

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

BEATRIZ BORSANI SAMPAIO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *EGR3* E SEUS POSSÍVEIS GENES-ALVO
MODULADOS EM LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA BT-20 EXPOSTA AO
ANÁLOGO DE CURCUMINA NC2603**

RIBEIRÃO PRETO
2025

BEATRIZ BORSANI SAMPAIO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *EGR3* E SEUS POSSÍVEIS GENES-ALVO
MODULADOS EM LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA BT-20 EXPOSTA AO
ANÁLOGO DE CURCUMINA NC2603**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
Aplicada à Saúde da Universidade de Ribeirão
Preto como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin
Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO

2025

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

S192a SAMPAIO, Beatriz Borsani, 2001-
Análise funcional do gene *EGR3* e seus possíveis genes-alvo
modulados em linhagem de câncer de mama BT-20 exposta ao análogo de
curcumina NC2603 / Beatriz Borsani Sampaio. -- Ribeirão Preto, 2025.
61 f. : il. color.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão
Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, 2025.

1. Câncer de mama feminina. 2. Cultura de células. 3. Expressão
gênica. 4. *EGR3*. 5. CRISPR/Cas9. I. Título.

CDD 660.6

BEATRIZ BORSANI SAMPAIO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *EGR3* E SEUS POSSÍVEIS GENES-ALVO
MODULADOS EM LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA BT-20 EXPOSTA AO ANÁLOGO
DE CURCUMINA NC2603**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Data da defesa: 04 de dezembro de 2025.

Resultado: Aprovada.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO**
Data: 10/12/2025 15:04:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto
Presidente/UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **RENE DE OLIVEIRA BELEBONI**
Data: 08/12/2025 15:54:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni
UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **BEATRIZ MARIA DE CARVALHO PAIXAO**
Data: 10/12/2025 11:43:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Beatriz Maria de Carvalho Paixão
UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2025**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir concluir mais uma etapa importante da minha trajetória. À minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã, manifesto minha profunda gratidão pelo apoio constante, pelo amor incondicional e pela presença em cada passo da minha caminhada. Aos meus avós, deixo registrado meu reconhecimento pelo incentivo contínuo e pelas inspirações ao longo dessa jornada.

Registro meu sincero agradecimento à Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto pela orientação, dedicação e acolhimento durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Dr. Mozart Marins, expresso minha gratidão pelas oportunidades de aprendizado e crescimento que contribuíram de forma significativa para minha formação acadêmica.

Aos colegas e amigos do laboratório GMB, agradeço pelas contribuições, trocas de conhecimento e convivência ao longo do período de pesquisa. Em especial, ao grande amigo Vinícius Cristian Oti dos Santos, cuja amizade, admiração e companheirismo tornaram essa trajetória mais leve e significativa, dentro e fora do ambiente acadêmico.

RESUMO

O câncer de mama permanece como uma preocupação de saúde pública mundialmente importante devido às elevadas taxas de mortalidade e às limitações das terapias atuais, frequentemente comprometidas pela resistência adquirida das células tumorais, emergindo a necessidade de novos medicamentos que sejam seguros, acessíveis e eficazes. Nesse cenário, a curcumina vem sendo amplamente estudada e tem seus efeitos terapêuticos reconhecidos em várias doenças, sobretudo em diversos tipos de câncer. No entanto, sua baixa solubilidade aquosa e biodisponibilidade reduzida restringem sua aplicação clínica. A modificação de sua estrutura química e a síntese de análogos surgem, portanto, como estratégias visando componentes com melhores atividades biológicas. A partir da avaliação da atividade antitumoral de compostos análogos à curcumina em linhagens celulares de câncer de mama, observou-se a modulação da expressão de genes relacionados com a migração celular no transcriptoma da linhagem de câncer de mama triplo-negativo BT-20 na presença do análogo de curcumina NC2603 – *EGR3*, *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* –, sugerindo que o *EGR3* desempenha um papel regulador na ativação dos demais genes. Sendo assim, o presente estudo buscou caracterizar funcionalmente o gene *EGR3*, sua relação com os possíveis genes-alvo e o seu envolvimento com a migração celular na linhagem BT-20 exposta à curcumina e ao análogo de curcumina NC2603. Para isso, foi determinado o valor de IC₅₀ da curcumina (30,3 µM) e avaliou-se a modulação gênica após 24 h de tratamento por RT-qPCR, no qual todos os genes avaliados apresentaram indução significativamente maior após o tratamento com o análogo NC2603 em comparação com a curcumina. Adicionalmente, a tentativa de deleção do *EGR3* foi conduzida utilizando o sistema CRISPR/Cas9, com um plasmídeo adquirido comercialmente, seguido de confirmação da transfecção pelo antibiótico de seleção puromicina (1 µg/mL), e visualização da fluorescência de GFP; contudo, a ausência de redução significativa do mRNA e da proteína indicou que o *knockout* não foi obtido. Como alternativa, foi utilizado dexametasona (1 µM) por 48 h como inibidor de *EGR3*, resultando em diminuição de sua expressão e confirmando a regulação negativa dos genes-alvo, exceto *EMP1*, na linhagem e no contexto observados. Apesar disso, a redução de *EGR3* não foi associada a maior invasividade celular, deixando em aberto seu papel na migração celular. Em conjunto, tais achados apontam o NC2603 como um análogo promissor e destacam o *EGR3* como um potencial alvo molecular na terapia do câncer de mama triplo-negativo, embora estudos adicionais sejam necessários para validar sua eficácia *in vivo* e aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos.

Palavras-chave: Câncer de mama feminina; Cultura de células; Expressão gênica; *EGR3*; CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

Breast cancer remains a globally significant public health concern due to high mortality rates and the limitations of current therapies, which are often compromised by the acquired resistance of tumor cells, highlighting the need for new drugs that are safe, affordable, and effective. In this context, curcumin has been widely studied and its therapeutic effects have been recognized in several diseases, particularly in various types of cancer. However, its low aqueous solubility and reduced bioavailability limit its clinical application. Thus, chemical structure modification and the synthesis of analogs have emerged as strategies aimed at developing compounds with improved biological activity. Based on the evaluation of the antitumor activity of curcumin analog compounds in breast cancer cell lines, modulation of the expression of genes related to cell migration was observed in the transcriptome of triple-negative breast cancer cell line BT-20 in the presence of curcumin analog NC2603 – namely *EGR3*, *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3*, and *ZFP36* – suggesting that *EGR3* plays a regulatory role in the activation of the other genes. Accordingly, the present study sought to functionally characterize the *EGR3* gene, its relationship with potential target genes, and its involvement in cell migration in BT-20 cell line exposed to curcumin and the curcumin analog NC2603. To this end, the IC₅₀ value of curcumin (30.3 µM) was determined, and gene expression modulation after 24 h of treatment was assessed by RT-qPCR, in which all evaluated genes showed significantly greater induction following treatment with NC2603 analog compared with curcumin. Additionally, an attempt to delete *EGR3* was conducted using the CRISPR/Cas9 system with a commercially acquired plasmid, followed by confirmation of transfection using the selection antibiotic puromycin (1 µg/mL) and visualization of GFP fluorescence; however, the absence of a significant reduction in mRNA and protein levels indicated that the knockout was not achieved. As an alternative, dexamethasone (1 µM) was used for 48 h as an *EGR3* inhibitor, resulting in decreased *EGR3* expression and confirming the negative regulation of target genes – except for *EMP1* – in the cell line and context studied. Nevertheless, the reduction of *EGR3* was not associated with increased cellular invasiveness, leaving its role in cell migration unsolved. Taken together, these findings identify NC2603 as a promising analog and highlight *EGR3* as a potential molecular target in triple-negative breast cancer therapy, although further studies are required to validate its *in vivo* efficacy and to deepen the understanding of the underlying molecular mechanisms.

Keywords: Female breast cancer; Cell culture; Gene expression; *EGR3*; CRISPR/Cas9.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Novas dimensões das marcas (<i>hallmarks</i>) do câncer.....	14
Figura 2 – Principais subtipos intrínsecos do câncer de mama, segundo a classificação molecular. Tal classificação é utilizada clinicamente e visa direcionar o tratamento com base na expressão de receptores hormonais (HR), sendo eles o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Um dos subtipos (<i>basal-like</i>) é caracterizado por não apresentar biomarcadores, e por esse motivo é classificado como triplo-negativo (TNBC).....	17
Figura 3 – Esboço de um programa típico de transição epitélio-mesenquimal (EMT).....	19
Figura 4 – Esquema representativo do possível mecanismo de ação do análogo NC2603 na inibição da migração celular.....	23
Figura 5 – Fórmula estrutural da curcumina.....	27
Figura 6 – Construção do Egr-3 Double Nickase Plasmid (h): sc-401740-NIC, um vetor utilizado para a edição genética do gene <i>EGR3</i> em células humanas.....	31
Figura 7 – Curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular com MTT para a linhagem celular BT-20 e HaCat, ambas expostas ao tratamento com diferentes concentrações da curcumina por 24 h.....	35
Figura 8 – Análise da expressão dos genes <i>EGR3</i> , <i>ATF3</i> , <i>EMPI</i> , <i>GADD45B</i> , <i>SOCS3</i> e <i>ZFP36</i> na linhagem BT-20 após tratamento com IC ₅₀ da curcumina e do análogo NC2603, com base nos valores médios de FoldChange (***p=0.0001; ****p<0.0001).....	36
Figura 9 – (A) Visualização, por microscopia de fluorescência (aumento de 400x), das células BT-20 marcadas com GFP após transfecção com plasmídeo visando silenciamento do gene <i>EGR3</i> . (B) Análise da expressão proteica de Cas9 e Egr3 por Western blotting em células controle (CT) e células submetidas à transfecção (1).....	38
Figura 10 – Análise da expressão dos genes <i>EGR3</i> , <i>ATF3</i> , <i>EMPI</i> , <i>GADD45B</i> , <i>SOCS3</i> e <i>ZFP36</i> na linhagem BT-20 após exposição ao Egr-3 Double Nickase Plasmid (plasmídeo) e à Dexametasona (inibidor), com base nos valores médios de FoldChange.....	38
Figura 11 – Imagens representativas do ensaio de migração celular (wound healing) na linhagem BT-20. São apresentadas as condições controle e tratamento com o inibidor de <i>EGR3</i> (dexametasona), avaliadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas.....	39
Figura 12 – Quantificação da área da ferida (%) no ensaio de migração celular (wound healing) da linhagem BT-20 submetida às condições controle e tratamento com o inibidor de <i>EGR3</i> (dexametasona). Os valores representam as médias obtidas nos tempos de 0, 24 e 48 horas, evidenciando fechamento quase completo da ferida em ambas as condições ao final do experimento.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula estrutural e peso molecular do composto análogo à curcumina NC2603.....27

Tabela 2 – Sequências dos primers utilizados na avaliação por RT-qPCR para análise da expressão gênica. Os primers foram desenhados para amplificar regiões específicas do gene alvo e de genes de controle, com o objetivo de quantificar a expressão relativa de mRNA nas amostras analisadas.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ATF3</i>	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
<i>BRCA 1/2</i>	<i>Breast Cancer Gene 1/2</i>
CBh	<i>Chicken β-actin hybrid</i>
CDK 4/6	Cinases dependentes de ciclina 4/6
cDNA	DNA complementar
CRISPR/Cas	Repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas e agrupadas/proteínas associadas a CRISPR
CO ₂	Dióxido de carbono
CSCs	Células-tronco cancerígenas
CTCs	Células tumorais circulantes
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Quebras de fita dupla
DTCs	Células tumorais disseminadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>EGR3</i>	<i>Early Growth Response 3</i>
EMP1	<i>Epithelial membrane protein 1</i>
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EMT-TFs	Fatores de transcrição indutores de EMT
EpCAM	Moléculas de adesão de células epiteliais
ER	Receptor de estrogênio
<i>GADD45B</i>	<i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 beta</i>
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HR	Receptores hormonais
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano

MMPs	Metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NLS	Sinais de localização nuclear
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PAM	Motivo adjacente ao protoespaçador
PR	Receptor de progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	RNA guia único
<i>SOCS3</i>	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo
<i>ZFP36</i>	<i>Zinc Finger Protein 36</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CÂNCER.....	12
1.2	CÂNCER DE MAMA.....	15
1.3	METÁSTASE E TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL.....	18
1.4	TERAPIA ANTITUMORAL E CURCUMINA.....	21
2	HIPÓTESE.....	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	CURCUMINA E ANÁLOGO DE CURCUMINA.....	27
4.2	CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES	27
4.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	28
4.4	AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE	29
4.4.1	Tratamento.....	29
4.4.2	Extração de RNA, Quantificação das Amostras e Síntese de cDNA	29
4.4.3	Avaliação por RT-qPCR	29
4.5	ENSAIO DE COMPROVAÇÃO FUNCIONAL.....	30
4.5.1	<i>Knockout</i> Gênico Utilizando o Sistema CRISPR/Cas9.....	30
4.5.2	Uso de Dexametasona (Inibidor de <i>EGR3</i>).....	32
4.5.3	Avaliação dos Níveis de Expressão de mRNA	32
4.5.4	Avaliação dos Níveis de Expressão da Proteína do Gene Alvo	32
4.6	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	33
4.6.1	Ensaio de Cicatrização de Feridas (<i>Wound healing</i>).....	33
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	EFEITOS DA CURCUMINA NA VIABILIDADE CELULAR.....	35
5.2	MODULAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE APÓS EXPOSIÇÃO À CURCUMINA E AO ANÁLOGO DE CURCUMINA NC2603	36
5.3	DELEÇÃO DE <i>EGR3</i> POR MEIO DO SISTEMA CRISPR/CAS9.....	36
5.3.1	Determinação da Concentração Inibitória de Puromicina	36

5.3.2	Eficácia da Transfecção Celular e do Inibidor na Modulação do mRNA e Proteína do Gene Alvo	37
5.3.3	Migração Celular da Linhagem com <i>EGR3</i> Inibido	38
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Segundo as estimativas globais de saúde, no período de 2000 a 2019, três grandes categorias foram agrupadas como as principais responsáveis pela mortalidade e incapacidade em todo o mundo: doenças transmissíveis, doenças não transmissíveis e agravos. Dessas, as doenças cardiovasculares e o câncer, ambas caracterizadas como doenças não transmissíveis, destacaram-se como a primeira ou a segunda causa de morte prematura (em idades de 30 a 70 anos) na maioria dos países. No Brasil, as doenças cardiovasculares foram a principal causa de morte, enquanto em países como Canadá, Estados Unidos e a maioria dos países europeus com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) muito alto, o câncer ocupou a primeira posição (WHO, 2020; Bray *et al.*, 2021).

Dentre as doenças não transmissíveis, o câncer se configura como uma preocupação de saúde pública mundialmente importante devido às suas taxas de incidência que têm aumentado em diversos países, principalmente de câncer colorretal, de próstata e de mama, que antes eram restritos apenas à América do Norte, Europa ocidental e Austrália (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020). Além disso, a carga crescente da doença aumentou substancialmente em todos os níveis de IDH (Sung *et al.*, 2021), apresentando diversidade nos padrões e tendências em mortalidade, que variam entre os países e entre os tipos específicos de câncer (Cao; Soerjomataram; Bray, 2020). Sendo assim, é considerado um problema global em virtude de seu impacto no mundo, com cerca de 19,9 milhões de casos novos estimados em 2022, além de quase 10 milhões de mortes, em ambos os sexos e em todas as idades (Ferlay *et al.*, 2022; Sung *et al.*, 2021).

No caso do Brasil, no ano de 2019, foi observado uma frequência notável de mortes relacionadas a doenças não transmissíveis por 100.000 habitantes, incluindo alguns tipos de câncer, em ambos os sexos e em todas as idades (WHO, 2020). Segundo o Instituto Nacional de Câncer, para o triênio de 2023 a 2025, foram estimados 704 mil novos casos, com maior concentração na Região Sudeste e Sul, sendo o câncer de pele não melanoma mais incidente em ambos os sexos, seguido do câncer de próstata entre os homens e o câncer de mama feminina entre as mulheres (INCA, 2022).

Nesse cenário, a magnitude crescente do câncer pode ser explicada pelas mudanças sociais, econômicas e de estilo de vida associadas à globalização, resultando em grandes implicações para a saúde pública e para o planejamento do controle da doença. Diversos aspectos relacionados ao ambiente e ao estilo de vida podem ser considerados fatores de risco

para o desenvolvimento de um tumor, destacando-se como os principais o uso de tabaco e álcool, dieta inadequada e inatividade física. A exposição a substâncias cancerígenas no ambiente de trabalho também pode ser considerada fator de risco, englobando a exposição a agentes químicos, biológicos e físicos, como, por exemplo, resíduos de agrotóxicos, alguns vírus, e radiação, respectivamente (Harbeck *et al.*, 2019; National Institute for Public Health and the Environment, 2016).

Diante disso, uma pesquisa que avaliou a proporção estimada de casos de câncer atribuíveis a fatores de risco modificáveis revelou que o tabagismo, seguido por infecções, baixo consumo de hortaliças e frutas, inatividade física e sobrepeso/obesidade poderiam ser associados a mais de 30% dos casos e 42% das mortes por câncer em adultos com 30 anos ou mais no Brasil em 2020. Logo, seria possível prevenir um número significativo de casos reduzindo a exposição a esses fatores de risco, com investimento e elaboração de medidas efetivas sustentáveis a longo prazo, principalmente em países de baixa e média renda (Azevedo e Silva *et al.*, 2016; Lortet-Tieulent *et al.*, 2020).

Portanto, caso as taxas nacionais se mantenham constantes, para o ano de 2040 são estimados 28,4 milhões de casos novos de câncer em todo o mundo, podendo até ser maior se a prevalência dos fatores de risco aumentar em diversos países (Sung *et al.*, 2021). Por esse motivo, a implementação de estratégias viáveis e acessíveis adaptadas às condições locais, bem como o uso de recursos eficazes na prevenção primária e secundária, que objetivem conter efetivamente a prevalência dos fatores de risco associados ao estilo de vida, além de subsidiar o monitoramento, organização e avaliação das ações de combate ao câncer, possibilita que muitos países reduzam substancialmente as mortes prematuras causadas por câncer até 2030, com grandes melhorias até 2050 (Fidler-Benaoudia; Bray, 2020; Gelband *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2023).

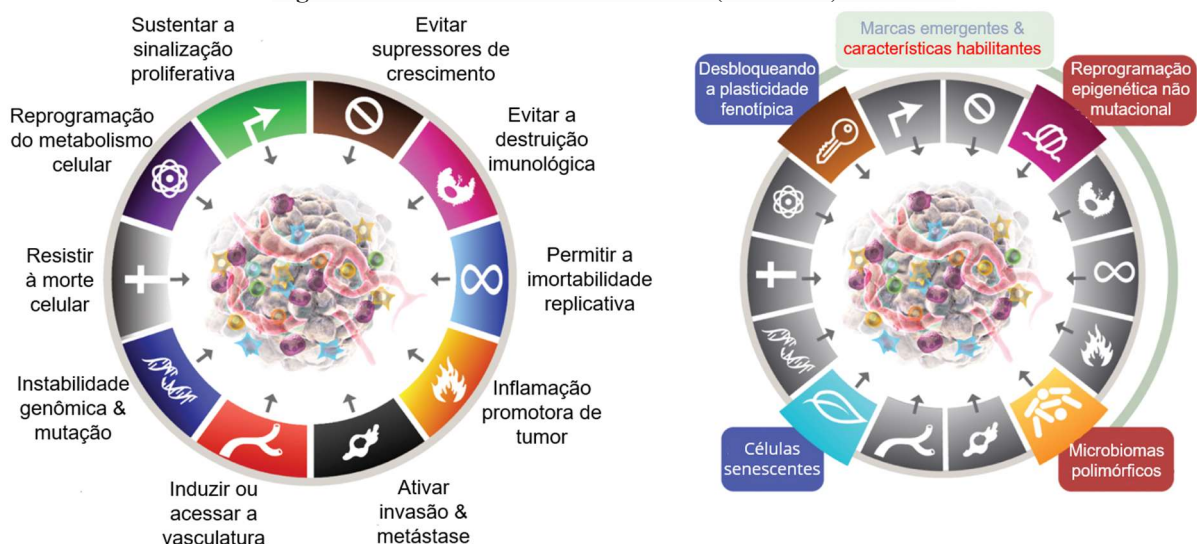
No que diz respeito à progressão do tumor, o câncer é caracterizado como uma doença que induz padrões anormais na expressão gênica, compreendendo inúmeras alterações que ocasionam a transformação de células normais em células cancerosas com defeitos na regulação da proliferação celular normal e na homeostase (Hanahan; Weinberg, 2000; Nenclares; Harrington, 2020). A fim de evitar que a doença se desenvolva, proto-oncogenes (precursores de oncogenes ativos) e genes supressores tumorais têm sua expressão regulada de forma cuidadosa, com o intuito de controlar a progressão do ciclo celular desde a proliferação e o crescimento das células, até a diferenciação e morte celular programada. No entanto, quando ocorre a super expressão e/ou inativação dos proto-oncogenes e dos genes supressores tumorais, respectivamente, modificações de suas propriedades promovem a disseminação do tumor,

aprimorando a sobrevivência das células cancerosas, mesmo com tratamento (Nenclares; Harrington, 2020).

Seis alterações fisiológicas, definidas como capacidades funcionais adquiridas pelas células, foram classificadas como determinantes para a formação e desenvolvimento de tumores malignos, sendo elas: sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, e invasão tecidual e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000). Posteriormente, duas marcas emergentes foram adicionadas à lista: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imunológica, além de duas características facilitadoras: instabilidade genômica e inflamação promotora de tumor (Hanahan; Weinberg, 2011).

Porém, à medida que os conhecimentos acerca dos mecanismos do câncer avançaram, modificações nos chamados *hallmarks* foram realizadas (Figura 1), identificando as marcas emergentes do câncer, classificadas em 2011, como fundamentais, e acrescentando novas características facilitadoras e emergentes, que envolvem desbloquear a capacidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos, e células senescentes. Juntas, tais capacidades permitem a sobrevivência das células malignas, além de sua proliferação e disseminação durante o processo de tumorigênese, possibilitando a propagação metastática (Hanahan, 2022).

Figura 1 – Novas dimensões das marcas (*hallmarks*) do câncer.



Fonte: Traduzido de Hanahan (2022).

No entanto, evidências recentes também têm destacado que o microambiente tumoral desempenha um papel importante para a evolução do tumor, abrangendo um ecossistema

complexo composto por diversos tipos de células cancerosas e células-tronco cancerígenas (CSCs), em conjunto com células imunes e estromais recrutadas, incorporadas em uma matriz extracelular vascularizada e alterada. Tal matriz varia em composição celular e estado funcional de acordo com o órgão, as características intrínsecas das células tumorais, o estágio do tumor e as particularidades do paciente (Dongre; Weinberg, 2019; Hanahan, 2022; Visser; Joyce, 2023).

Dessa forma, o câncer é uma doença altamente diversificada, que exhibe heterogeneidade entre diferentes tumores e entre células de um único tumor, além de possuir mais de 100 tipos e subtipos distintos que podem ser encontrados em órgãos específicos (Hanahan; Weinberg, 2000; Gupta *et al.*, 2018).

1.2 CÂNCER DE MAMA

Dentre os tipos mais diagnosticados no mundo, destaca-se o câncer de mama feminina com quase 2,3 milhões de casos novos e mais de 666.000 mortes estimadas em 2022, ocupando a segunda posição em relação ao número de incidência, e a quarta posição entre as principais causas de morte pela doença, em ambos os sexos e todas as idades. É o câncer mais incidente entre as mulheres em 159 países, sendo responsável por um em cada quatro casos e por uma em cada seis mortes (Ferlay *et al.*, 2022; Sung *et al.*, 2021). No Brasil, segundo estimativas para o triênio de 2023 a 2025, o número de casos novos de câncer de mama poderá atingir mais de 73 mil casos, sendo o mais incidente no País e em todas as Regiões brasileiras, sem considerar os tumores de pele não melanoma (INCA, 2022).

O aumento na prevalência de câncer de mama pode ser relacionado ao desenvolvimento econômico dos países decorrente da urbanização, levando a altas taxas de incidência e mortalidade em países de baixa e média renda, que antes eram comuns apenas em países de renda e IDH elevado. Consequentemente, determinadas mudanças socioculturais e no estilo de vida refletiram significativamente no predomínio dos fatores de risco reprodutivos, hormonais e comportamentais para o câncer de mama, tais como tabagismo, excesso de peso corporal, inatividade física e alterações nos padrões reprodutivos, como menarca precoce, idade mais avançada no primeiro parto e número menor de filhos, bem como a falta de amamentação e a menopausa tardia, por exemplo (Arnold *et al.*, 2022; Harbeck *et al.*, 2019; Sung *et al.*, 2021; Torre *et al.*, 2017).

A predisposição ao câncer de mama está associada, entre outros fatores, a mutações hereditárias em genes como *BRCA1* e *BRCA2* (do inglês *Breast Cancer Gene*), os quais atuam como supressores tumorais cujas proteínas participam na reparação de danos ao DNA. Além

desses, mutações em outros genes também podem contribuir para a hereditariedade da doença, sendo sua identificação realizada por meio de painéis genéticos. Entre os portadores, a incidência aumenta rapidamente com a idade no início da vida adulta, indicando um risco cumulativo elevado de desenvolver a doença, que pode variar de acordo com o histórico familiar e a posição da mutação (Kuchenbaecker *et al.*, 2017).

Desse modo, a implementação equitativa de diversas estratégias para a detecção e diagnóstico precoce da doença também impactam nos padrões globais observados atualmente, sendo determinantes para o rastreamento populacional e para a sobrevivência, uma vez que a mortalidade é aumentada em países de baixa e média renda devido ao diagnóstico em fase tardia e, principalmente, à falta de acesso a tratamentos de qualidade, o que ameaça a saúde pública e o crescimento da economia, além de dificultar o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). A disponibilidade e o uso do exame de mamografia e de programas de triagem eficazes devem entrar em vigor como atividade adicional, em conformidade com a infraestrutura e os requisitos organizacionais para sua aplicação, de forma que serviços de alta qualidade sejam fornecidos para o manejo oportuno e efetivo da doença (Anderson *et al.*, 2021; Arnold *et al.*, 2022; Ginsburg *et al.*, 2020; Soerjomataram; Bray, 2020; Torre *et al.*, 2017; Yip, 2016).

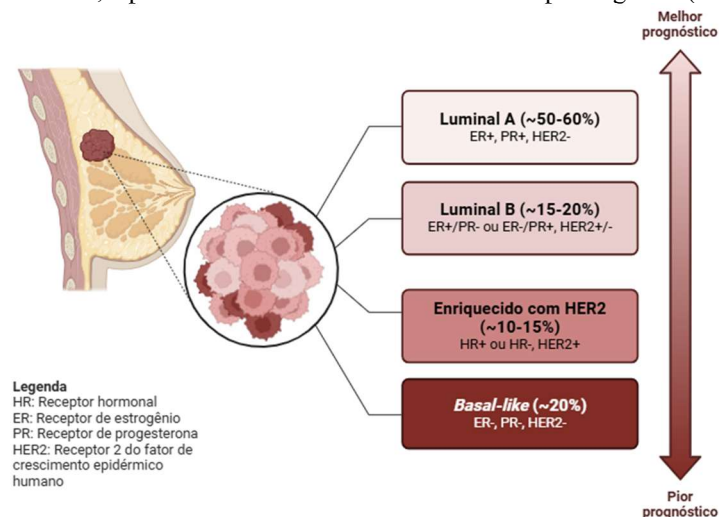
Além disso, o câncer de mama é considerado uma doença heterogênea devido a diversos padrões que são identificados entre os pacientes, surgindo usualmente nas células de revestimento dos ductos ou lóbulos da mama. Sendo assim, inúmeros tipos histológicos podem ser encontrados baseado no padrão de crescimento patológico, sendo o mais comum o carcinoma ductal invasivo, de tipo não especial (responsável por mais de 80% dos casos), seguido pelo carcinoma lobular invasivo e outros tipos histológicos menos comuns (Hankinson; Polyak, Garber, 2020; Tsang; Tse, 2020).

Outra forma de classificar a doença é de acordo com a expressão de receptores hormonais (HR), tais como o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), que expressam o estado do tumor e são utilizados para avaliar o prognóstico da doença, visando auxiliar na tomada de decisão quanto ao tratamento. É importante ressaltar que uma série de outros biomarcadores estão sendo avaliados para uso na prática clínica, a fim de complementar a classificação histopatológica e fornecer informações preditivas mais precisas, como é o caso do Ki-67, um marcador de proliferação celular utilizado para determinar o grau de agressividade do tumor (Barzaman *et al.*, 2020; Harbeck *et al.*, 2019; Hankinson; Polyak, Garber, 2020; Tsang; Tse, 2020).

A presença de HR é um importante indicador para avaliar a capacidade de resposta à terapia hormonal, geralmente associados a um comportamento menos agressivo do tumor. A maioria dos cânceres de mama são ER-positivo, e aproximadamente 65% dos casos são ER-positivo/PR-positivo. Por outro lado, é possível encontrar uma pequena porcentagem de tumores (~ 2%) que expressam apenas o PR (ER-negativo/PR-positivo), e cerca de 10 a 20% apresentam amplificação do gene *HER2* (HER2-positivo), sendo associados a um prognóstico ruim, mas que responde a tratamentos direcionados anti-HER2. Em último caso, 25% dos cânceres de mama não apresentam receptores hormonais (ER-negativo/PR-negativo/HER2-negativo) (Tsang; Tse, 2020).

A partir do ponto de vista molecular, o câncer de mama foi, a princípio, agrupado em cinco subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, enriquecido com HER2, *basal-like* e *normal-like*, sendo esse último considerado controverso. Por esse motivo, as classificações atuais abrangem apenas os tumores luminais A e B, sendo que o primeiro apresenta melhor prognóstico dentre todos os subtipos, e o segundo compreende tumores com prognóstico pior do que o luminal A, podendo ou não expressar HER2; o subtipo enriquecido com HER2, que pode ou não apresentar HR, e é reconhecido por seu crescimento mais rápido e maior agressividade comparado aos cânceres luminal A e B; e, por último, o *basal-like*, classificado como triplo-negativo (TNBC) por não apresentar nenhum dos três biomarcadores mencionados anteriormente, além de possuir alto índice de proliferação e pior prognóstico (Figura 2) (Harbeck *et al.*, 2019; Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001; Tsang; Tse, 2020).

Figura 2 – Principais subtipos intrínsecos do câncer de mama, segundo a classificação molecular. Tal classificação é utilizada clinicamente e visa direcionar o tratamento com base na expressão de receptores hormonais (HR), sendo eles o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Um dos subtipos (*basal-like*) é caracterizado por não apresentar biomarcadores, e por esse motivo é classificado como triplo-negativo (TNBC).



Fonte: autoria própria. Criado com Biorender.com

É fundamental mencionar que a classificação molecular dos tumores de mama está em constante evolução, com diversas variações e combinações entre os subtipos conhecidos com relevância para a prática clínica, como é o caso do TNBC. Dividido em outros seis subtipos: *basal-like 1* (BL1), *basal-like 2* (BL2), imunomodulador (IM), mesenquimal (M), semelhante a célula-tronco mesenquimal (MSL) e receptor de andrógeno luminal (LAR), que mais tarde foram refinados em quatro grupos: BL1 (imunoativados), BL2 (imunossuprimidos), M (incluindo a maior parte do MSL) e LAR, o TNBC merece atenção por ser o mais desafiador dentre os demais, devido a sua heterogeneidade, agressividade e resistência ocasionada pela ausência de biomarcadores, restringindo as opções terapêuticas e predispondo os pacientes a resultados adversos, principalmente recorrência e metástases (Lehmann *et al.*, 2011; Lehmann *et al.*, 2016; Mandapati; Lukong, 2023).

1.3 METÁSTASE E TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

O crescimento de tumores benignos é, geralmente, de natureza lenta e não invasiva, e, quando diagnosticados e tratados de forma imediata, podem apresentar melhora significativa desde que não estejam localizados próximos a tecidos vasculares ou neurais críticos. Em contrapartida, os tumores malignos apresentam um crescimento acelerado e invadem os tecidos circundantes, progredindo para a metástase – termo definido por Récamier (1829), que se refere à disseminação da doença de um órgão ou parte para outro não diretamente conectado a ele (Talmadge; Fidler, 2010).

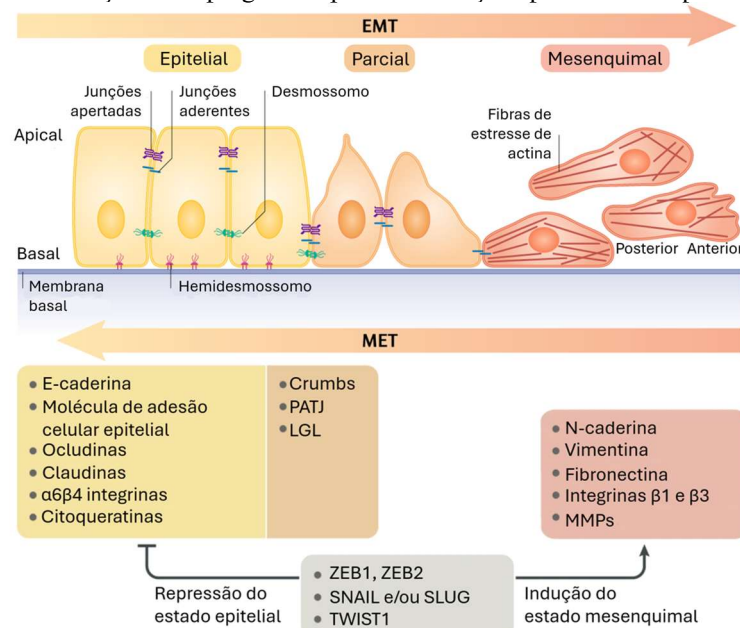
Além de ser responsável pela resistência às terapias convencionais e por mais de 90% das mortes por câncer, a formação de metástases ocorre pela propagação das células cancerosas, seja pelo sangue ou sistema linfático, e sua capacidade de sobreviverem na circulação e de regenerarem o tumor, obtendo funções específicas que promovem a sua adaptação e dão início ao crescimento metastático evidente em órgãos distantes (Ganesh; Massagué, 2021).

Dotadas de plasticidade fenotípica, as células cancerosas alteram sua identidade de maneira significativa durante a progressão tumoral. Isso lhes permite assumir novos fenótipos, adaptando-se a diferentes condições e adotando comportamentos mais agressivos e invasivos, o que contribui para a heterogeneidade intratumoral (Quintanal-Villalonga *et al.*, 2020). Tal capacidade está relacionada ao processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT), no qual as células epiteliais passam por alterações na sua polaridade apical-basal e adesão célula-célula, com degradação da membrana basal subjacente e reorganização da matriz extracelular, diferenciando-se em células mesenquimais migratórias (Dongre; Weinberg, 2019;

Ganesh; Massagué, 2021; Lambert; Weinberg, 2021).

As células epiteliais, unidas por junções estreitas, junções aderentes, junções comunicantes e desmossomos, e ancoradas à membrana basal por hemidesmossomos, expressam substâncias que preservam suas propriedades estruturais, tais como moléculas de adesão de células epiteliais (EpCAM), E-caderina, claudinas, ocludinas, citoqueratinas, entre outros. Porém, durante a ativação de uma EMT, a expressão de marcadores epiteliais é reprimida por fatores de transcrição indutores de EMT (EMT-TFs), que, concomitantemente, induzem a expressão de marcadores relacionados ao fenótipo mesenquimal, como, por exemplo, N-caderina, vimentina, fibronectina e metaloproteínas de matriz (MMPs). Assim, as células são capazes de obter características mesenquimais (polaridade anterior-posterior e reorganização das fibras de estresse de actina) ao mesmo tempo em que retêm certas características epiteliais, deixando-as com fenótipos intermediários, quase mesenquimais, como os encontrados durante a “EMT parcial” (Figura 3) (Dongre; Weinberg, 2019; Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017; Lambert; Weinberg, 2021; Yeeravalli; Das, 2021).

Figura 3 – Esboço de um programa típico de transição epitélio-mesenquimal (EMT).



Fonte: Traduzido de Dongre & Weinberg (2019).

Nesse processo, ativado por diferentes vias de sinalização que incluem membros da família ZEB (ZEB1 e ZEB2), SNAIL (codificado por *SNAIL*), SLUG (codificado por *SNAIL2*) e TWIST (TWIST1 e TWIST2), além de proteínas que regulam especificamente a formação de junções estreitas e a polaridade apical-basal (crumbs, PATJ e LGL, por exemplo), as células adquirem novos fenótipos que contribuem para a disseminação tumoral e a resistência elevada

a diversos tratamentos. Dessa forma, a EMT é um programa dinâmico, contínuo e reversível, desempenhando papéis essenciais durante o desenvolvimento embrionário (EMT tipo I), na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (EMT tipo II), e na progressão de doenças como o câncer (EMT tipo III) (Dongre; Weinberg, 2019; Lambert; Weinberg, 2021; Pires *et al.*, 2017).

Além disso, diversos estudos têm investigado a relação entre os programas de EMT e a metástase, sugerindo que a EMT promove a capacidade de iniciação tumoral em células de carcinoma, intensificada pela superexpressão de EMT-TFs. Como consequência, são geradas células com características de células-tronco (CSCs) que compartilham propriedades de autorrenovação, diferenciação e proliferação extensiva, promovendo assim a formação de metástases (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017; Mani *et al.*, 2008; Reya *et al.*, 2001).

De maneira sucinta, a metástase é decorrente de um processo de múltiplas etapas conhecido como ‘cascata invasão-metástase’, que se inicia com a invasão local das células de carcinoma no tumor primário, seguido pelo intravasamento e sobrevivência dessas células no sistema circulatório. Após a disseminação para tecidos distantes, com extravasamento e a subsequente formação de pequenas colônias, denominadas micrometástases, ocorre a proliferação destas colônias, resultando na formação e crescimento de metástases macroscópicas clinicamente detectáveis – etapa chamada de colonização (Dongre; Weinberg, 2019; Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017).

Como descrito, a disseminação metastática se dá quando as células cancerosas invadem a circulação após deixarem o tumor primário, tornando-se células tumorais circulantes (CTCs). No entanto, apenas uma pequena proporção de CTCs sobrevive aos desafios impostos pelas defesas do tecido hospedeiro (tais como estresse imunológico, mecânico e *anoikis*), levando às células a desenvolverem interações específicas com células endoteliais, células imunes e plaquetas, por exemplo. Uma vez que conseguem extravasar para a semeadura do sítio secundário, agora chamadas de células tumorais disseminadas (DTCs), elas podem se proliferar ou entrar em estado de dormência por longos períodos, como resultado de mecanismos que equilibram o baixo nível de proliferação e a eliminação contínua. Nesse estado, as células conseguem escapar da imunovigilância e, conseqüentemente, colonizar o órgão distante, formando tumores secundários (Ganesh; Massagué, 2021; Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017; Massagué; Obenauf, 2016; Strilic; Offermanns, 2017; Majidpoor; Mortezaee, 2021).

Sendo assim, para garantir o sucesso da colonização metastática, torna-se crucial a presença e manutenção de uma população de CSCs capaz de reiniciar o crescimento do tumor, bem como o desenvolvimento de programas de colonização, específicos aos órgãos, permitindo

que as células prosperem em microambientes distintos (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017). Logo, o conhecimento das etapas da ‘cascata invasão-metástase’, da natureza sistêmica e heterogeneidade da doença metastática, além da multiplicidade de genes e vias envolvidas em diferentes órgãos, pode fornecer a base para tratamentos atuais e futuros, evidenciando as adversidades que devem ser ultrapassadas ao abordar a doença metastática (Massagué; Obenauf, 2016; Ganesh; Massagué, 2021).

1.4 TERAPIA ANTITUMORAL E CURCUMINA

No tratamento do câncer de mama, é de suma importância que a detecção e diagnóstico sejam realizados precocemente, uma vez que há maior chance de sobrevida cinco anos após o diagnóstico quando a doença é identificada em fases iniciais (SEER, 2022). Por outro lado, quando o paciente já manifesta metástases, algumas estratégias para o manejo da doença podem ser empregadas, tais como quimioterapia, terapia direcionada e imunoterapia, podendo haver combinação entre elas. No entanto, metástases evidentes, embora clinicamente controláveis por terapia sistêmica, são consideradas praticamente incuráveis, e o direcionamento terapêutico eficaz nesses casos deve abordar tanto a plasticidade das células cancerosas quanto os mecanismos utilizados durante a progressão metastática (Ganesh; Massagué, 2021; Massagué; Obenauf, 2016).

Terapias endócrinas têm sido a principal escolha no tratamento de pacientes com receptores hormonais positivos (ER-positivo e/ou PR-positivo), no qual sua combinação com um inibidor de cinases dependentes de ciclina 4/6 (CDK 4/6), que regulam a progressão do ciclo celular, é considerado o tratamento padrão nesses indivíduos, podendo ainda ser associado com um inibidor de aromatase. Em casos de câncer de mama HER2-positivo, a terapia anti-HER2 é recomendada como primeira linha a todos os pacientes com câncer de mama avançado, a menos que haja contraindicações ao seu uso. Já para a maioria dos pacientes com TNBC sem mutação em *BRCA*, a quimioterapia continua sendo a única opção de tratamento sistêmico não experimental disponível (Cardoso *et al.*, 2020).

Diversas pesquisas apontaram que agentes quimioterápicos concentrados exclusivamente em um único alvo molecular específico (monodirecionado), assim como a combinação de múltiplos agentes visando diversas vias moleculares (multidirecionado), podem enfrentar desafios em sua eficácia, e, se administrados em doses elevadas, ocasionam efeitos colaterais graves aos pacientes, devido principalmente à resistência adquirida pelas células cancerosas. Diante desse cenário, emerge a necessidade de medicamentos seguros, acessíveis e

eficazes, capazes de atingir múltiplos alvos e de sensibilizar as células cancerosas, prevenindo a resistência aos medicamentos. Até o momento, diversos compostos multidirecionados têm sido investigados para aprimorar a eficácia da terapia combinada, e, dentre eles, destaca-se a curcumina (Bordoloi *et al.*, 2016).

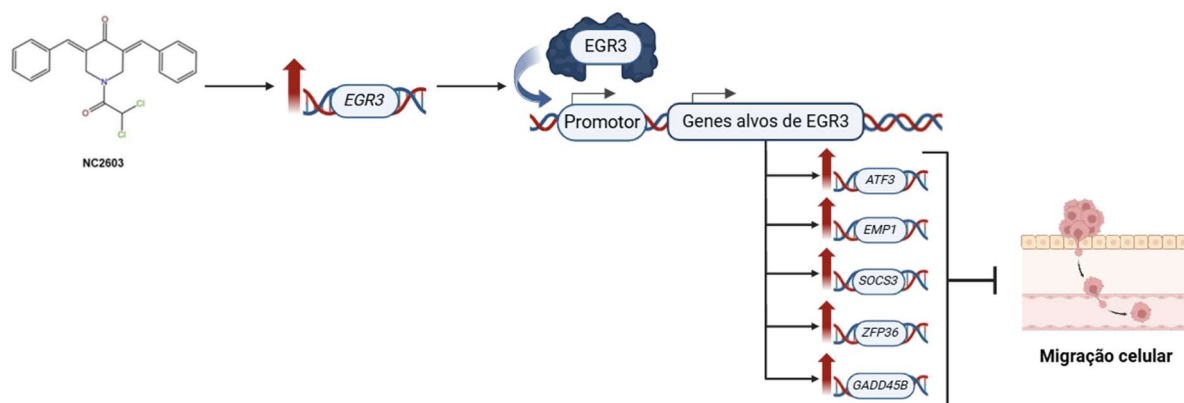
A curcumina – (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona –, também conhecida como diferuloilmetano e pertencente à classe dos polifenóis, é um componente extraído dos rizomas da *Curcuma longa* e isolada pela primeira vez por Vogel e Pelletier (1815). Seus efeitos terapêuticos são amplamente reconhecidos, principalmente por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, podendo atuar em múltiplas condições, incluindo diversos tipos de câncer, no qual é reconhecido como um potente quimiossensibilizante, capaz de atingir diversas vias e influenciar múltiplos alvos ao modular cascatas moleculares e bioquímicas que são responsáveis por induzir quimiorresistência em células cancerosas, além de regular a atividade de elementos essenciais envolvidos com a iniciação, promoção e progressão de tumores (Bordoloi *et al.*, 2016; Giordano; Tommonaro, 2019; Gupta; Vadde; Sarojamma, 2019).

Todavia, certas limitações podem restringir o potencial terapêutico da curcumina quando utilizada no tratamento de doenças, como, por exemplo, a sua baixa solubilidade aquosa e biodisponibilidade reduzida. Diferentes formulações, que incluem nanopartículas, lipossomais, micelas e complexos fosfolipídicos, ou até mesmo a modificação de sua estrutura química e a síntese de análogos, podem ser utilizados como estratégias para melhorar a sua estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade, resultando em componentes com melhores atividades biológicas (Bordoloi *et al.*, 2016; Giordano; Tommonaro, 2019; Mbese; Khwaza; Aderibigbe, 2019).

Diante disso, novas moléculas baseadas em 3,5-bis(benzilideno)-4-piperidona foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do professor Jonathan Dimmock visando potências citotóxicas promissoras específicas para células tumorais, como é o caso do análogo NC2603 – caracterizado por possuir cinco átomos de carbono, piperidona e ácido dicloroacético na porção central de sua estrutura molecular (Hossain *et al.*, 2020).

Além disso, ao avaliar a atividade antitumoral de compostos análogos à curcumina em células de câncer de mama, o efeito citotóxico e a atividade antimigratória do NC2603 foi evidenciado contra a linhagem triplo-negativa BT-20, elucidando o seu possível mecanismo de ação na inibição da migração celular (Figura 4) (Nishimura, 2023).

Figura 4 – Esquema representativo do possível mecanismo de ação do análogo NC2603 na inibição da migração celular.



Fonte: Adaptado de Nishimura (2023).

Diversos estudos têm se dedicado a identificar as alterações genéticas responsáveis pela progressão do câncer, no qual os principais desafios se voltam principalmente ao reconhecimento de novos marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos que visam à inibição da EMT e metástase. Shin *et al.* (2020) demonstraram que a deleção do gene *EGR3* é a principal alteração genética ligada ao desenvolvimento do câncer de próstata, tendo sua expressão associada à ativação transcricional de outros genes (mais especificamente *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36*), implicados na supressão da EMT e migração celular. Tais genes, além dos demonstrados pela Figura 4, também foram modulados no transcriptoma da linhagem de câncer de mama triplo-negativo BT-20 na presença do análogo NC2603, avançando a compreensão das complexas vias moleculares envolvidas na metástase do câncer, ao mesmo tempo em que destaca o considerável potencial do análogo como um candidato promissor para terapia adjuvante (Nishimura *et al.*, 2024).

Diante do impacto clínico negativo decorrente da perda de tais genes, ferramentas de edição e engenharia genômica podem ser utilizadas para investigação de suas funções e efeitos terapêuticos, como é o caso do sistema CRISPR/Cas9, que, além de corrigir mutações genéticas envolvidas no câncer, é capaz de eliminar genes essenciais para a sobrevivência das células tumorais, ou ainda desativar genes associados à resistência à quimioterapia, oferecendo novas perspectivas para o tratamento da doença (Cheng *et al.*, 2020).

O sistema CRISPR/Cas (do inglês, repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas e agrupadas/proteínas associadas a CRISPR) é um mecanismo adaptativo de defesa imunológica naturalmente encontrado em bactérias e arqueas. Dentre os principais, o tipo II apresenta maior relevância para a edição genômica, pois permite induzir quebras de fita dupla (DSBs) em regiões específicas do DNA alvo, guiado por sequências de RNA guia único (sgRNA) em complexos com proteínas Cas, que direcionam a nuclease para o sítio genômico

de interesse. Para garantir o funcionamento do sistema, é essencial a presença de um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), que assegura o reconhecimento do alvo e a clivagem específica da sequência correspondente (Doudna; Charpentier, 2014; Hsu; Lander; Zhang, 2014; Jinek *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013a; Ran *et al.*, 2013b; Wiedenheft; Sternberg; Doudna, 2012).

No entanto, embora tenha gerado grande entusiasmo devido ao seu potencial, especialmente no tratamento de tumores malignos, ainda existem diversos desafios a serem superados para aumentar sua eficácia, tais como efeitos fora do alvo, eficiência da edição, viabilidade das células editadas, e métodos de entrega de sgRNA e Cas9 (Chen *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2020; Ma; Zhang; Huang, 2014). Em contrapartida, inibidores de *EGR3* são capazes de modular a atividade desse fator de transcrição, interagindo com o gene ou suas proteínas associadas, e interferindo em sua capacidade de ligação ao DNA e na regulação de genes-alvo. Nesse sentido, destaca-se a dexametasona, um agonista dos receptores de glicocorticoides que pode suprimir a expressão de *EGR3* (Santa Cruz Biotechnology, 2025).

Diante disso, compreender o papel funcional do *EGR3* no câncer de mama torna-se essencial, uma vez que o gene aparece como regulador de diversas vias associadas à migração celular, resposta inflamatória e EMT. Além disso, é de fundamental importância avaliar se sua modulação – seja por deleção via CRISPR/Cas9 ou por inibição farmacológica – é capaz de alterar esses processos em células de câncer de mama triplo-negativo, a fim de compreender seu modo de ação e elucidar se sua regulação está diretamente relacionada ao fenótipo migratório observado, fornecendo subsídios para o desenvolvimento futuro de terapias direcionadas em câncer de mama agressivo.

2 HIPÓTESE

O gene *EGR3*, modulado no transcriptoma da linhagem de câncer de mama triplo-negativo BT-20 na presença do análogo de curcumina NC2603, está associado à ativação transcricional dos genes *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36*, e, juntos, estão envolvidos na regulação do processo de migração celular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização funcional do gene *EGR3* e sua relação com possíveis genes-alvos (*ATF3*, *EMPI*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36*), bem como seu envolvimento com a migração celular, na linhagem de câncer de mama triplo-negativo BT-20 exposta à curcumina e ao análogo de curcumina NC2603.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

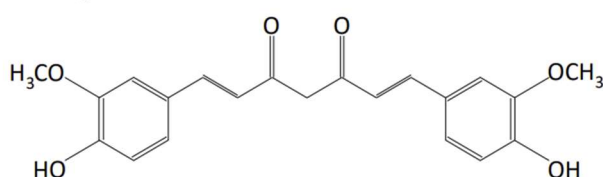
- 1) Determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da curcumina nas linhagens celulares BT-20 e HaCat, a partir do ensaio de viabilidade celular;
- 2) Avaliar a modulação da expressão dos genes *EGR3*, *ATF3*, *EMPI*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* na linhagem BT-20 após exposição individual à curcumina e ao análogo de curcumina NC2603;
- 3) Realizar o *knockout* e a inibição de *EGR3* na linhagem BT-20 utilizando o sistema CRISPR/Cas9 e um inibidor do gene, respectivamente, em condições experimentais distintas;
- 4) Validar a inibição de *EGR3* por meio da análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína do gene alvo por RT-qPCR e *Western Blotting*, respectivamente;
- 5) Realizar ensaio de migração celular na linhagem BT-20 após inibição do gene *EGR3*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CURCUMINA E ANÁLOGO DE CURCUMINA

No presente trabalho, foram utilizados a curcumina (Figura 5), obtida da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA), e o composto análogo à curcumina NC2603 (Tabela 1), sintetizado quimicamente e cedido pelo Prof. Jonathan Dimmock, da *University of Saskatchewan* (Saskatoon, Saskatchewan, Canadá).

Figura 5 – Fórmula estrutural da curcumina.



Fonte: Nishimura (2023).

Tabela 1 – Fórmula estrutural e peso molecular do composto análogo à curcumina NC2603.

#NC	ESTRUTURA	PESO MOLECULAR
2603	<chem>ClC(Cl)C(=O)N1C(=O)C(=C(c2ccccc2)C(=O)C(=C(c3ccccc3)C1=O)C</chem>	386.27

Fonte: Nishimura (2023).

4.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo BT-20 e a linhagem não tumoral de queratinócitos HaCat, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, RJ, Brasil), foram cultivadas no laboratório de cultura de células na Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP, Brasil), em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) tamponado com ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico (HEPES) e bicarbonato de sódio, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e antibióticos penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente), canamicina (50 µg/mL), ciprofloxacino (10 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), a fim de evitar o crescimento de microrganismos. Além disso, ambas as linhagens foram incubadas a 37 °C e mantidas em atmosfera umidificada contendo

5% de CO₂.

Antes da realização dos ensaios, as linhagens foram subcultivadas até a terceira passagem. Esse processo se dá pela remoção do meio de cultura, seguido de lavagem com solução de sais de Hank para manter o equilíbrio iônico e o pH das células, com posterior descarte e adição de outra solução de Hank, contendo tripsina e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), para a dissociação das células aderentes da superfície de cultivo, com incubação a 37 °C por aproximadamente 5 min. Por fim, todo o conteúdo celular foi submetido à centrifugação por 5 min a 20.000 rpm, e o pellet resultante foi ressuspensionado em meio de cultura e distribuído em garrafas ou placas previamente preparadas para o cultivo celular.

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A técnica colorimétrica baseada na redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), obtido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA), foi realizada com o objetivo de verificar a viabilidade das células BT-20 e HaCat frente à exposição da curcumina, além de obter a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em ambas as linhagens. Para isso, foram subcultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/mL, em meio de cultura apropriado e sem antibiótico, e incubadas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h para permitir a aderência celular. O meio de cultura foi então retirado e substituído por meio fresco, e as células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações da curcumina (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µM), previamente preparada em solvente adequado (DMSO), por mais 24 h. Como controle negativo, foram reservados poços contendo meio de cultura e células sem adição de composto, e dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como controle de solvente.

Após 24 h, o meio de cultura foi substituído por meio fresco, e foi adicionado 20 µL de MTT (5 mg/mL em solução de Hank) em cada poço, incubando a placa novamente por 3 h. Em seguida, a placa foi centrifugada a 2250 x g por 5 min, o sobrenadante foi removido, e os cristais de formazan precipitados foram solubilizados em 150 µL de DMSO, seguido da incubação da placa por mais 1 h. Por fim, a absorbância foi obtida com o auxílio de um leitor de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA) a 550 nm, e as médias estimadas de cada concentração foram utilizadas para calcular os valores de IC₅₀.

Para o cálculo, equações foram derivadas de curvas com tendências logarítmicas construídas a partir da diluição das concentrações utilizadas.

4.4 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE

4.4.1 Tratamento

Primeiramente, células BT-20 e HaCat foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 células/mL em frascos de cultura celular de 25 cm², com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, e incubadas a 37 °C durante 24 h. Em seguida, as linhagens foram submetidas ao tratamento por 24 h com IC₅₀ da curcumina (30,3 µM) e do análogo NC2603 (3,5 µM) – obtido em estudo anterior (Nishimura, 2023). Para ambas as condições, o grupo utilizado como controle foi exposto à DMSO < 0,2%.

4.4.2 Extração de RNA, Quantificação das Amostras e Síntese de cDNA

O RNA total das amostras (controle e tratamento) foi extraído utilizando RNAspin Mini 50 25-0500-71 (Cytiva, Washington, D.C., EUA), seguindo o protocolo do fabricante, e quantificado fazendo uso do Implen Nanophotometer® P360 (Implen, Munich, DE). Posteriormente, foi necessário obter o DNA complementar (cDNA) por meio da reação de transcriptase reversa. Cada amostra foi então padronizada a uma concentração de 10 ng/µL de RNA utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

4.4.3 Avaliação por RT-qPCR

As sequências dos *primers* correspondentes aos genes selecionados (Tabela 2) foram obtidas, e, após diluição, padronização e mensuração da eficiência dos mesmos conforme descrito por Nishimura (2023), a análise das amostras controle e tratamento foi executada em termociclador Mx3005P® qPCR System (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), utilizando o kit SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

O gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como normalizador e os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados na avaliação por RT-qPCR para análise da expressão gênica. Os primers foram desenhados para amplificar regiões específicas do gene alvo e de genes de controle, com o objetivo de quantificar a expressão relativa de mRNA nas amostras analisadas.

Gene	Sequência <i>primer</i>	
	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
<i>EGR3</i>	GACATCGGTCTGACCAACGAG	GGCGAACTTTCCCAAGTAGGT
<i>ATF3</i>	GTTTGAGGATTTTGCTAACCTGAC	AGCTGCAATCTTATTTCTTTCTCGT
<i>EMP1</i>	GCCAATGTCTGGTTGGTTTCC	GAGGGCATCTTCACTGGCATA
<i>GADD45B</i>	ATTGCAACATGACGCTGGAAGAGC	GGATGAGCGTGAAGTGGATT
<i>SOCS3</i>	GACCAGCGCCACTTCTTCA	CTGGATGCGCAGGTTCTTG
<i>ZFP36</i>	GACTGAGCTATGTCGGACCTT	GAGTTCCGTCTTGTATTGTTGGG
<i>GAPDH</i>	GACCACAGTCCATGCCATCACT	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG

Fonte: Nishimura (2023).

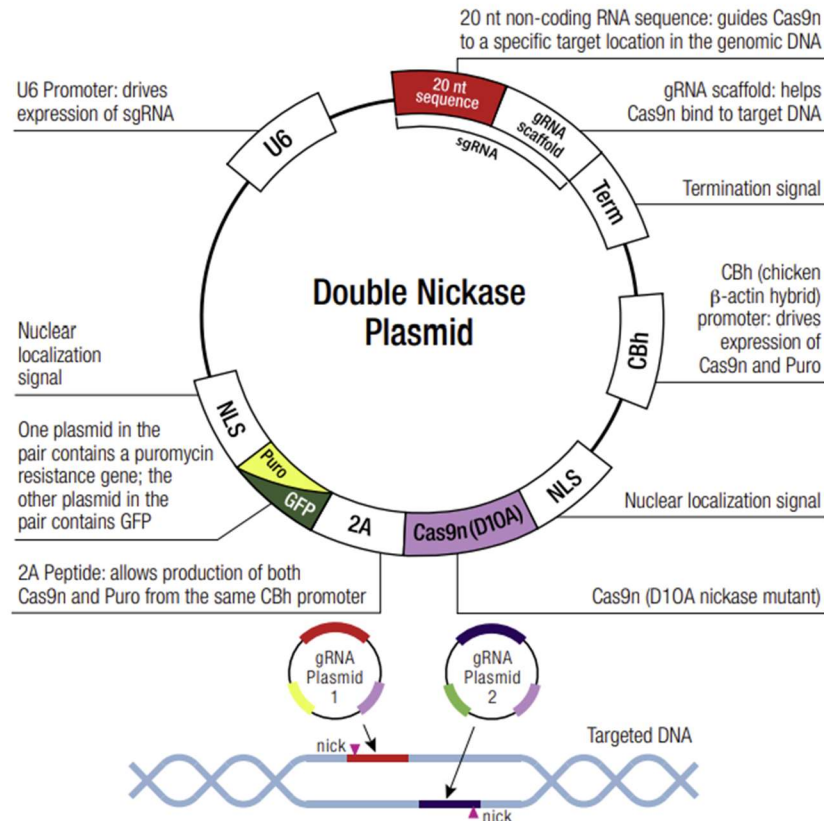
4.5 ENSAIO DE COMPROVAÇÃO FUNCIONAL

4.5.1 *Knockout* Gênico Utilizando o Sistema CRISPR/Cas9

A fim de promover o *knockout* do gene *EGR3* na linhagem BT-20, foi utilizado Egr-3 Double Nickase Plasmid (h): sc-401740-NIC (Figura 6), obtido da Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, EUA). O par de plasmídeos codificam uma nuclease Cas9n mutada (D10A) e RNA guia único (sgRNA) de 20 nucleotídeos específico para o alvo, além de conter o gene de resistência à puomicina para seleção das células transfectadas, e a marcação GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*) para confirmar visualmente a transfecção, com sinais de localização nuclear (NLS) anexados nas extremidades visando a compartimentalização nuclear. O par também contém o promotor U6 de RNA polimerase III humana, utilizado para dirigir a transcrição do sgRNA, bem como o peptídeo 2A, permitindo que as proteínas sejam expressas e liberadas de forma independente após a tradução. O promotor CBh (do inglês, *chicken β -actin hybrid*), por sua vez, integra o plasmídeo garantindo uma alta expressão dos genes de interesse (Mali *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013).

Como controle negativo, foi utilizado Control Double Nickase Plasmid: sc-437281 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), que codifica um sgRNA não direcionado e não reconhece nenhuma sequência de DNA.

Figura 6 – Construção do Egr-3 Double Nickase Plasmid (h): sc-401740-NIC, um vetor utilizado para a edição genética do gene *EGR3* em células humanas.



Fonte: Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA).

4.5.1.1 Curva de seleção com puromicina

Para determinar a concentração ideal de antibiótico a ser utilizado na seleção positiva após a transfecção das células BT-20, foi realizado um ensaio de curva de seleção com a puromicina, obtida da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Inicialmente, 2×10^5 células/mL da linhagem BT-20 foi semeada em placa de 24 poços, e, após 24 h, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo diferentes concentrações de puromicina (5, 4, 3, 2, 1, 0,75 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$), previamente preparada em solvente adequado. O meio foi trocado com a respectiva concentração a cada 48 h, e a viabilidade celular foi monitorada por 5 dias. A concentração mínima de antibiótico capaz de eliminar todas as células não transfectadas no menor tempo possível foi considerada a concentração ideal (Kawamura, 2019).

4.5.1.2 Transfecção celular

A linhagem celular BT-20 foi subcultivada na concentração de 1×10^5 células/mL em placa de 6 poços, e mantida a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 h até obter 80% de confluência. O

meio das células foi substituído por meio fresco sem soro e sem antibiótico, e o complexo de transfecção foi preparado utilizando ViaFect™ Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Nessa etapa, o plasmídeo, o meio sem antibiótico e o reagente de transfecção foram combinados e incubados em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o complexo foi gentilmente adicionado no poço, e a linhagem celular foi incubada em estufa por 48 h, com troca do meio com SFB após 24 h. Decorrido o tempo, o meio de cultura foi trocado novamente por meio contendo a concentração ideal do antibiótico de seleção (1 µg/mL), até completar a triagem de células transfectadas com sucesso. Após a seleção, o meio foi trocado por meio fresco com SFB a cada 2-3 dias por 2-3 semanas, aproximadamente. Por fim, as colônias isoladas foram coletadas para confirmação da deleção.

4.5.2 Uso de Dexametasona (Inibidor de *EGR3*)

Adicionalmente, a fim de inibir a expressão de *EGR3* na linhagem BT-20, foi utilizado Dexametasona: sc-29059, obtido da Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, EUA). Para isso, as células BT-20 foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 células/mL em frascos de cultura celular de 25 cm², com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, e incubadas a 37 °C durante 24 h. Em seguida, a linhagem foi submetida ao tratamento com o composto, previamente preparado em solvente adequado, na concentração de 1 µM por 48 h (Wan *et al.*, 2024).

4.5.3 Avaliação dos Níveis de Expressão de mRNA

A fim de analisar a resposta celular à transfecção pelo sistema CRISPR/Cas9 e ao inibidor de *EGR3* (dexametasona), foram avaliados os níveis de expressão de mRNA, no qual a extração de RNA, quantificação e síntese de cDNA das amostras controle e submetidas ao *knockout* gênico por CRISPR/Cas9 e ao tratamento com dexametasona foram realizadas conforme descrito pelo item 4.4.2, seguido da avaliação da modulação dos genes *EGR3*, *ATF3*, *EMPI*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* por RT-qPCR, conforme descrito pelo item 4.4.3.

4.5.4 Avaliação dos Níveis de Expressão da Proteína do Gene Alvo

A fim de analisar a resposta celular ao *knockout* gênico, foram avaliados os níveis da proteína do gene alvo por *western blotting*, utilizando o anticorpo Egr-3 (A-7): sc-390967,

obtido da Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, EUA). Para isso, as células BT-20 controle e submetidas à transfecção pelo sistema CRISPR/Cas9 foram semeadas em placas de 60 mm até obterem 80-90% de confluência, e, em seguida, foram lavadas com PBS e coletadas em tampão RIPA a 4 °C contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 153 nM de aprotinina, 2,3 µM de leupeptina, 0,1 nM de ortovanadato de sódio e 25 mM de fluoreto de sódio. As células foram então submetidas à sonicação, o lisado celular foi centrifugado a 14000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi determinada utilizando o reagente Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA).

Posteriormente, 20 µg de proteínas totais foram misturadas com uma alíquota de tampão SDS 4X (250 mM Tris-HCl, 8% SDS, 40% glicerol, 8% bME e 0,02% de bromofenol) e aquecidas a 95 °C por 5 min, seguido de centrifugação a 14000 x g por 5 min a 4 °C e eletroforese em gel SDS-PAGE (12%) por 90 min (100 volts, 360 mAmp). Após a eletroforese, as proteínas foram submetidas à transferência para membrana de nitrocelulose por 1 h (100 volts, 360 mAmp) a 4 °C, e as membranas foram bloqueadas com tampão TBST (25 mM Tris, 3 mM KCl, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20) contendo 5% de leite sem gordura, durante 30 a 60 min em temperatura ambiente. Por fim, as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C, com os anticorpos diluídos em tampão TBST-leite (1:1000). Após serem lavadas com TBST (3 x 10 min), as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em TBST-leite (1:5000), e então lavadas novamente com TBST (4 x 10 min).

Para visualização das proteínas através da detecção da quimioluminescência, foi utilizado ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences, Amersham, UK) em um analisador de luminescência ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) (Silva *et al.*, 2018).

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

4.6.1 Ensaio de Cicatrização de Feridas (*Wound healing*)

Para o ensaio de migração celular, a linhagem BT-20 foi subcultivada em placa de 24 poços com 3 x 10⁵ células/poço, e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h, até que atingisse confluência superior a 90%. Após esse período, foi realizada uma ferida na monocamada de células utilizando uma ponteira. Em seguida, o meio de cultura dos poços foi

retirado e substituído por meio fresco. Poços reservados para o tratamento com o inibidor de *EGR3* (dexametasona) a 1 μ M também tiveram o meio de cultura substituído por meio fresco contendo o composto. As células foram incubadas novamente por um período de 48 h, e, posteriormente, foram capturadas imagens das áreas das feridas nos tempos 0 h, 24 h e 48 h, para comparação da cicatrização de cada replicata.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

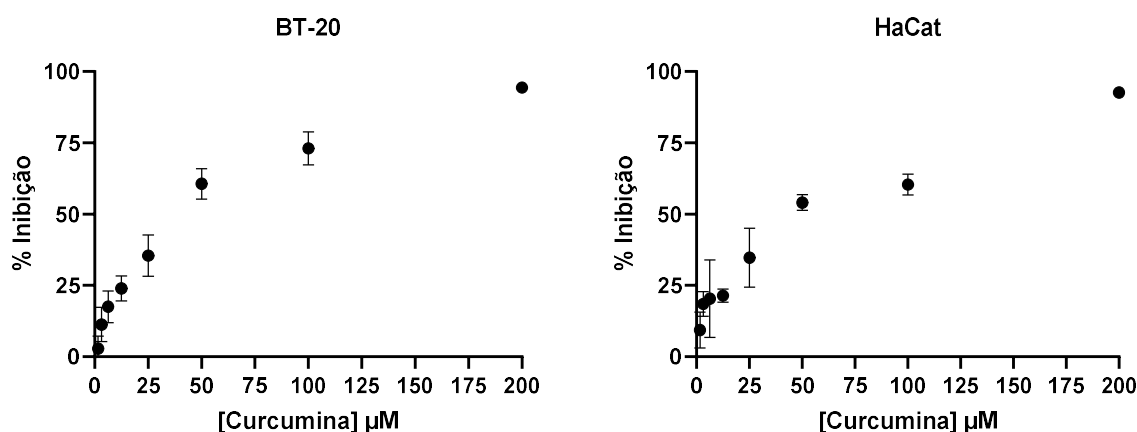
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism v. 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA). Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para obtenção dos dados estatísticos, foi realizado o teste *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, considerando valores significativos *** $p=0.001$ e **** $p<0.0001$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DA CURCUMINA NA VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade foi conduzido utilizando a redução do MTT nas linhagens celulares BT-20 e HaCat. A partir do tratamento com diferentes concentrações da curcumina por 24 h, uma curva de dose-resposta foi construída para cada linhagem (Figura 7), no qual o eixo X corresponde às diferentes concentrações do composto, e o eixo Y representa o percentual de inibição relativo ao controle não tratado.

Figura 7 – Curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular com MTT para a linhagem celular BT-20 e HaCat, ambas expostas ao tratamento com diferentes concentrações da curcumina por 24 h.



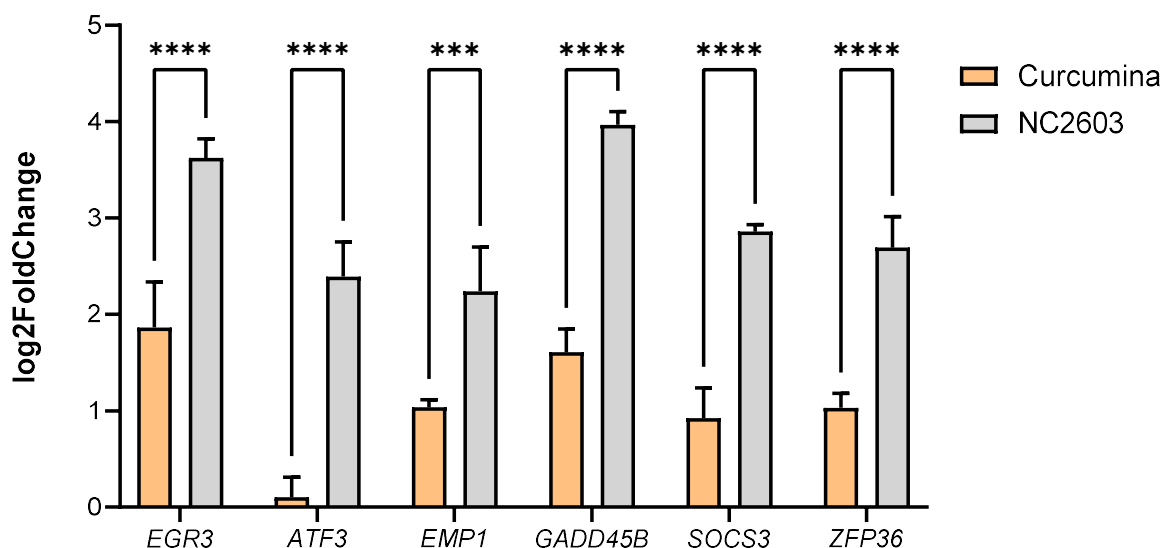
É possível observar um aumento gradual na inibição da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto em ambas as linhagens. Ademais, uma pequena diferença, porém não significativa, foi verificada ao comparar a viabilidade celular das duas linhagens tratadas com a mesma concentração de curcumina, evidenciando que o composto, nas condições experimentais avaliadas, não apresentou seletividade à linhagem tumoral.

Dado que os pontos nos gráficos exibiram tendências logarítmicas, as curvas foram ajustadas para derivar equações que possibilitaram o cálculo dos valores de IC_{50} . A equação referente à linhagem BT-20 foi: $y = 19,74\ln(x) - 18,82$ e para a linhagem HaCat foi: $y = 17,985\ln(x) - 13,051$, nas quais a variável "y" foi fixada no valor de 50, uma vez que é a porcentagem de interesse para o ensaio. Os valores de IC_{50} obtidos foram de aproximadamente $30,3 \pm 1,7 \mu M$ e $40,1 \pm 2,6 \mu M$ para a linhagem BT-20 e HaCat, respectivamente – valores empregados nos ensaios subsequentes.

5.2 MODULAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE APÓS EXPOSIÇÃO À CURCUMINA E AO ANÁLOGO DE CURCUMINA NC2603

Após a determinação de IC_{50} dos compostos, a linhagem celular BT-20 foi exposta aos tratamentos com curcumina (30,3 μ M) e ao análogo de curcumina NC2603 (3,5 μ M) por 24 h, em condições experimentais distintas, com o objetivo de avaliar a modulação dos genes *EGR3*, *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* por meio da técnica de RT-qPCR (Figura 8).

Figura 8 – Análise da expressão dos genes *EGR3*, *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* na linhagem BT-20 após tratamento com IC_{50} da curcumina e do análogo NC2603, com base nos valores médios de FoldChange (** $p=0.0001$; **** $p<0.0001$).



Como ilustrado, é possível observar que todos os genes apresentaram aumento significativo na expressão após o tratamento com o análogo NC2603, quando comparado à curcumina. A diferença estatística foi determinada utilizando *two-way* ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni (** $p = 0,0001$; **** $p < 0,0001$).

5.3 DELEÇÃO DE *EGR3* POR MEIO DO SISTEMA CRISPR/CAS9

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória de Puromicina

Como mencionado anteriormente, o plasmídeo adquirido para o *knockout* gênico de *EGR3* contém o marcador de seleção puromicina-N-acetil-transferase (pac), responsável por codificar a enzima que confere resistência à puromicina. Assim, para determinar a concentração

ideal do antibiótico a ser utilizada na seleção das células transfectadas, a linhagem BT-20 foi exposta a diferentes concentrações de puromicina ao longo de cinco dias. Nas primeiras 48 horas de tratamento, observou-se que nas concentrações acima de 1 µg/mL apenas uma pequena quantidade de células permanecia aderida à placa, indicando alta citotoxicidade. No 5º dia, verificou-se ausência de células viáveis em praticamente todas as condições, exceto nas concentrações de 0,75 µg/mL e 0,5 µg/mL, nas quais ainda era possível observar células aderidas.

Com base nesses resultados, concluiu-se que 1 µg/mL corresponde à menor concentração capaz de promover morte celular seletiva sem deixar sobreviventes na população não transfectada. Portanto, essa concentração foi adotada como parâmetro para a seleção eficiente das células BT-20 transfectadas.

5.3.2 Eficácia da Transfecção Celular e do Inibidor na Modulação do mRNA e Proteína do Gene Alvo

O Egr-3 Double Nickase Plasmid, utilizado para a transfecção das células BT-20, consiste em um par de plasmídeos projetados para interromper a expressão gênica por meio de cortes duplos mediados pela Cas9n. Após a inserção do plasmídeo, iniciou-se o processo de seleção com o antibiótico puromicina, acompanhando o cultivo celular por algumas semanas, a fim de permitir o crescimento e a formação de colônias suficientes para posterior extração e confirmação da deleção. No entanto, durante essa etapa, foi observada elevada citotoxicidade, que resultou em morte celular significativa. Notavelmente, tal fenômeno também ocorreu nas células transfectadas com o Control Double Nickase Plasmid, sugerindo que a toxicidade poderia estar associada ao protocolo de transfecção utilizado ou às características intrínsecas do plasmídeo empregado.

Por mais que a presença do marcador GFP possibilitou a visualização das células que incorporaram o plasmídeo em microscópio de fluorescência sob luz azul (Figura 9-A), a análise da expressão gênica revelou que, nas células transfectadas, apenas *GADD45B* e *ZFP36* apresentaram discreta redução da expressão em relação ao controle (Figura 10).

Ainda assim, foi possível identificar a expressão da proteína Cas9, sugerindo que a transfecção ocorreu, mesmo que de forma parcial. Por outro lado, a expressão residual do *EGR3* foi detectada, indicando que o processo não atingiu a eficácia necessária para um *knockout* gênico completo (Figura 9-B).

Em contraste, o tratamento com dexametasona (1 μ M) por 48 h reprimiu a expressão de todos os genes analisados, com exceção de *EMP1*, em comparação ao grupo controle (Figura 10) na linhagem BT-20. Diante desse achado, o ensaio subsequente de migração celular foi conduzido apenas com a exposição ao inibidor.

Figura 9 – (A) Visualização, por microscopia de fluorescência (aumento de 400x), das células BT-20 marcadas com GFP após transfecção com plasmídeo visando silenciamento do gene *EGR3*. (B) Análise da expressão proteica de Cas9 e Egr3 por *Western blotting* em células controle (CT) e células submetidas à transfecção (1).

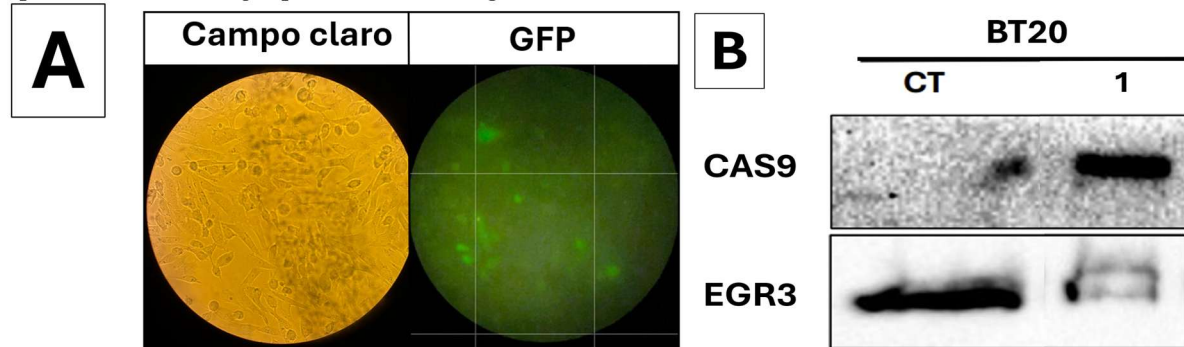
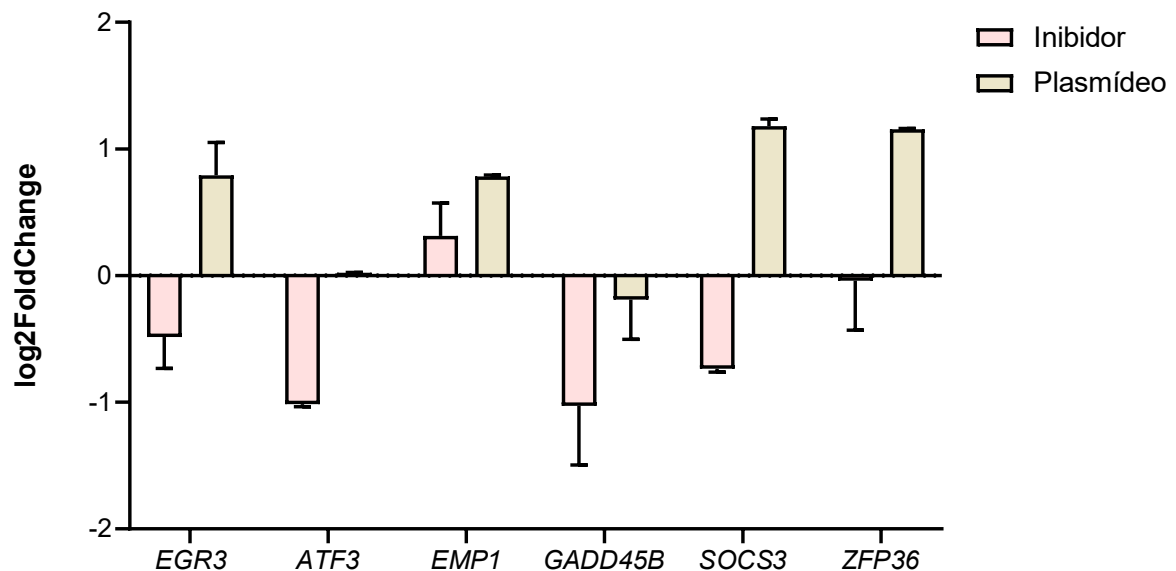


Figura 10 – Análise da expressão dos genes *EGR3*, *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* na linhagem BT-20 após exposição ao Egr-3 Double Nickase Plasmid (plasmídeo) e à Dexametasona (inibidor), com base nos valores médios de FoldChange.



5.3.3 Migração Celular da Linhagem com *EGR3* Inibido

No ensaio de migração celular (*wound healing*), foi evidenciado padrões semelhantes entre o grupo controle e as células tratadas com o inibidor de *EGR3* (dexametasona) ao longo de 48 horas de monitoramento. Na análise inicial (0 h), as áreas médias da ferida foram de

45,119% para o controle e 49,252% para o grupo tratado. Após 24 horas, observou-se redução da área da ferida para 23,124% e 28,557%, respectivamente. Ao final de 48 horas, os valores foram de 0,148% no controle e 0,124% no grupo tratado, indicando um fechamento praticamente completo em ambas as condições. Sendo assim, esses resultados sugerem que a inibição de *EGR3* e de seus possíveis genes-alvo mantém a capacidade migratória das células ao ser tratada com dexametasona na linhagem e no contexto avaliados, uma vez que o comportamento observado foi semelhante ao do grupo controle, conforme demonstrado pelas Figuras 11 e 12.

Figura 11 – Imagens representativas do ensaio de migração celular (*wound healing*) na linhagem BT-20. São apresentadas as condições controle e tratamento com o inibidor de *EGR3* (dexametasona), avaliadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

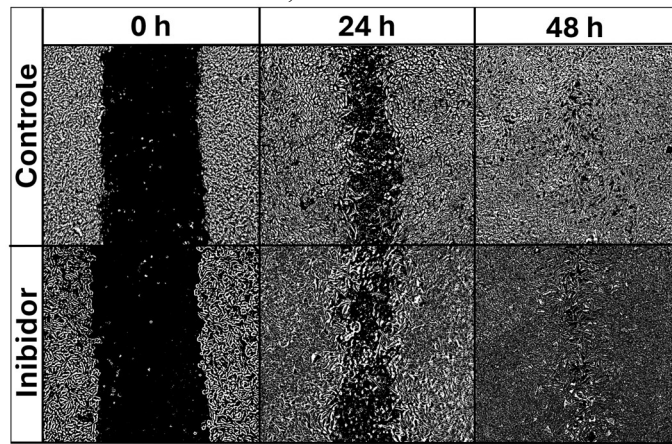
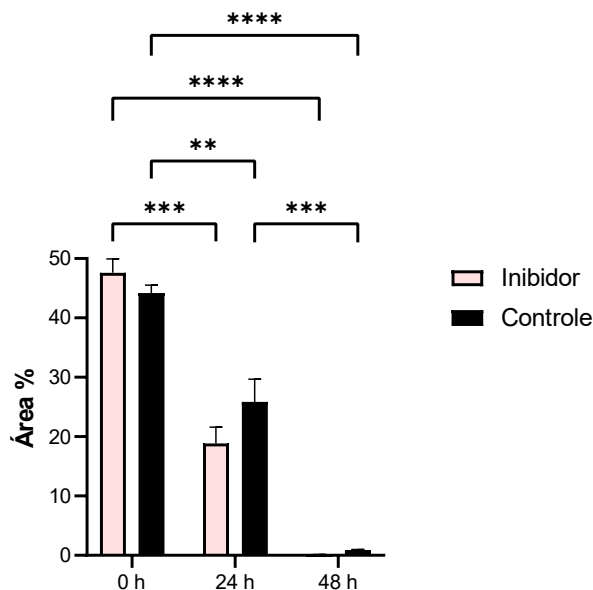


Figura 12 – Quantificação da área da ferida (%) no ensaio de migração celular (*wound healing*) da linhagem BT-20 submetida às condições controle e tratamento com o inibidor de *EGR3* (dexametasona). Os valores representam as médias obtidas nos tempos de 0, 24 e 48 horas, evidenciando fechamento quase completo da ferida em ambas as condições ao final do experimento.



6 DISCUSSÃO

Análises anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisa avaliaram a citotoxicidade de diversos compostos análogos à curcumina, no qual o NC2603 foi o que melhor apresentou atividade e especificidade às células tumorais, apontando-o como um composto promissor no manejo do câncer de mama (Nishimura, 2023). Além disso, foi proposto seu possível mecanismo de ação envolvendo a modulação de genes relacionados à migração celular (Figura 4) – processo que ainda não foi totalmente esclarecido. Em virtude disso, o presente estudo propôs-se a explorar o mecanismo relatado e a relação do gene *EGR3* com possíveis genes-alvo, bem como seu envolvimento com a migração celular.

Inicialmente, os efeitos da curcumina foram avaliados nas células BT-20 e HaCat, com a determinação do valor de IC_{50} para ambas as linhagens. Na pesquisa do câncer, a maioria das células cancerosas em cultura são eliminadas pela curcumina com IC_{50} de 15 a 30 μM (Mukherjee *et al.*, 2020). Valores aproximados foram encontrados por estudos que avaliaram a atividade anticancerígena da curcumina em linhagens celulares de carcinoma colorretal humano (HCT116) e adenocarcinoma colorretal metastático humano (LoVo), com IC_{50} de 10 e 20 μM , respectivamente, após 48 h de incubação (Calibasi-Kocal *et al.*, 2019). Os efeitos inibitórios da curcumina também foram significativos em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 quando tratadas com 20 μM do composto por 24 h e 48 h (Hu *et al.*, 2019).

Uma forma de ponderar a atividade antitumoral de compostos *in vitro* é por meio da avaliação da citotoxicidade, considerado o principal método de triagem de fármacos, no qual um valor de IC_{50} baixo sugere que a substância é altamente eficaz na inibição da viabilidade celular, sem necessitar de doses elevadas (Zhao *et al.*, 2019). No caso do análogo NC2603, sua concentração inibitória de 50% foi obtida em estudo prévio, no qual o valor para a linhagem BT-20 foi de 3,5 μM (Nishimura, 2023), bem abaixo do encontrado para a curcumina (30,3 μM) no presente estudo. Fato semelhante foi observado por Xu *et al.* (2019), que indicou citotoxicidade equivalente em dosagem inferior de análogos mono-carbonil em comparação à curcumina.

Nesse sentido, compostos análogos à curcumina possuem potencial significativo como agente citotóxico seletivo para tumores, mesmo em concentrações baixas, o que é extremamente necessário no contexto de medicamentos antitumorais, que visam minimizar as doses e os efeitos colaterais desses compostos (Borik *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2020; Nishimura, 2023; Zhao *et al.*, 2019). Além disso, a deleção da porção β -dicetona reduz de forma significativa o metabolismo acelerado da curcumina, aumentando sua estabilidade e favorecendo o

desenvolvimento de análogos com melhores propriedades farmacológicas. Análogos ligantes de cinco carbonos também se destacam por apresentarem perfis farmacocinéticos superiores e serem sinteticamente acessíveis, configurando-os como candidatos promissores para o desenvolvimento de fármacos antitumorais derivados da curcumina (Karki *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2009; Nishimura, 2023).

Ademais, no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, torna-se essencial aprofundar a compreensão de fatores genéticos e bioquímicos que fundamentam a proliferação celular na progressão do câncer, uma vez que a mortalidade pela doença se deve principalmente à ocorrência de metástases (Strilic; Offermanns, 2017). Nesse cenário, genes capazes de promover ou reprimir a migração celular despontam como potenciais alvos candidatos no tratamento contra a disseminação metastática (Ganesh; Massagué, 2021; Leão; Costa; Mermelstein, 2022; Song *et al.*, 2019).

Dentre eles, o *Early Growth Response 3 (EGR3)* tem despertado particular interesse, uma vez que, em estudo prévio, foi demonstrado sua modulação, juntamente com *ATF3*, *EMPI*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36*, no transcriptoma da linhagem de câncer de mama BT-20 após exposição ao NC2603, sugerindo o efeito inibitório do composto sobre a migração celular associado a indução dos genes mencionados (Nishimura, 2023). Além disso, o fator de transcrição *EGR3* foi identificado como possível supressor e marcador de risco metastático no câncer de próstata, cuja deleção foi associada à indução de marcadores de EMT, resultando em uma forma mais agressiva de disseminação da doença (Shin *et al.*, 2020).

A fim de evidenciar o papel crucial do gene, diversos estudos avaliaram os níveis de expressão da família de resposta de crescimento precoce (EGR), que incluem *EGR1*, *EGR2*, *EGR3* e *EGR4*, em diferentes tumores e tecidos normais equivalentes. No panorama do câncer de mama, *EGR1*, *EGR2* e *EGR3* foram diferencialmente expressos, e os níveis de mRNA observados foram todos mais baixos em tecidos malignos em relação aos tecidos mamários normais, ao contrário do *EGR4*. Nos quatro subtipos, esses mesmos genes foram regulados negativamente, correlacionando os níveis mais baixos de *EGR3* com o estágio avançado do tumor. Por outro lado, a sua alta expressão desempenhou um papel protetor e gerou um efeito positivo. Ademais, altos níveis de expressão de EGRs (exceto *EGR4*) foram associados a melhores taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença, sugerindo que podem atuar como supressores tumorais, enquanto *EGR4* parece não desempenhar tal papel na progressão do câncer de mama (Fei *et al.*, 2019; Hua *et al.*, 2022; Pio *et al.*, 2013).

No câncer gástrico, sua expressão em nível de mRNA e de proteína foi significativamente menor nos tecidos tumorais em comparação com tecidos não tumorais

correspondentes, bem como em células de carcinoma nasofaríngeo e em tecidos de biópsia frescos, no qual a diminuição de *EGR3* promoveu a capacidade de migração e invasão celular, associando tal fato à progressão maligna com pior prognóstico, grau histológico mais diferenciado e metástase, classificando-o como potencial marcador diagnóstico em diferentes tipos de tumores (Fei *et al.*, 2019; Hua *et al.*, 2022; Knudsen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Liao *et al.*, 2013).

Análises de expressão gênica no câncer de próstata identificaram genes cuja expressão se correlaciona positivamente com *EGR3*, indicando a presença de potenciais sítios de ligação com o fator de transcrição. Sendo assim, é plausível que *EGR3* regule direta e indiretamente genes envolvidos em processos inflamatórios, defesa e resposta imune, muitos dos quais estão associados a vias canônicas, como a do NF- κ B. O *EGR3* também pode atuar como um regulador multifuncional em diversos contextos biológicos, modulando processos como inflamação, proliferação, reparo tecidual e apoptose (Kurosaka *et al.*, 2016; Pio *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2017).

No que diz respeito aos demais genes analisados neste estudo, o *Activating Transcription Factor 3 (ATF3)* é reconhecido por seu papel como modulador de respostas adaptativas, atuando em processos celulares que permitem a adaptação a alterações intra e/ou extracelulares (Hai, 2006). Sua função é altamente dependente do tipo celular e da natureza dos estímulos, podendo ser terapeuticamente direcionado e induzido para atenuar respostas inflamatórias excessivas ou, inversamente, silenciado para potencializar a defesa imunológica (Thompson; Xu; Williams, 2009).

Evidências crescentes apontam o *ATF3* como um regulador central da resposta imune e inflamatória, desempenhando um papel protetor ao limitar a produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios e, assim, prevenindo a progressão para estados patológicos. No entanto, o papel do *ATF3* no desenvolvimento do câncer é complexo e controverso, sugerindo que pode atuar tanto como supressor tumoral quanto como oncogene. Nesse sentido, no carcinoma esofágico de células escamosas, sua expressão foi regulada negativamente e níveis reduzidos foram associados a pior sobrevida global e livre de doença. Ensaios funcionais demonstraram que a superexpressão de *ATF3* suprimiu a proliferação, a invasão e a metástase, além de ter sido associado a diminuição da expressão de marcadores de EMT (Huang *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2014). Por outro lado, o *ATF3* pode ainda ser protetor contra a apoptose e, em muitos casos, promover metástase de linhagens celulares *in vitro* e *in vivo*, tornando essencial a identificação de alvos transcripcionais e parceiros de interação, de modo a avaliar com maior precisão sua contribuição para a tumorigênese (Feng *et al.*, 2013; Thompson; Xu; Williams,

2009).

Tal fato também pode ser observado pelo *Epithelial Membrane Protein 1 (EMPI)*, no qual sua expressão elevada mostrou-se associada a um desfecho clínico desfavorável e menor sobrevida global em diferentes tumores, indicando sua contribuição para a progressão tumoral em contextos distintos (Liu *et al.*, 2019; Miao *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2024). Em contrapartida, *EMPI* foi regulado negativamente em células de câncer de bexiga, e, quando superexpresso em células de câncer de mama, inibiu a proliferação e atenuou a migração e invasão celular (Amin; Shimizu; Ogita, 2019; Liu *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019).

No caso do *Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 beta (GADD45B)*, sua expressão foi menor em tumores metastáticos do que em tumores localizados, indicando que sua expressão aumentada está associada a uma menor possibilidade de metástases à distância e bom prognóstico (Wang *et al.*, 2021). *GADD45B* atua como sensor de dano ao DNA e regulador positivo da apoptose em resposta a diversos estímulos, no qual sua regulação negativa contribui para a tumorigênese e o desenvolvimento maligno em cânceres humanos (Do *et al.*, 2019).

Ademais, *Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3)* e *Zinc Finger Protein 36 (ZFP36)*, reguladores das vias de sinalização STAT3 e NF- κ B, respectivamente, tiveram suas expressões positivamente correlacionadas, sugerindo melhores desfechos clínicos em câncer de próstata (Zhu *et al.*, 2016). Análises por *western blotting* revelaram que a expressão da proteína SOCS3 em tecidos de TNBC encontrava-se significativamente reduzida em comparação aos tecidos normais adjacentes, e níveis mais elevados de *SOCS3* foi associado a melhor sobrevida global e livre de doença, no qual sua regulação negativa foi associada à invasão linfática e vascular, sugerindo seu envolvimento na metástase tumoral (Muhammad *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2021; Sasi *et al.*, 2010; Ying *et al.*, 2010).

Por fim, *Zinc Finger Protein 36 (ZFP36)* encontra-se amplamente suprimido em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, no qual sua baixa expressão está associada a tumores mais avançados, maior risco de recorrência e pior prognóstico. A redução de sua proteína pode modular diversos fenótipos tumorigênicos de maneira dependente do tipo celular, conferindo vantagens proliferativas e de sobrevivência às células tumorais (Brennan *et al.*, 2009).

A fim de silenciar o *EGR3* e caracterizá-lo funcionalmente, a transfecção da linhagem celular BT-20 foi realizada com o plasmídeo contendo a marca de seleção puromicina-N-acetiltransferase (gene *pac*) em sua construção, responsável por codificar a enzima que confere resistência à puromicina e permitir a seleção apenas de células resistentes ao antibiótico (la Luna *et al.*, 1988). Posteriormente, buscou-se demonstrar a eficiência do experimento por

microscopia de fluorescência por meio do marcador GFP, que emite fluorescência verde quando exposto à luz azul, permitindo a visualização das células que incorporam o plasmídeo com sucesso (Chalfie *et al.*, 1994).

Todavia, observou-se aumento significativo da toxicidade e da morte celular após a inserção do plasmídeo e durante a seleção com puromicina, comprometendo a viabilidade das células BT-20, mesmo na presença do marcador GFP. A baixa eficiência no processo de transfecção pode estar relacionada a diferentes fatores técnicos e biológicos. Um primeiro aspecto a ser considerado é o próprio sistema utilizado, que depende de cortes coordenados para induzir a edição gênica, tornando sua eficiência sensível tanto ao desenho e à atividade dos sgRNAs, quanto ao desempenho da enzima Cas9n. A possibilidade de que os sgRNAs empregados não tenham reconhecido de forma eficaz a sequência-alvo, ou tenham promovido cortes incompletos, não pode ser descartada, uma vez que falhas nesse reconhecimento podem levar à edição parcial ou até mesmo à ausência de mutações *indel* no gene *EGR3*.

Outro fator relevante refere-se à seleção com puromicina, que pode não ter sido suficientemente rigorosa para eliminar células não transfectadas, resultando em uma população mista e dificultando a identificação de efeitos consistentes sobre a expressão gênica. Além disso, deve-se considerar a própria biologia do *EGR3*, cuja expressão pode estar sujeita a mecanismos regulatórios complexos ou a vias compensatórias, dificultando a obtenção de um silenciamento completo. Por fim, a elevada citotoxicidade observada após a transfecção reduziu ainda mais a chance de obtenção de clones efetivamente editados. Em conjunto, esses achados sugerem que a ausência de silenciamento eficaz pode ser resultado de uma combinação de limitações técnicas e de particularidades intrínsecas ao alvo molecular, ressaltando a necessidade de otimização do protocolo e da exploração de estratégias complementares para uma abordagem mais robusta.

A transfecção consiste na introdução de ácidos nucleicos exógenos em células, permitindo a modificação genética e constituindo uma ferramenta essencial para estudos de regulação gênica e função proteica. Sua eficácia depende de múltiplos fatores, como tipo de reagente, proporção ácido nucleico/reagente, pH, presença de soro, tipo celular, características da membrana, condições experimentais e manuseio dos reagentes. Dessa forma, não existe uma estratégia universal, mas sim a necessidade de otimização para equilibrar eficiência e viabilidade celular (Chong; Yeap; Ho, 2021; Kim; Eberwine, 2010).

No contexto da edição genômica por CRISPR/Cas9, a escolha da carga e do método de entrega é determinante, sendo a proteína Cas9 particularmente desafiadora devido ao seu tamanho, instabilidade e tendência à agregação. Entre as abordagens de entrega, sistemas

baseados em plasmídeos apresentam a vantagem de codificar Cas9 e sgRNA em um único vetor, mas envolvem múltiplas etapas intracelulares – o plasmídeo deve ser transportado ao núcleo, traduzido em mRNA, e, em seguida, convertido em proteína, exigindo mais tempo para que o alvo seja editado. Além disso, esse formato está mais associado a efeitos fora do alvo, como interrupção de funções gênicas, instabilidade genômica e mutações epigenéticas decorrentes da ligação inespecífica do complexo Cas9/sgRNA a regiões distais da sequência PAM (Liu *et al.*, 2017; Seijas *et al.*, 2025; Sioson; Kim; Joo, 2021).

Esses desafios são ainda mais evidentes em células tumorais, cuja vantagem proliferativa e elevada sobrevivência demandam alta eficiência de edição para alcançar impacto terapêutico. Contudo, alcançar esse limiar é complexo, já que o sucesso depende de direcionamento celular eficaz, depuração rápida do sistema CRISPR e baixa citotoxicidade, limitações ainda enfrentadas pelos métodos atuais (Chen *et al.*, 2019).

Como alternativa, foi utilizada a dexametasona, um agonista dos receptores de glicocorticoides amplamente empregado como agente terapêutico ou adjuvante no tratamento de pacientes com câncer, especialmente para aliviar efeitos colaterais e sintomas associados a estágios avançados da doença (Zhang *et al.*, 2020). Os glicocorticoides exercem seus efeitos imunossupressores, em parte, por meio da indução do zíper de leucina (GILZ), que interfere na ativação de fatores de transcrição, como AP-1, e inibe especificamente a atividade de *EGR2* e *EGR3*. Essa inibição reduz a expressão de moléculas pró-apoptóticas e citocinas, limitando a ativação e a proliferação de células T. Nesse contexto, a modulação negativa de *EGR3* mediada por GILZ representa um mecanismo-chave de imunossupressão, reforçando o papel crítico desse gene na regulação da resposta imune (Mittelstadt; Ashwell, 2001).

Além disso, foi demonstrado que a exposição contínua à dexametasona promove a regulação negativa gradual da expressão de *EGR3* em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hADSCs) e em pré-adipócitos murinos (3T3-L1) (Wan *et al.*, 2024). Contudo, evidências também indicam que a dexametasona pode favorecer a progressão tumoral, estimulando a metástase de células de câncer de mama tanto *in vitro* quanto *in vivo*, aumentando significativamente o número de metástases pulmonares e reduzindo a sobrevida global (Zhang *et al.*, 2020).

No presente estudo, a eficiência da inibição do gene de interesse foi avaliada pela detecção de ácidos nucleicos por RT-qPCR, no qual observou-se a redução da expressão de *EGR3* e de seus potenciais genes-alvo – *ATF3*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36* – em células de câncer de mama triplo-negativo BT-20, com exceção de *EMPI*, cujo papel em vias de

transdução de sinal associadas à metástase permanece em grande parte sem resposta (Amin; Shimizu; Ogita, 2019).

Por fim, os resultados obtidos no ensaio de migração celular demonstraram que a inibição de *EGR3* praticamente manteve a capacidade migratória das células BT-20, uma vez que não houve diferenças significativas no fechamento da ferida em comparação com o grupo controle. Esse achado sugere que a supressão de *EGR3* e de seus possíveis genes-alvo pode não exercer papel determinante sobre o processo de migração celular nesse modelo experimental, pelo menos nas condições analisadas, indicando que outros fatores compensatórios estejam modulando a migração das células BT-20. Dessa forma, os resultados reforçam a complexidade da regulação molecular da migração tumoral e sugerem que a ação de *EGR3* varia em cada contexto.

Além disso, embora o tratamento com o análogo de curcumina NC2603 tenha promovido a superexpressão dos genes avaliados em estudo anterior, a complexidade da progressão tumoral, regulada por múltiplas vias de sinalização que controlam a proliferação, migração, EMT e metástase, sugere que o mecanismo de ação desse composto ainda não está totalmente elucidado, reforçando a necessidade de estudos adicionais para esclarecer seu potencial terapêutico.

7 CONCLUSÃO

Foi demonstrado aspectos importantes da regulação gênica mediada por *EGR3* na progressão tumoral, evidenciando o potencial do análogo de curcumina NC2603 na linhagem de câncer de mama triplo-negativo BT-20, que apresentou seletividade tumoral em baixas concentrações, ao contrário da curcumina. Dados de RT-qPCR mostraram que o NC2603 promoveu expressão significativamente mais elevada de *EGR3*, *ATF3*, *EMP1*, *GADD45B*, *SOCS3* e *ZFP36*, reforçando sua superioridade na indução de genes relacionados a processos inflamatórios, proliferativos e migratórios. Além disso, apesar de *EMP1* não ter sido expresso, a diminuição da expressão de *EGR3* e dos demais genes-alvo após tratamento com o inibidor, sugere um papel regulador desse fator de transcrição. No entanto, sua inibição não foi associada a maior invasividade celular, deixando em aberto a hipótese de sua participação na regulação da migração e da transição epitélio-mesenquimal. Em conjunto, os achados apontam o NC2603 como um análogo promissor e destacam *EGR3* como um potencial alvo molecular na terapia do câncer de mama triplo-negativo, embora estudos adicionais sejam indispensáveis para confirmar sua eficácia e esclarecer os mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

- AMIN, Mohammad Khusni B. Ahmat; SHIMIZU, Akio; OGITA, Hisakazu. The Pivotal Roles of the Epithelial Membrane Protein Family in Cancer Invasiveness and Metastasis. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1620, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11111620> versão *online*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/11/1620>. Acesso em: 28 mar. 2025.
- ANDERSON, Benjamin O. *et al.* The Global Breast Cancer Initiative: a strategic collaboration to strengthen health care for non-communicable diseases. **Lancet Oncol.**, v. 22, n. 5, p. 578-581, mar. 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00071-1) versão *online*. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(21\)00071-1/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(21)00071-1/abstract). Acesso em: 17 fev. 2024.
- ARNOLD, Melina *et al.* Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. **Breast**, v. 66, p. 15-23, dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010> versão *online*. Disponível em: [https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(22\)00144-8/fulltext](https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(22)00144-8/fulltext). Acesso em: 17 fev. 2024.
- AZEVEDO E SILVA, Gulnar *et al.* The Fraction of Cancer Attributable to Ways of Life, Infections, Occupation, and Environmental Agents in Brazil in 2020. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148761, fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148761> versão *online*. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0148761>. Acesso em: 03 jul. 2023.
- BARZAMAN, Khadijeh *et al.* Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **Int Immunopharmacol.**, v. 84, p. 106535-, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567576920304768?via%3Dihub>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- BORDOLOI, Devivasha *et al.* Multi-Targeted Agents in Cancer Cell Chemosensitization: What We Learnt from Curcumin Thus Far. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.**, v. 11, n. 1, p. 67-97, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574892810666151020101706> versão *online*. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/71182>. Acesso em: 17 abr. 2023.
- BORIK, Rita M. *et al.* Design, Synthesis, Anticancer Evaluation and Docking Studies of Novel Heterocyclic Derivatives Obtained via Reactions Involving Curcumin. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23061398> versão *online*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1398>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- BRAY, Freddie *et al.* The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029-3030, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.33587> versão *online*. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.33587>. Acesso em: 18 mai. 2023.
- BRENNAN, Sarah E. The mRNA-Destabilizing Protein Tristetraprolin Is Suppressed in Many Cancers, Altering Tumorigenic Phenotypes and Patient Prognosis. **Cancer Res.**, v. 69,

n. 12, p. 5168-5176, jun. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4238> versão *online*. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/69/12/5168/549683/The-mRNA-Destabilizing-Protein-Tristetraprolin-Is>. Acesso em: 06 abr. 2025.

CALIBASI-KOCAL, Gizem *et al.* Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. **J BUON.**, v. 24, n. 4, p. 1482-1487, 2019. Disponível em: <https://www.jbuon.com/archive/24-4-1482.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2024.

CAO, Bochen; SOERJOMATARAM, Isabelle; BRAY, Freddie. The burden and prevention of premature deaths from noncommunicable diseases, including cancer: a global perspective. In: WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. (eds.). **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. cap. 1.1. p. 16-22. Acesso em: 05 jun. 2023.

CARDOSO, Fatima *et al.* 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). **Ann Oncol.**, v. 31, n. 12, p. 1623-1649, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.09.010> versão *online*. Disponível em: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(20\)42460-3/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(20)42460-3/fulltext). Acesso em: 19 jan. 2024.

CHALFIE, Martin *et al.* Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, fev. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.8303295> versão *online*. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.8303295>. Acesso em: 31 set. 2024.

CHEN, Minjiang *et al.* CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. **Cancer Letters**, v. 447, p. 48-55, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383519300291?via%3Dihub>. Acesso em: 07 mai. 2025.

CHENG, Xing *et al.* CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges. **Brief Funct Genomics**, v. 19, n. 3, p. 209-214, mai. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/bfgp/elaa001> versão *online*. Disponível em: <https://academic.oup.com/bfgp/article/19/3/209/5734960>. Acesso em: 17 out. 2024.

CHONG, Zhi Xiong; YEAP, Swee Keong; HO, Wan Yong. Transfection types, methods and strategies: a technical review. **PeerJ** 9:e11165, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.11165> versão *online*. Disponível em: <https://peerj.com/articles/11165/>. Acesso em 13 abr. 2025.

CONG, Le *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1231143> versão *online*. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1231143>. Acesso em: 19 out. 2024.

DO, Hyunhee *et al.* TFAP2C increases cell proliferation by downregulating GADD45B and PMAIP1 in non-small cell lung cancer cells. **Biol. Res.**, v. 52, n. 35, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-019-0244-5> versão *online*. Disponível em:

<https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-019-0244-5>. Acesso em: 06 abr. 2025.

DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 20, p. 69–84, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0080-4>. Acesso em: 17 jan. 2024.

DOUDNA, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1258096> versão *online*. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1258096>. Acesso em: 19 out. 2024.

FEI, Yuchang *et al.* Expression and prognostic analyses of early growth response proteins (EGRs) in human breast carcinoma based on database analysis. **PeerJ.**, dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.8183> versão *online*. Disponível em: <https://peerj.com/articles/8183/>. Acesso em: 07 out. 2024.

FENG, Jiapeng *et al.* Upregulation of ATF-3 is correlated with prognosis and proliferation of laryngeal cancer by regulating Cyclin D1 expression. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 6, n. 10, p. 2064-2070, set. 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3796228/>. Acesso em: 17 mar. 2025.

FERLAY, Jacques *et al.* **Global Cancer Observatory**: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 05 jun. 2023.

FIDLER-BENAOUDIA, Miranda M.; BRAY, Freddie. Transitions in human development and the global cancer burden. In: WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. (eds.). **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. cap. 1.3. p. 34-43. Acesso em: 07 jun. 2023.

GANESH, Karuna; MASSAGUÉ, Joan. Targeting metastatic cancer. **Nat Med.**, v. 27, p. 34-44, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-01195-4>. Acesso em: 13 ago. 2023.

GELBAND, Hellen *et al.* Costs, affordability, and feasibility of an essential package of cancer control interventions in low-income and middle-income countries: key messages from *Disease Control Priorities*, 3rd edition. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2133-2144, mai. 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00755-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00755-2) versão *online*. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)00755-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)00755-2/fulltext). Acesso em: 15 jun. 2023.

GINSBURG, Ophira *et al.* Breast Cancer Early Detection: A Phased Approach to Implementation. **Cancer**, v. 126, n. 10, p. 2379-2393, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.32887> versão *online*. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.32887>. Acesso em: 12 jul. 2023.

GIORDANO, Antonio; TOMMONARO, Giuseppina. Curcumin and Cancer. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 1-20, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11102376> versão *online*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2376>. Acesso em: 19 abr. 2023.

GUPTA, Manoj K.; VADDE, Ramakrishna; SAROJAMMA, Vemula. Curcumin - A Novel Therapeutic Agent in the Prevention of Colorectal Cancer. **Current Drug Metabolism**, v. 20, n. 12, p. 977-987, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389200220666191007153238> versão *online*. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/101235>. Acesso em: 01 abr. 2024.

GUPTA, Piyush B. *et al.* Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 1, p. 65-78, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590918305472?via%3Dihub>. Acesso em: 06 fev. 2024.

HAI, Tsonwin. The ATF Transcription Factors in Cellular Adaptive Responses. *In*: Ma, J. **Gene Expression and Regulation**. New York-NY: Springer, 2006. p. 329-340. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-40049-5_20 versão *online*. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-40049-5_20. Acesso em: 17 mar. 2025.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059> versão *online*. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>. Acesso em: 06 fev. 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400816839?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jun. 2023.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9) versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279?via%3Dihub>. Acesso em: 27 jun. 2023.

HANKINSON, Susan E.; POLYAK, Kornelia; GARBER, Judy E. **Breast Cancer**. *In*: WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. (ed.). World Cancer Report 2020: cancer research for cancer prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. cap. 5.9. p. 382-393. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 10 jul. 2023.

HARBECK, Nadia *et al.* Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 66, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0111-2#Sec10>. Acesso em: 23 out. 2023.

HOSSAIN, Mohammad *et al.* Novel hybrid molecules of 3,5-bis(benzylidene)-4-piperidones and dichloroacetic acid which demonstrate potent tumour-selective cytotoxicity. **Bioorg Med**

Chem Lett., v. 30, n. 3, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126878> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X1930856X?via%3Dihub>. Acesso em: 05 out. 2024.

HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-1278, jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867414006047?via%3Dihub>. Acesso em: 11 out. 2024.

HU, Chenxia *et al.* Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. **Phytomedicine**, v. 58, mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.001> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711318305579?via%3Dihub>. Acesso em 16 fev. 2024.

HUA, Youwei *et al.* An integrated pan-cancer analysis of identifying biomarkers about the EGR family genes in human carcinomas. **Comput Biol Med.**, v. 148, set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.105889> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010482522006369?via%3Dihub>. Acesso em: 07 out. 2024.

HUANG, Chuanqian *et al.* Inhibitory role of ATF3 in gastric cancer progression through regulating cell EMT and stemness. **Cancer Cell Int.**, v. 21, n. 127, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01828-9> versão *online*. Disponível em: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-01828-9>. Acesso em: 07 ago. 2023.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2022.

JINEK, Martin *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1225829> versão *online*. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829>. Acesso em: 17 out. 2024.

KARKI, Subhas *et al.* 3,5-Bis(3-alkylaminomethyl-4-hydroxybenzylidene)-4-piperidones: A Novel Class of Potent Tumor-Selective Cytotoxins. **J. Med. Chem.**, v. 59, n 2, p. 763-769, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01706> versão *online*. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b01706>. Acesso em: 03 fev. 2025.

KAWAMURA, Bárbara. **Avaliação de um novo candidato a fármaco para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

KIM, Tae Kyung; EBERWINE, James H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal Bioanal Chem.**, v. 397, p. 3173-3178, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6> versão *online*. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-3821-6>. Acesso em: 13 jul. 2025.

KNUDSEN, Arnon Møldrup *et al.* Expression and prognostic value of the transcription factors EGR1 and EGR3 in gliomas. **Sci Rep**, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66236-x> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-66236-x>. Acesso em: 07 out. 2024.

KUCHENBAECKER, Karoline B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. **JAMA**, v. 317, n. 23, p. 2402-2416, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112> versão *online*. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2632503>. Acesso em: 26 mar. 2024.

KUROSAKA, Mitsutoshi *et al.* Early Growth Response 3 (Egr3) Contributes a Maintenance of C2C12 Myoblast Proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 5, p. 1114-1122, ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.25574> versão *online*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.25574>. Acesso em: 25 mar. 2025.

LA LUNA, Susana de *et al.* Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. **Gene**, v. 62, n. 1, p. 121-126, fev. 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90585-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90585-9) versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0378111988905859?via%3Dihub>. Acesso em: 31 set. 2024.

LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416316099?via%3Dihub>. Acesso em: 17 fev. 2024.

LAMBERT, Arthur W.; WEINBERG, Robert A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. **Nat Rev Cancer**, v. 21, p. 325–338, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00332-6> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41568-021-00332-6>. Acesso em: 07 out. 2024.

LEÃO, Marnie Hillary Carvalho; COSTA, Manoel Luis; MERMELSTEIN, Claudia. Epithelial-to-mesenchymal transition as a learning paradigm of cell biology. **Cell Biol Int.**, v. 47, n. 2, p. 352-366, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.11967> versão *online*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbin.11967>. Acesso em: 05 out. 2024.

LEHMANN, Brian D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest.**, v. 121, n. 7, p. 2750-2767, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI45014> versão *online*. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/45014>. Acesso em: 17 jan. 2024.

LEHMANN, Brian D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLoS One**, v. 11, n. 6, jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368> versão *online*. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157368>. Acesso em: 26 mar. 2024.

LI, Xi-Zhao *et al.* MicroRNA-483-5p Predicts Poor Prognosis and Promotes Cancer Metastasis by Targeting *EGR3* in Nasopharyngeal Carcinoma. **Front Oncol.**, v. 11, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.720835> versão *online*. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.720835/full>. Acesso em: 07 out. 2024.

LIANG, Guang *et al.* Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agentes. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 2623-2631, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.044> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968089608009930?via%3Dihub>. Acesso em: 03 fev. 2025.

LIAO, Fei *et al.* Decreased EGR3 expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. **J Mol Histol.**, v. 44, p. 463–468, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10735-013-9493-8> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10735-013-9493-8>. Acesso em: 19 ago. 2023.

LIU, Chang *et al.* Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 17-26, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365917308453?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jul. 2025.

LIU, Sha *et al.* Loss of EMP1 promotes the metastasis of human bladder cancer cells by promoting migration and conferring resistance to ferroptosis through activation of PPAR gamma signaling. **J Free Rad Bio Med.**, v. 189, p. 42-57, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.247> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584922004749?via%3Dihub>. Acesso em: 24 mar. 2025.

LIU, Yang *et al.* EMP1 Promotes the Proliferation and Invasion of Ovarian Cancer Cells Through Activating the MAPK Pathway. **Onco Targets Ther.**, v. 13, p. 2047-2055, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S240028> versão *online*. Disponível em: <https://www.dovepress.com/emp1-promotes-the-proliferation-and-invasion-of-ovarian-cancer-cells-peer-reviewed-fulltext-article-OTT>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LORTET-TIEULENT, Joannie *et al.* Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. **Int. J. Cancer**, v. 147, n. 11, p. 3029–3036, dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.33114> versão *online*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33114>. Acesso em: 03 jul. 2023.

MALI, Prashant *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823-826, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1232033> versão *online*. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1232033>. Acesso em: 19 out. 2024.

MAJIDPOOR, Jamal, MORTEZAEI, Keywan. Steps in metastasis: an updated review. **Med Oncol**, v. 38, n. 3, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-020-01447-w>. Acesso em 04 out. 2024.

MANDAPATI, Aditya; LUKONG, Kiven Erique. Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 149, p. 3701-3719, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04189-6> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-022-04189-6>. Acesso em: 17 fev. 2024.

MANI, Sendurai A. *et al.* The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-715, mai. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027> versão *online*. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(08\)00444-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867408004443%3Fshowall%3Dtrue#app2](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(08)00444-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867408004443%3Fshowall%3Dtrue#app2). Acesso em: 17 fev. 2024.

MASSAGUÉ, Joan; OBENAUF, Anna C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, p. 298–306, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature17038> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature17038>. Acesso em: 18 fev. 2024.

MBESE, Zintle; KHWAZA, Vuyolwethu; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Curcumin and Its Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Prostate, Colon and Breast Cancers. **Molecules**, v. 24, n. 23, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24234386> versão *online*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/23/4386>. Acesso em: 25 abr. 2023.

MIAO, Lifeng *et al.* Epithelial membrane protein 1 promotes glioblastoma progression through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Oncol Rep.**, v. 42, p. 605-614, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2019.7204> versão *online*. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2019.7204#b7-or-0-0-7204>. Acesso em: 07 abr. 2025.

MITTELSTADT, Paul R.; ASHWELL, Jonathan D. Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29603-29610, ago. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M101522200> versão *online*. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)80437-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)80437-2/fulltext). Acesso em: 07 abr. 2025.

MUHAMMAD, Naoshad *et al.* Anti-miR-203 suppresses ER-positive breast cancer growth and stemness by targeting SOCS3. **Oncotarget**, v. 7, n. 36, p. 58595-58605, 2016. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11193> versão *online*. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/11193/text/>. Acesso em: 06 abr. 2025.

MUKHERJEE, Sumit *et al.* Using curcumin to turn the innate immune system against cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 176, p. 113824, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113824> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295220300344?via%3Dihub>. Acesso em: 26 fev. 2024.

NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT. **Work-related cancer in the European Union: size, impact and options for further prevention**. Bilthoven, Netherlands: RIVM, 2016. Disponível em: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2016-0010.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2023.

NENCLARES, Pablo; HARRINGTON, Kevin J. The biology of cancer. **Medicine**, v. 48, n. 2, p. 67-72, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303919302877?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jun. 2023.

NISHIMURA, Felipe Garcia. **Caracterização do efeito anticâncer de análogos de curcumina em linhagens de câncer de mama**. 2023. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

NISHIMURA, Felipe Garcia *et al.* The Transcriptome of BT-20 Breast Cancer Cells Exposed to Curcumin Analog NC2603 Reveals a Relationship between EGR3 Gene Modulation and Cell Migration Inhibition. **Molecules**, v. 29, 1366, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29061366> versão *online*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/6/1366>. Acesso em: 11 dez. 2024.

PEROU, Charles M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35021093>. Acesso em: 18 jul. 2023.

PIO, Rebecca *et al.* Early Growth Response 3 (Egr3) Is Highly Over-Expressed in Non-Relapsing Prostate Cancer but Not in Relapsing Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054096> versão *online*. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054096>. Acesso em 07 out. 2024.

PIRES, Bruno R. B. *et al.* NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169622> versão *online*. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169622>. Acesso em: 02 out. 2024.

QUINTANAL-VILLALONGA, Álvaro *et al.* Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 17, p. 360–371, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0340-z> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41571-020-0340-z>. Acesso em: 17 fev. 2024.

RAN, F. Ann *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nat Protoc**, v. 8, p. 2281-2308, out. 2013a. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2013.143>. Acesso em: 11 out. 2024.

RAN, F. Ann *et al.* Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380-1389, set. 2013b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021> versão *online*. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(13\)01015-](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(13)01015-)

5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867413010155%3Fshowall%3Dtrue. Acesso em: 13 out. 2024.

RÉCAMIER, Joseph-Claude-Anthelme. **Recherches sur le traitement du cancer:** par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire générale de la même maladie. 1829.

REN, Jianbo *et al.* Inhibition of miR-483-5p improves the proliferation, invasion and inflammatory response of triple-negative breast cancer cells by targeting SOCS3. *Exp Ther Med.*, v. 22, n. 4, p. 1047, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10480> versão *online*. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2021.10480>. Acesso em: 06 abr. 2025.

REYA, Tannishtha *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, p. 105-111, nov. 2001. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35102167>. Acesso em: 23 jul. 2023.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Egr-3 Inhibitors. Disponível em: <https://www.scbt.com/browse/egr-3-inhibitors?srsltid=AfmBOorlyqM3nLyAEaMRYSXN3do9sSzKr09Kkemu0AWIJaNwdh-aZM1B>. Acesso em: 07 mai. 2025.

SANTOS, Marceli de Oliveira *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 69, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700> versão *online*. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>. Acesso em: 07 jun. 2023.

SASI, Walid *et al.* Higher expression levels of SOCS 1,3,4,7 are associated with earlier tumour stage and better clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer*, v.10, n. 178, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-178> versão *online*. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-178>. Acesso em: 05 abr. 2025.

SEER – SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS PROGRAM. National Institutes of Health. National Cancer Institute. **Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer.** 2022. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. Acesso em: 23 jul. 2023.

SEIJAS, Ana *et al.* CRISPR/Cas9 Delivery Systems to Enhance Gene Editing Efficiency. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 26, n. 9, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26094420> versão *online*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/9/4420#B24-ijms-26-04420>. Acesso em: 21 jun. 2025.

SHIN, Seung-Hyun *et al.* Loss of EGR3 is an independent risk factor for metastatic progression in prostate cancer. **Oncogene**, v. 39, p. 5839-5854, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01418-5> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41388-020-01418-5>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SILVA, G. *et al.* Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0202263, ago. 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202263> versão *online*. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0202263>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SIOSON, Victor Aaron; KIM, Minjong; JOO, Jinmyoung. Challenges in delivery systems for CRISPR-based genome editing and opportunities of nanomedicine. **Biomed. Eng. Lett.**, v. 11, p. 217-233, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13534-021-00199-4> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13534-021-00199-4>. Acesso em: 13 jun. 2025.

SOERJOMATARAM, Isabelle; BRAY, Freddie. Global trends in cancer incidence and mortality. In: WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. (eds.). **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. cap. 1.2. p. 23-33. Acesso em: 07 jun. 2023.

SONG, Xinqiang *et al.* Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 1, p. 23-29, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9665> versão *online*. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/mmr/19/1/23#b1-mmr-19-01-0023>. Acesso em: 12 jan. 2024.

SØRLIE, Therese *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, set. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098> versão *online*. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.191367098>. Acesso em: 18 jul. 2023.

STRILIC, Boris; OFFERMANN, Stefan. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. **Cancer Cell**, v. 32, n. 3, p. 282-293, set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610817302933?via%3Dihub>. Acesso em: 03 out. 2024.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, maio/jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660> versão *online*. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 10 abr. 2023.

TALMADGE, James E.; FIDLER, Isaiah J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Res.**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, jul., 2010. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040> versão *online*. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/70/14/5649/559515/AACR-Centennial-Series-The-Biology-of-Cancer>. Acesso em: 23 jul. 2023.

THOMPSON, Matthew R.; XU, Dakang; WILLIAMS, Bryan R. G. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. **J Mol Med**, v. 87, p. 1053-1060, ago. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0520-x> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-009-0520-x>. Acesso em: 17 mar. 2025.

TORRE, Lindsey A. *et al.* Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 26, n. 4, p. 444-457, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0858> versão *online*. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/26/4/444/175887/Global-Cancer-in-Women-Burden-and-TrendsGlobal>. Acesso em: 05 jul. 2023.

TSANG, Julia Y. S.; TSE, Gary M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Adv Anat Pathol.**, v. 27, n. 1, p. 27-35, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000232> versão *online*. Disponível em: https://journals.lww.com/anatomicpathology/fulltext/2020/01000/molecular_classification_of_breast_cancer.5.aspx. Acesso em: 12 jul. 2023.

VISSER, Karin E. de; JOYCE, Johanna A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell.**, v. 41, n. 3, p. 374-403, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610823000442?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jan. 2024.

VOGEL, A.; PELLETIER, J. Examen chimique de la racine de Curcuma. **J Pharm.**, p. 289-300, 1815.

WAN, Xinxing *et al.* Shift work promotes adipogenesis via cortisol-dependent downregulation of EGR3-HDAC6 pathway. **Cell Death Discov.**, v. 10, n. 129, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01904-9> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41420-024-01904-9>. Acesso em: 24 jan. 2025.

WANG, Junxiang *et al.* EMP1 regulates cell proliferation, migration, and stemness in gliomas through PI3K-AKT signaling and CD44. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 17142-17150, mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.28974> versão *online*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.28974>. Acesso em: 09 abr. 2025.

WANG, Qiong *et al.* GADD45B Is a Potential Diagnostic and Therapeutic Target Gene in Chemotherapy-Resistant Prostate Cancer. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 9, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716501> versão *online*. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.716501/full>. Acesso em: 25 mar. 2025.

WIEDENHEFT, Blake; STERNBERG, Samuel H.; DOUDNA, Jennifer A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, p. 331-338, fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10886> versão *online*. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature10886>. Acesso em: 19 out. 2024.

WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. (eds.). **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. p. 15-44. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 05 jun. 2023.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019**. WHO: 2020. Disponível em:

<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Acesso em: 20 mar. 2023.

XIE, Jian-Jun *et al.* ATF3 functions as a novel tumor suppressor with prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8569-8582, 2014. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2322> versão *online*. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/2322/text/>. Acesso em: 06 abr.2025.

XU, Jialin *et al.* Curcumin analogues attenuate A β 25-35-induced oxidative stress in PC12 cells via Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathways. **Chem Biol Interact.**, v. 305, p. 171-179, mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.010> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279718310445?via%3Dihub>. Acesso em: 26 fev. 2024.

YEERAVALLI, Ragini; DAS, Amitava. Molecular mediators of breast cancer metastasis. **Hematol Oncol Stem Cell Ther.**, v. 14, n. 4, p. 275-289, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2021.02.002> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658387621000273#b0035>. Acesso em: 23 jul. 2023.

YING, Mingzhen *et al.* Loss of SOCS3 expression is associated with an increased risk of recurrent disease in breast carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 136, p. 1617-1626, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0819-6> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-010-0819-6>. Acesso em: 06 abr. 2025.

YIP, Cheng-Har. Challenges in the early detection of breast cancer in resource-poor settings. **Breast Cancer Manag.**, v. 5, n. 4, p. 161-169, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2217/bmt-2016-0026> versão *online*. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmt-2016-0026>. Acesso em: 12 jul. 2023.

ZHANG, Jun *et al.* EMP1 correlated with cancer progression and immune characteristics in pan-cancer and ovarian cancer. **Mol Genet Genomics**, v. 299, n. 51, mai. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-024-02146-1> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00438-024-02146-1>. Acesso em: 25 mar. 2025.

ZHANG, Shujuan *et al.* Early growth response 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Fas ligand. **Int J Oncol.**, v. 50, p. 805-814, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3855> versão *online*. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2017.3855#b5-ijo-50-03-0805>. Acesso em: 25 mar. 2025.

ZHANG, Ziheng *et al.* Curcumin analog, WZ37, promotes G2/M arrest and apoptosis of HNSCC cells through Akt/mTOR inhibition. **Toxicol in Vitro**, v. 65, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104754> versão *online*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088723331930325X?via%3Dihub#bb0010>. Acesso em: 05 out. 2024.

ZHAO, Shijie *et al.* Recent advances of analogues of curcumin for treatment of cancer. **Eur J Med Chem.**, v. 180, p. 524-535, out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.034> versão *online*. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523419306555?via%3Dihub>. Acesso em: 07 out. 2024.

ZHU, J.-G. *et al.* Prognostic value of ZFP36 and SOCS3 expressions in human prostate cancer. **Clin Transl Oncol.**, v. 18, p. 782-791, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1432-6> versão *online*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-015-1432-6>. Acesso em: 06 abr. 2025.