor mais potente que o E3330, que isoladamente não foi capaz de reduzir a viabilidade celular da MDA-MB-231 (GUERREIRO *et al.*, 2017).

Para avaliar uma possível associação entre APE1 e STAT3 no câncer de mama, realizamos o tratamento combinado entre APX2009 e Stattic, nas concentrações de 20 e 30 μM , respectivamente em ambas as linhagens. Na MDA-MB-231, a combinação foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular do que os tratamentos isolados. Enquanto que para a linhagem MCF-7, os dois compostos que isoladamente não tinham efeito, passaram a reduzir a viabilidade celular comparado ao controle e aos tratamentos sozinhos. Para analisar se este efeito foi aditivo ou sinérgico calculamos o índice de combinação dos compostos, obtendo valores abaixo de 1, sugerindo sinergismo. A combinação da inibição redox de APE1 e STAT3, utilizando outros inibidores já foi testada em outros tipos tumorais, como pâncreas, colón e glioblastoma, e os autores também identificaram um efeito sinérgico na inibição dessas duas proteínas na redução da viabilidade celular (CASTON *et al.*, 2021). Além disso, testamos os efeitos dos inibidores em uma linhagem não tumoral, HEK293-T, para avaliar seus possíveis efeitos adversos. Nossos resultados indicaram que tanto APX2009, na concentração de 20 μM , quanto Stattic, na concentração de 30 μM , foram capazes de reduzir a viabilidade celular dessa linhagem, comparado ao controle. Entretanto essas concentrações não atingem o IC50, o que sugere que esses inibidores sejam mais seletivos contra as células tumorais de mama. Diversos

estudos observaram maiores níveis de APE1 em células ou tecidos tumorais, comparado a não tumorais, indicando que o tumor seja mais dependente dessa sinalização (JIANG *et al.*, 2010).

Já para a proliferação celular, Guerreiro *et al.*, demonstrou pelo ensaio de formação de colônia, que o inibidor redox E3330 a 30 μM não foi capaz de reduzir a proliferação da linhagem MDA-MB-231 isoladamente, somente quando combinado com Docetaxel (GUERREIRO *et al.*, 2017). Entretanto nosso grupo mostrou que o inibidor APX2009 foi mais potente em reduzir o potencial de formação de colônias da linhagem MDA-MB-231 e também da MCF-7, na concentração de 4 μM . Isoladamente, o Stattic também foi capaz de reduzir o potencial de formação de colônias de ambas as linhagens, porém diferentemente do resultado de viabilidade celular, a linhagem MCF-7 se mostrou mais sensível à inibição, comparada com a MDA-MB-231. Para esse ensaio, as células são tratadas com os inibidores em baixa confluência, o que pode ter levado a uma maior sensibilidade da MCF-7, visto que essa linhagem tem a tendência de formar grupos celulares e depender das interações célula-célula para se estabelecer. Na linhagem MDA-MB-231, os dois compostos em concentrações que não foram significativas isoladamente, 0,16+0,6 μM , passam a ter um efeito significativo em reduzir a formação de colônias comparado ao controle. Para a linhagem MCF-7, a combinação 0,16+0,6 μM também foi mais eficaz em reduzir a formação de colônias, comparado tanto ao controle quanto aos tratamentos isolados, sugerindo novamente uma associação entre APE1 e STAT3, e que uma terapia alvo contra ambas as proteínas pode ser mais eficaz no câncer de mama. Nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar o efeito combinado dos inibidores APX2009 e Stattic em reduzir o potencial de formação de colônias de células tumorais de mama.

Visto os efeitos dos inibidores APX2009 e Stattic na redução da proliferação e viabilidade celular, investigamos o mecanismo de morte que poderia ser ativado após os tratamentos. Nós mostramos que isoladamente, o tratamento com APX2009 é capaz de levar as células MDA-MB-231 à morte celular por apoptose a partir da concentração de 10 μM , à apoptose tardia a partir da concentração de 20 μM e não leva à morte celular por necrose. Entretanto na linhagem MCF-7, esse composto só foi capaz de provocar morte celular por apoptose na concentração de 50 μM , e não foram identificadas apoptose tardia e necrose. Outros estudos já demonstraram que a inibição redox de APE1 leva células tumorais à morte celular por apoptose. Fishel *et al* observaram que os inibidores redox APX2009 e APX2014 levam ao aumento de apoptose em células tumorais de bexiga, pelo aumento da produção de caspase 3/7 (FISHEL *et al.*, 2019).

Já para a inibição de STAT3, o tratamento da linhagem MDA-MB-231 com 30 μM Stattic levou a um aumento significativo de apoptose e apoptose tardia comparado ao controle,

e não provocou necrose. Em contrapartida, na linhagem MCF-7, este inibidor sozinho não foi capaz de provocar, significativamente, morte celular por apoptose inicial, entretanto foram detectadas apoptose tardia e necrose na concentração de 30 μM , e a necrose na concentração de 60 μM . A necrose também foi observada pelo ensaio de LDH, o qual indicou aumento nos níveis de LDH indicando necrose na concentração de 90 μM de Stattic. Outros estudos indicam que o Stattic é capaz de levar à morte por apoptose, em células de câncer de pâncreas (GUO *et al.*, 2022), e Schust *et al* também demonstraram, na linhagem MDA-MB-231, que esse inibidor é capaz de levar células tumorais dependentes da sinalização de STAT3, a morte por apoptose (SCHUST *et al.*, 2006). Apesar de nossos resultados indicarem morte para a linhagem MCF-7, outros estudos identificaram que essa linhagem parece ser menos dependente e mais resistente à inibição de STAT3, visto que exibe baixos níveis de STAT3 fosforilado (MENCALHA *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2021). No contexto tumoral, a indução de morte por apoptose é um mecanismo mais desejável, comparado à morte por necrose, visto que a apoptose se trata de uma morte programada, que não gera grandes danos às células saudáveis no entorno (D'ARCY, 2019). Dessa forma, os resultados obtidos são promissores, visto que baixas concentrações são capazes de levar à apoptose, enquanto somente as concentrações maiores, provocam morte por necrose.

Apesar de exibir um efeito sinérgico em reduzir a viabilidade de ambas as linhagens, a combinação de APX2009 e Stattic não foi mais eficaz em levar a morte celular das células MDA-MB-231 e MCF-7 do que os tratamentos isolados. Entretanto, esse dado pode indicar que ambos os inibidores regulam os mesmos processos que estão levando à morte celular, ou, além disso, a combinação dos compostos pode estar provocando alterações mais marcantes em outros processos, como ciclo celular, que será avaliado no futuro. Em outros estudos, a inibição da atividade redox de APE1 combinada a inibição de STAT3 teve um efeito significativo em provocar apoptose, entretanto outros inibidores foram utilizados, como E3330 + Stattic, e o efeito foi demonstrado em outros tipos tumorais, como pâncreas (CARDOSO *et al.*, 2012).

Os ensaios de migração e invasão foram realizados para avaliar se os inibidores APX2009 e Stattic, além de terem um importante papel na sobrevivência celular, podem contribuir para a agressividade tumoral. Para avaliar o processo de migração em conjunto, foi realizado o ensaio de *Wound Healing*. Nosso grupo demonstrou que o tratamento isolado com APX2009 foi capaz de reduzir a migração celular das duas linhagens, na concentração de 4 μM para a MDA-MB-231, e uma concentração maior de 20 μM para a linhagem mais resistente, MCF-7 (SIQUEIRA *et al.*, 2024a). Guerreiro *et al* também indicaram que a inibição redox de APE1 leva à redução da migração celular em células de câncer de mama MDA-MB-231,

entretanto utilizando o inibidor E3330, na concentração de 30 μM (GUERREIRO *et al.*, 2017). Esse resultado indica que o inibidor APX2009 pode ser mais potente em reduzir a migração, visto que uma concentração mais baixa já exibiu efeito significativo. Para o tratamento com Stattic, foi visto que as concentrações testadas não foram capazes de reduzir significativamente a migração das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Outros estudos também identificaram que o inibidor Stattic não foi capaz de reduzir a migração celular da linhagem MDA-MB-231, somente em concentrações acima de 10 μM (FONG *et al.*, 2022).

Em contrapartida, em ambas as linhagens o tratamento combinado de APX2009 e Stattic foi capaz de reduzir significativamente a migração celular. As concentrações de 10 μM de Stattic e 0,8 μM de APX2009, que isoladamente não são significativas, diminuíram significativamente a migração da MDA-MB-231 em relação ao controle. E as concentrações de 30 μM de Stattic e 4 μM de APX2009 para a MCF-7, reduziram a migração em relação ao controle e aos tratamentos isolados, sugerindo que o tratamento combinado seja mais eficaz em reduzir a migração celular de células de câncer de mama. Outros estudos sugerem que a inibição redox de APE1 combinada com outro tratamento é mais eficaz na redução de processos como a migração no câncer. Em câncer de mama, Guerreiro *et al* mostraram que o inibidor E3330 combinado com docetaxel reduz significativamente a migração celular da linhagem MDA-MB-231, entretanto esse efeito não foi estatisticamente diferente do tratamento isolado (GUERREIRO *et al.*, 2017). Em outros modelos, como de câncer de pâncreas, foi visto que a combinação de E3330 com o Stattic também foi mais eficaz em reduzir a migração celular comparado ao controle e ao tratamento isolado (CARDOSO *et al.*, 2012). Esses estudos demonstraram efeito utilizando concentrações maiores de E3330 comparado com as concentrações que utilizamos de APX2009, novamente sugerindo que APX2009 seja mais potente que seu precursor E3330.

Outra metodologia utilizada para avaliar a agressividade celular, foi o ensaio de invasão por *Transwell Matrigel*. O tratamento com o inibidor APX2009 foi capaz de reduzir significativamente a invasão celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, nas concentrações de 4 e 20 μM respectivamente. Novamente o inibidor E3330, demonstra ser menos potente, visto que Guerreiro *et al* observaram que 30 μM desse inibidor não foi capaz de reduzir a invasão celular da linhagem MDA-MB-231 (GUERREIRO *et al.*, 2017). O tratamento com Stattic também reduziu significativamente a invasão da linhagem MDA-MB-231 na concentração de 6 μM e da linhagem MCF-7 na concentração de 30 μM . Diferentes concentrações de Stattic, foram capazes de reduzir a invasão celular de outras células de câncer de mama, como a HCC38 caracterizada como triplo negativo (LI *et al.*, 2018). Em

contrapartida, o tratamento combinado na linhagem MDA-MB-231, com 6 μM de Stattic e 0,8 μM de APX2009, reduziu significativamente a invasão em relação ao controle, mas essa redução não foi estatisticamente diferente do tratamento isolado. Já na linhagem MCF-7, o tratamento combinado, nas concentrações de 10 μM de Stattic e 4 μM de APX2009, foi mais eficaz em reduzir a invasão celular, comparado ao controle e aos tratamentos isolados. Guerreiro *et al.*, demonstrou que para a invasão celular o tratamento combinado também é mais eficaz, que comparado ao tratamento com somente E3330 e Docetaxel (GUERREIRO *et al.*, 2017). Além disso, ainda não foi demonstrado por outros estudos o efeito da combinação de inibidor redox de APE1 com inibidor de STAT3 no processo de invasão. Portanto, esses resultados sugerem que tanto APE1 quanto STAT3 são importantes para os processos de migração e invasão celular, contribuindo para a agressividade tumoral, e também fortalecem o potencial terapêutico dos inibidores testados contra o câncer de mama.

Visto que o domínio redox de APE1 atua promovendo a ativação de fatores de transcrição como NF- κB , HIF-1 α e STAT3 em diversos tipos tumorais (SIQUEIRA *et al.*, 2024b), investigamos se essa regulação afeta a atividade transcricional de STAT3 em linhagens de câncer de mama e na linhagem modificada para transfecção, HEK293-T. O ensaio de *gene reporter* indicou que tanto o tratamento com Stattic quanto APX2009 reduz a atividade transcricional de STAT3, quantificada pela redução da luminescência. Anteriormente, foi demonstrado por Fishel *et al.*, que inibidor redox de APE1, E3330, foi capaz de reduzir a atividade transcricional de STAT3, em células de câncer de pâncreas (CARDOSO *et al.*, 2012). E que o APX2009 também diminui a atividade transcricional de STAT3, além de NF κB e AP-1 em células de câncer de bexiga (FISHEL *et al.*, 2019). Esse resultado sugere que o domínio redox seja importante para a atividade de STAT3 como fator de transcrição também no câncer de mama, contribuindo para regulação de processos essenciais para o câncer.

Para investigar os mecanismos moleculares envolvidos com os processos celulares alterados pelo tratamento com APX2009 e Stattic, foram realizadas RT-qPCRs para análise de níveis de mRNA de genes que regulam tais processos. Na linhagem MDA-MB-231, os tratamentos com APX2009 e Stattic, individualmente ou combinados, não foram capazes de alterar a expressão a nível de mRNA dos genes selecionados. Entretanto para a linhagem MCF-7, o tratamento com somente Stattic ou APX2009 levou a uma redução significativa dos níveis de *MKi67*, marcador de proliferação e de vimentina (*VIM*), marcador de Transição epitélio mesenquimal, sugerindo que APE1 e STAT3 sejam importantes reguladores desses processos, e que a alteração na formação de colônia e no processo de invasão celular pode ser mediada por esses genes. Estudos indicam que o tratamento com os inibidores APX2009 e APX2014 em

câncer de bexiga, e APX3330 e APX2009 em próstata, diminuí os níveis de genes relacionados à proliferação e sobrevivência celular, como BIRC5 (survivina) a nível de proteína (MCILWAIN *et al.*, 2018; FISHEL *et al.*, 2019), e a nível de mRNA em pâncreas, pelo inibidor E3330 (CARDOSO *et al.*, 2012). Além disso, APX2009 também diminuí os níveis proteicos de vimentina em cultura 3D de células de câncer pancreático (LOGSDON *et al.*, 2018).

Já o tratamento combinado de APX2009 e Stattic, diminuiu significativamente os níveis de dois marcadores que contribuem para o fenótipo mesenquimal, a fibronectina (*FNI*) e vimentina (*VIM*). *et al* observaram que o tratamento com inibidor redox de APE1, APX2009, combinado com inibidor de STAT3, Napabucasin, reduz ainda mais os níveis de mRNA de BIRC5, comparado aos tratamentos isolados, em células de câncer de pâncreas (CASTON *et al.*, 2021). Apesar de não observarmos alteração nos níveis de mRNA de genes relacionados à proliferação nas linhagens de câncer de mama, nosso trabalho é o primeiro a indicar que a combinação de inibidores de APE1 e STAT3, regulam negativamente os níveis de genes que participam da transição epitélio-mesenquimal, sugerindo uma participação conjunta dessas proteínas em processos de agressividade celular no câncer de mama. Ainda, é necessário avaliar a expressão desses genes a nível de proteína por Western Blot, após os tratamentos, visto que o processo de expressão gênica envolve diversas etapas e regulações.

Para comparar os dados obtidos *in vitro* com dados de pacientes com câncer de mama, foram utilizadas plataformas online, contendo dados de pacientes com câncer de mama do TCGA-BRCA e CPTAC BRCA. O banco CPTAC possui dados de expressão a nível de proteína, baseado em proteômica, e possui um maior número de proteínas para análise. As análises foram feitas nos dois subtipos de câncer de mama estudados nesse projeto, o subtipo basal e luminal A, que correspondem aos subtipos das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. Além disso, foram utilizadas assinaturas gênicas, visto que através dessas, é possível avaliar não somente a expressão de um gene a nível de mRNA, mas o somatório de genes *upregulated* e *downregulated*, refletindo na atividade do alvo a ser estudado. Para isso foi feita a busca de assinaturas de atividade redox de APE1, atividade de STAT3, e assinaturas que refletem os processos de proliferação e TEM.

Nossos dados indicaram que existe uma correlação positiva moderada entre as assinaturas de atividade de STAT3 e da atividade redox de APE1, o mesmo foi encontrado separadamente no subtipo basal, e uma correlação positiva e forte no subtipo luminal A. Esses dados sugerem uma associação positiva entre essas proteínas, o que corrobora com os achados do trabalho, principalmente na linhagem MCF-7.

Visto que a inibição de STAT3 e a inibição redox de APE1 reduzem os processos de agressividade celular, e levam a alterações nos níveis de mRNA de genes que regulam esse processo, avaliamos a associação entre assinaturas de atividade de STAT3 e de APE1 com as assinaturas de proliferação e TEM. Os resultados demonstram que tanto a assinatura de STAT3 quanto a de APE1 exibem uma correlação positiva e moderada com a assinatura de TEM, sendo o maior valor de correlação para a assinatura de STAT3 no subtipo Luminal A. E para a assinatura de proliferação, a correlação é positiva e moderada em relação a assinatura de STAT3, também com maior valor no subtipo Luminal A, sugerindo um importante papel dessa sinalização no câncer de mama, principalmente nesse subtipo. Já para APE1, a correlação foi positiva, porém fraca. Ao analisar amostras que exibem altos níveis tanto da assinatura de APE1 quanto de STAT3, é visto que essas possuem uma maior expressão das assinaturas de proliferação e TEM comparado as amostras com baixos níveis das assinaturas de APE1 e STAT3, em ambos os subtipos. Portanto a sinalização redox de APE1 e a sinalização de STAT3, juntas, contribuem para uma maior proliferação celular e maior fenótipo de agressividade no câncer de mama. Diversos estudos já demonstraram que STAT3 é capaz de contribuir para o processo de metástase através da regulação de genes que participam da transição epitélio-mesenquimal, também indicando seu papel na agressividade tumoral (JIN, 2020). E a sinalização redox de APE1 também já foi elencada como uma das reguladoras do processo de TEM. Yang *et al* observaram que a inibição dessa sinalização com E3330 foi capaz de reverter a TEM, pela diminuição do nível de marcador mesenquimal vimentina e aumento de marcador epitelial e-caderina (YANG *et al.*, 2018). Entretanto, a sinalização conjunta de STAT3 e APE1, clinicamente, neste processo ainda não tinha sido descrita.

Resultados similares foram observados quando comparamos os níveis das assinaturas de STAT3 e APE1, com os genes que também avaliamos *in vitro*. Para a assinatura de STAT3, a correlação é positiva com os níveis de mRNA dos genes que regulam positivamente a TEM, como *CDH2*, *Vim*, *FNI*, *SNAI1* e *MMP9*, entretanto também foi positiva com o marcador epitelial *CDH1*, tanto no subtipo basal como luminal A. E, a correlação mais forte encontrada foi com os níveis de vimentina no subtipo Luminal A. Este dado sugere que a participação de STAT3 em regular a TEM, possa envolver a vimentina, marcador mesenquimal. A regulação de STAT3 sobre a vimentina também foi observado por Wu *et al*. Para a assinatura de APE1, somente *CDH2* não exibiu uma correlação positiva significativa no subtipo basal, enquanto todos os genes exibiram no subtipo luminal A, sendo vimentina novamente a correlação de maior valor com a assinatura de APE1.

Para os processos de proliferação e sobrevivência celular, foi vista uma correlação positiva da assinatura de STAT3 com os níveis de mRNA dos três genes que regulam positivamente esses processos, *CCND1*, *BIRC5* e *MKi67*, no subtipo basal, enquanto que nenhuma correlação significativa foi observada para APE1 nesse subtipo. A maior correlação observada para STAT3 foi com os níveis de *MKi67*, um dos principais marcadores de proliferação utilizados para tumores. Para o subtipo Luminal A, as assinaturas de STAT3 e APE1 se correlaciona positivamente com os três genes, sendo a maior correlação entre *BIRC5* e STAT3. Já foi descrito que STAT3 regula positivamente diversos genes relacionados à proliferação no câncer (CARPENTER; LO, 2014). E conseqüentemente sua inibição diminui a proliferação celular e o crescimento tumoral (SHI *et al.*, 2019).

A correlação entre os níveis da assinatura de STAT3 e APE1 também foi positiva com os níveis dos genes que promovem a migração, *RhoU* e *FSCN1* no subtipo basal e luminal, sendo a correlação mais forte com *FSCN1*. Além disso, esses genes já são descritos como regulados diretamente por STAT3, assim como *FOS*, que também é positivamente correlacionado com a assinatura de STAT3 (CARPENTER; LO, 2014). A inibição de STAT3 é capaz de levar à diminuição dos níveis de *FSCN1*, e dessa forma, diminuir a capacidade de migração de células de câncer de mama (JIN *et al.*, 2023).

Ao separar as amostras de acordo com altos e baixos níveis de ambas as assinaturas de STAT3 e APE1, observamos que as que possuem altos níveis das assinaturas também exibem altos níveis de *VIM*, *FNI*, *MMP9* e *SNAIL*, no subtipo basal, e de todos os genes relacionados a TEM avaliados, *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *FNI*, *SNAIL* e *MMMP9*, no subtipo luminal A. Em relação à proliferação e sobrevivência, amostras com altos níveis de STAT3 e APE1 possuem altos níveis de *BIRC5* no subtipo basal, e altos níveis de *CCND1*, *BIRC5* e *MKi67* no subtipo Luminal A. E tanto *Rhou*, *FSCN1* quanto *FOS* têm maiores níveis de expressão nas amostras que também possuem altos níveis de APE1 e STAT3. Novamente, esses dados sugerem que a interação entre a atividade redox de APE1 e STAT3 contribui para processos essenciais para a tumorigênese e progressão tumoral, destacando sua importância no câncer de mama.

Visto que STAT3 é uma proteína que se torna ativa após ser fosforilada, podendo assim realizar sua função de fator de transcrição (MA; QIN; LI, 2020), analisamos através de bancos de dados, os níveis de STAT3 fosforilado em amostras de pacientes com câncer de mama e sua correlação com o nível de proteína dos genes analisados para avaliar uma possível associação clínica entre os mesmos. Os resultados do banco de dados CPTAC indicam que existe uma correlação positiva entre os níveis de fosforilação de STAT3 com os níveis dos marcadores mesenquimais *Vim* e *SNAIL*, além de seu alvo *FOS*. Entretanto, não foi observada uma

correlação significativa com as outras proteínas analisadas. Além disso, a plataforma não permite separar as amostras de acordo com o subtipo de câncer de mama, o que pode influenciar nas análises. Além disso, pelo banco de dados TCPA, foi possível observar que amostras com altos níveis de STAT3 fosforilado exibem altos níveis de n-caderina (*CDH2*) e fibronectina (*FNI*), porém baixos níveis de e-caderina (*CDH1*). Sugerindo uma relação positiva de STAT3 com proteínas promotoras do fenótipo mesenquimal e uma relação inversa com o fenótipo epitelial. Em outros modelos, como câncer de pulmão, foi possível observar uma correlação positiva entre os níveis de STAT3 fosforilado e Ki67 (FUKUI *et al.*, 2020). Saitoh *et al* demonstraram que o silenciamento de STAT3 leva à diminuição dos níveis de Snail, além de diminuição do fenótipo migratório de células tumorais (SAITOH *et al.*, 2016). Portanto esses resultados também suportam a contribuição de STAT3 para a agressividade tumoral no câncer de mama.

CONCLUSÃO:

Conjuntamente, os dados aqui apresentados sugerem que a combinação da inibição redox de APE1 e da inibição de STAT3 é uma estratégia mais eficaz em reduzir a viabilidade, proliferação, migração e invasão de células de câncer de mama, além de promover a morte celular. Ainda, o efeito sobre características relacionadas ao fenótipo maligno, como migração e invasão, pode ser mediado pela redução dos níveis de marcadores mesenquimais, como vimentina e fibronectina. Dessa forma, a atividade redox de APE1 e STAT3 se mostra um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer de mama, tanto do subtipo Luminal A, quanto Basal.

Os resultados obtidos pelas análises *in vitro* indicam que:

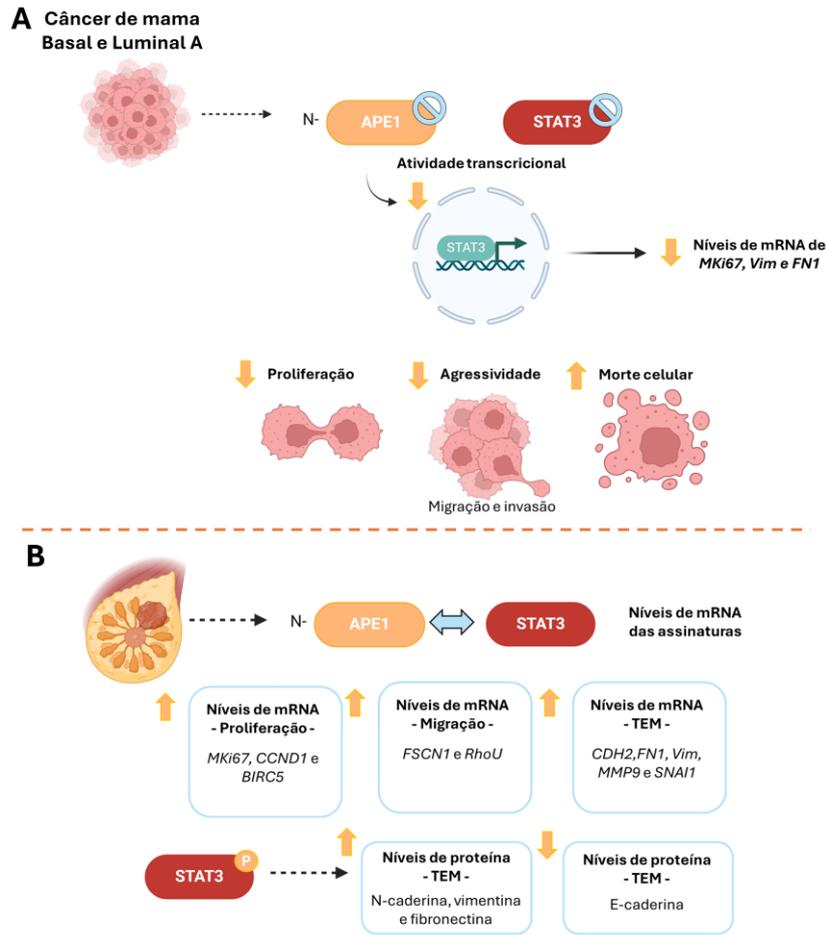
- a) O inibidor do domínio redox de APE1, APX2009, combinado com o inibidor de STAT3, Stattic é capaz de reduzir a viabilidade celular das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7;
- b) O efeito combinado de APX2009 e Stattic em reduzir a viabilidade celular é sinérgico;
- c) O tratamento com APX2009 combinado com Stattic é capaz de reduzir a proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 e MCF-7, sendo um efeito maior que o tratamento individual de cada composto;
- d) O tratamento com APX2009 combinado com Stattic é capaz de reduzir a migração celular da linhagem MDA-MB-231 e MCF-7, sendo esse efeito maior que o tratamento individual de cada composto;
- e) O tratamento com APX2009 combinado com Stattic é capaz de reduzir a invasão celular da linhagem MDA-MB-231 e MCF-7, sendo esse efeito maior que o tratamento individual de cada composto;
- f) O tratamento com APX2009 combinado com Stattic em altas concentrações é capaz de provocar a morte celular na linhagem MDA-MB-231 e por necrose na MCF-7;
- g) O tratamento com APX2009 e com Stattic é capaz de reduzir a atividade transcricional de STAT3 na linhagem MCF-7 e HEK293-T;

- h) O tratamento com APX2009 e com Stattic, individualmente ou combinados, não afeta os níveis de mRNA de genes que regulam positivamente a proliferação, sobrevivência, migração e TEM na linhagem MDA-MB-231;
- i) O tratamento com Stattic, individualmente ou combinado com APX2009 diminui os níveis de mRNA dos marcadores mesenquimais Vimentina e fibronectina e do marcador de proliferação, Ki67 na linhagem MCF-7;

Os resultados obtidos pelas análises *in silico* indicam que:

- a) As assinaturas de atividade redox de APE1 e atividade de STAT3 estão positivamente correlacionadas nos subtipos Basal e Luminal A de câncer de mama;
- b) As assinaturas de atividade redox de APE1 e atividade de STAT3 estão positivamente correlacionadas com as assinaturas de TEM e proliferação;
- c) Amostras que possuem concomitantemente altos níveis das assinaturas de APE1 e de STAT3, exibem altos níveis das assinaturas de TEM e proliferação;
- d) Individualmente, genes que regulam positivamente a proliferação e o processo de TEM, também são positivamente correlacionados com as assinaturas de APE1 e STAT3;
- e) Os níveis de STAT3 fosforilado são positivamente correlacionados com os níveis proteicos de marcadores mesenquimais, vimentina e Snail;
- f) Amostras com altos níveis de STAT3 fosforilado exibem altos níveis proteicos de marcadores mesenquimais, fibronectina e n-caderina, e baixos níveis de marcador epitelial, e-caderina, em amostras do subtipo Luminal A.

Figura 62- Principais resultados obtidos no projeto.



Legenda: Ilustração esquemática dos resultados obtidos no projeto. (A) A combinação do inibidor redox de APE1 com o inibidor de STAT3 diminui a atividade transcricional de STAT3, além de diminuir os processos de proliferação, migração e invasão, e também levar a morte de células de câncer de mama do subtipo basal e luminal A. Essas alterações envolvem a regulação negativa a nível de mRNA de *MKi67*, *Vim* e *FN1*. (B) As assinaturas de atividade de STAT3 e atividade redox de APE1 se correlacionam positivamente com os níveis de genes que regulam positivamente a proliferação, migração e TEM. Os níveis de STAT3 fosforilado também se correlacionam positivamente com os níveis proteicos de marcadores mesenquimais, e negativamente com marcador epitelial.

Fonte: A autora, 2024.

REFERÊNCIAS

- AL-ATTAR, A. *et al.* Human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreatico-biliary cancers. *British Journal of Cancer*, v. 102, n. 4, p. 704–709, 19 fev. 2010.
- CARDOSO, A. A. *et al.* APE1/Ref-1 Regulates STAT3 Transcriptional Activity and APE1/Ref-1–STAT3 Dual-Targeting Effectively Inhibits Pancreatic Cancer Cell Survival. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. e47462, 19 out. 2012.
- CARPENTER, R.; LO, H.-W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*, v. 6, n. 2, p. 897–925, 16 abr. 2014.
- CASTON, R. A. *et al.* Combined inhibition of Ref-1 and STAT3 leads to synergistic tumour inhibition in multiple cancers using 3D and in vivo tumour co-culture models. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 25, n. 2, p. 784–800, 3 jan. 2021.
- CHAN, F. K.-M.; MORIWAKI, K.; DE ROSA, M. J. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. Em: [s.l: s.n.]p. 65–70.
- CHEN, T. *et al.* The expression of APE1 in triple-negative breast cancer and its effect on drug sensitivity of olaparib. *Tumor Biology*, v. 39, n. 10, p. 101042831771339, 24 out. 2017.
- CHENG, C.-C. *et al.* Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *International Journal of Oncology*, 8 maio 2018.
- CHOI, S.; JOO, H. K.; JEON, B. H. Dynamic Regulation of APE1/Ref-1 as a Therapeutic Target Protein. *Chonnam Medical Journal*, v. 52, n. 2, p. 75, 2016.
- CHOU, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*, v. 70, n. 2, p. 440–446, 15 jan. 2010.
- CHU, L. *et al.* CTC enumeration and characterization as a pharmacodynamic marker in the phase I clinical study of APX3330, an APE1/Ref-1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 37, n. 15_suppl, p. e14531–e14531, 20 maio 2019.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, v. 43, n. 6, p. 582–592, 25 jun. 2019.
- DE SOUZA, W. F. *et al.* Claudin-3 Overexpression Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer Cells: Roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as Modulators of EGFR signaling. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e74994, 19 set. 2013.
- DI MASO, V. *et al.* Subcellular Localization of APE1/Ref-1 in Human Hepatocellular Carcinoma: Possible Prognostic Significance. *Molecular Medicine*, v. 13, n. 1–2, p. 89–96, 1 jan. 2007.
- DINAKAR, Y. H. *et al.* Role of STAT3 in the initiation, progression, proliferation and metastasis of breast cancer and strategies to deliver JAK and STAT3 inhibitors. *Life Sciences*, v. 309, p. 120996, nov. 2022.

DING, J. *et al.* Ref-1/APE1 as a Transcriptional Regulator and Novel Therapeutic Target in Pediatric T-cell Leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 16, n. 7, p. 1401–1411, 1 jul. 2017.

DONG, J. *et al.* Recent Update on Development of Small-Molecule STAT3 Inhibitors for Cancer Therapy: From Phosphorylation Inhibition to Protein Degradation. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 64, n. 13, p. 8884–8915, 8 jul. 2021.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 6, p. 453–458, jun. 2003.

FISHEL, M. L. *et al.* Antitumor Activity and Mechanistic Characterization of APE1/Ref-1 Inhibitors in Bladder Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 18, n. 11, p. 1947–1960, 1 nov. 2019.

FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v. 7, n. 1, p. 3–23, 10 maio 2019.

FONG, S. S. *et al.* Chitosan-Coated-PLGA Nanoparticles Enhance the Antitumor and Antimigration Activity of Stattic – A STAT3 Dimerization Blocker. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 17, p. 137–150, jan. 2022.

FUKUI, H. *et al.* Phosphorylated STAT3 expression linked to SOCS3 methylation is associated with proliferative ability of gastric mucosa in patients with early gastric cancer. *Oncology Letters*, 16 mar. 2020.

GAMPALA, S. *et al.* New Ref-1/APE1 targeted inhibitors demonstrating improved potency for clinical applications in multiple cancer types. *Pharmacological Research*, v. 201, p. 107092, mar. 2024.

GLOBOCAN, Global Cancer. Cancer today. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/en>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

GUAN, X. *et al.* Dual inhibition of MYC and SLC39A10 by a novel natural product STAT3 inhibitor derived from *Chaetomium globosum* suppresses tumor growth and metastasis in gastric cancer. *Pharmacological Research*, v. 189, p. 106703, mar. 2023.

GUERREIRO, P. S. *et al.* The APE1 redox inhibitor E3330 reduces collective cell migration of human breast cancer cells and decreases chemoinvasion and colony formation when combined with docetaxel. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 90, n. 4, p. 561–571, 3 out. 2017.

GUO, H. *et al.* Inhibition of STAT3Y705 phosphorylation by Stattic suppresses proliferation and induces mitochondrial-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cell Death Discovery*, v. 8, n. 1, p. 116, 14 mar. 2022.

HASHMI, A. A. *et al.* Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Research Notes*, v. 12, n. 1, p. 605, 23 dez. 2019.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Estatísticas de cancer. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

JIAN, D. *et al.* Inhibition of APE1 Expression Enhances the Antitumor Activity of Olaparib in Triple-Negative Breast Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2022, p. 1–10, 13 abr. 2022.

JIANG, Y. *et al.* Reduced Expression of DNA Repair and Redox Signaling Protein APE1/Ref-1 Impairs Human Pancreatic Cancer Cell Survival, Proliferation, and Cell Cycle Progression. *Cancer Investigation*, v. 28, n. 9, p. 885–895, 5 out. 2010.

JIN, L.-L. *et al.* Relevance and mechanism of STAT3/miR-221-3p/Fascin-1 axis in EGFR TKI resistance of triple-negative breast cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 25 dez. 2023.

JIN, W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cells*, v. 9, n. 1, p. 217, 15 jan. 2020.

KELLEY, M. R. *et al.* Identification and Characterization of New Chemical Entities Targeting Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 for the Prevention of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 359, n. 2, p. 300–309, nov. 2016.

KHAKI-KHATIBI, F. *et al.* Adjuvant therapy with statin enriches the anti-proliferative effect of doxorubicin in human ZR-75-1 breast cancer cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 109, p. 1240–1248, jan. 2019.

KIM, J. *et al.* Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. *Oncology Letters*, 20 fev. 2019.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, v. 834, p. 188–196, set. 2018.

LI, W. *et al.* Signaling pathway inhibitors target breast cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Oncology Reports*, 18 out. 2018.

LI, X. *et al.* STAT3 Inhibitors: A Novel Insight for Anticancer Therapy of Pancreatic Cancer. *Biomolecules*, v. 12, n. 10, p. 1450, 9 out. 2022.

LIN-RAHARDJA, K. *et al.* Evolution-Informed Strategies for Combating Drug Resistance in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 7, p. 6738, 4 abr. 2023.

LIU, Z. *et al.* Small molecule STAT3 inhibitor, 6Br-6a suppresses breast cancer growth in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 121, p. 109502, jan. 2020.

LOGSDON, D. P. *et al.* Blocking HIF signaling via novel inhibitors of CA9 and APE1/Ref-1 dramatically affects pancreatic cancer cell survival. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 13759, 13 set. 2018.

LÜÖND, F.; TIEDE, S.; CHRISTOFORI, G. Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression. *British Journal of Cancer*, v. 125, n. 2, p. 164–175, 20 jul. 2021.

MA, J.; QIN, L.; LI, X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, n. 1, p. 33, 28 dez. 2020.

MAK, M. P. *et al.* A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clinical Cancer Research*, v. 22, n. 3, p. 609–620, 1 fev. 2016.

MALFATTI, M. C. *et al.* Revisiting Two Decades of Research Focused on Targeting APE1 for Cancer Therapy: The Pros and Cons. *Cells*, v. 12, n. 14, p. 1895, 20 jul. 2023.

MANGUINHAS, R. *et al.* Impact of the APE1 Redox Function Inhibitor E3330 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Cisplatin: Increased Cytotoxicity and Impairment of Cell Migration and Invasion. *Antioxidants*, v. 9, n. 6, p. 550, 24 jun. 2020.

MAYOR, R.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 17, n. 2, p. 97–109, 4 fev. 2016.

MCILWAIN, D. W. *et al.* APE1/Ref-1 redox-specific inhibition decreases survivin protein levels and induces cell cycle arrest in prostate cancer cells. *Oncotarget*, v. 9, n. 13, p. 10962–10977, 16 fev. 2018.

MENCALHA, A. L. *et al.* LLL-3, a STAT3 inhibitor, represses BCR-ABL-positive cell proliferation, activates apoptosis and improves the effects of Imatinib mesylate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 65, n. 6, p. 1039–1046, 23 maio 2010.

MIJIT, M. *et al.* In vitro and In vivo evidence demonstrating chronic absence of Ref-1 Cysteine 65 impacts Ref-1 folding configuration, redox signaling, proliferation and metastasis in pancreatic cancer. *Redox Biology*, v. 69, p. 102977, fev. 2024.

MOON, S. Y. *et al.* Inhibition of STAT3 enhances sensitivity to tamoxifen in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer*, v. 21, n. 1, p. 931, 18 dez. 2021.

NYLAND, R. L. *et al.* Design and Synthesis of Novel Quinone Inhibitors Targeted to the Redox Function of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1/Redox Enhancing Factor-1 (Ape1/Ref-1). *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 3, p. 1200–1210, 11 fev. 2010.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Câncer. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ORLOVA, A. *et al.* Direct Targeting Options for STAT3 and STAT5 in Cancer. *Cancers*, v. 11, n. 12, p. 1930, 3 dez. 2019.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, v. 5, n. 1, p. 5–23, 24 fev. 2011.

QIN, J. *et al.* Allosteric inhibitors of the STAT3 signaling pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 190, p. 112122, mar. 2020.

RAY, S. *et al.* Regulation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Enhanceosome Formation by Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 in Hepatic Acute Phase Response. *Molecular Endocrinology*, v. 24, n. 2, p. 391–401, 1 fev. 2010.

SAITOH, M. *et al.* STAT3 integrates cooperative Ras and TGF- β signals that induce Snail expression. *Oncogene*, v. 35, n. 8, p. 1049–1057, 25 fev. 2016.

SCHEAU, C. *et al.* The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Analytical Cellular Pathology*, v. 2019, p. 1–10, 26 nov. 2019.

SCHUST, J. *et al.* Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chemistry & Biology*, v. 13, n. 11, p. 1235–1242, nov. 2006.

SEIDEL, H. M. *et al.* Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, n. 7, p. 3041–3045, 28 mar. 1995.

SHAH, F. *et al.* Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. *npj Precision Oncology*, v. 1, n. 1, p. 19, 8 jun. 2017a.

SHAH, F. *et al.* APE1/Ref-1 knockdown in pancreatic ductal adenocarcinoma – characterizing gene expression changes and identifying novel pathways using single-cell RNA sequencing. *Molecular Oncology*, v. 11, n. 12, p. 1711–1732, 19 dez. 2017b.

SHENG, Q. *et al.* Prognostic significance of APE1 cytoplasmic localization in human epithelial ovarian cancer. *Medical Oncology*, v. 29, n. 2, p. 1265–1271, 10 jun. 2012.

SHI, P. *et al.* MicroRNA-124 suppresses cell proliferation and invasion of triple negative breast cancer cells by targeting STAT3. *Molecular Medicine Reports*, 15 mar. 2019.

SIQUEIRA, P. B. *et al.* The inhibitor of the redox activity of APE1/REF-1, APX2009, reduces the malignant phenotype of breast cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 57, 2024a.

SIQUEIRA, P. B. *et al.* The APE1/REF-1 and the hallmarks of cancer. *Molecular Biology Reports*, v. 51, n. 1, p. 47, 2 dez. 2024b.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *European Journal of Cancer*, v. 40, n. 18, p. 2667–2675, dez. 2004.

SPITZNER, M. *et al.* STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer*, v. 134, n. 4, p. 997–1007, 3 fev. 2014.

STARMANS, M. H. W. *et al.* Independent and functional validation of a multi-tumour-type proliferation signature. *British Journal of Cancer*, v. 107, n. 3, p. 508–515, 21 jul. 2012.

SUN, S.-Q. *et al.* Anti-Tumor Effects of Astaxanthin by Inhibition of the Expression of STAT3 in Prostate Cancer. *Marine Drugs*, v. 18, n. 8, p. 415, 7 ago. 2020.

SUN, Y.-S. *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.

TAN, M. S. Y. *et al.* A STAT3-based gene signature stratifies glioma patients for targeted therapy. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 3601, 9 ago. 2019.

TANG, C. *et al.* APE1 shRNA-loaded cancer stem cell-derived extracellular vesicles reverse Erlotinib resistance in non-small cell lung cancer via the IL-6/STAT3 signalling. *Clinical and Translational Medicine*, v. 12, n. 5, 23 maio 2022.

- THILAKASIRI, P. S. *et al.* Repurposing of drugs as STAT3 inhibitors for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, v. 68, p. 31–46, jan. 2021.
- TOLOMEO, M.; CASCIO, A. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 2, p. 603, 9 jan. 2021.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, v. 147, n. 2, p. 275–292, out. 2011.
- WANG, S. *et al.* Predictive and prognostic biomarkers of bone metastasis in breast cancer: current status and future directions. *Cell & Bioscience*, v. 13, n. 1, p. 224, 1 dez. 2023.
- WHITAKER, A. M.; FREUDENTHAL, B. D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon. *DNA Repair*, v. 71, p. 93–100, nov. 2018.
- WU, H.-H. *et al.* Subcellular localization of apurinic endonuclease 1 promotes lung tumor aggressiveness via NF- κ B activation. *Oncogene*, v. 29, n. 30, p. 4330–4340, 29 jul. 2010.
- WU, Y. *et al.* Stat3 enhances vimentin gene expression by binding to the antisilencer element and interacting with the repressor protein, ZBP-89. *Oncogene*, v. 23, n. 1, p. 168–178, 8 jan. 2004.
- YANG, X. *et al.* The regulatory role of APE1 in epithelial-to-mesenchymal transition and in determining EGFR-TKI responsiveness in non-small-cell lung cancer. *Cancer Medicine*, v. 7, n. 9, p. 4406–4419, 14 set. 2018.
- YE, F. *et al.* Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. *Molecular Cancer*, v. 22, n. 1, p. 105, 6 jul. 2023.
- YEO, S. K.; GUAN, J.-L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends in Cancer*, v. 3, n. 11, p. 753–760, nov. 2017.
- YIN, L. *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, v. 22, n. 1, p. 61, 9 dez. 2020.
- YU, H. *et al.* Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*, v. 14, n. 11, p. 736–746, 24 nov. 2014.
- ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*, v. 12, n. 4, p. 361–373, 24 ago. 2018.
- ZOU, G.-M.; MAITRA, A. Small-molecule inhibitor of the AP endonuclease 1/REF-1 E3330 inhibits pancreatic cancer cell growth and migration. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 7, n. 7, p. 2012–2021, 1 jul. 2008.
- ZULAUF, N. *et al.* Expressiveness of Bone Markers in Breast Cancer with Bone Metastases. *Oncology*, v. 97, n. 4, p. 236–244, 2019.