

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DA INIBIÇÃO QUÍMICA DA ENZIMA ANTIOXIDANTE SULFIRREDOXINA EM CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS

Aluna: Micheli Canuto de Lima

ORIENTADOR: Sérgio Luis Felisbino

CO-ORIENTADOR: Caroline Nascimento Barquilha

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular, Estrutural e Funcional (BCEF)

Sérgio Luis Felisbino

BOTUCATU – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lima, Micheli Canuto de.

Efeitos da inibição química da enzima antioxante
sulfirredoxina em células tumorais prostáticas / Micheli
Canuto de Lima. - Botucatu, 2025

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Sérgio Luis Felisbino

Coorientador: Caroline Nascimento Barquilha

Capes: 20601000

1. Neoplasias da próstata. 2. Cultura de células.
3. Esferoides celulares. 4. Enzimas.

Palavras-chave: Câncer de próstata; Cultura celular;
Esferóides; J14; Sulfirredoxina.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MICHELI CANUTO DE LIMA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 9h, no(a) Sala 07 da Central de Aulas do Instituto de Biociências de Botucatu, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MICHELI CANUTO DE LIMA, intitulada **Efeitos da inibição química da enzima antioxidante sulfirredoxina em células tumorais prostáticas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. SERGIO LUIS FELISBINO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Profa. Dra. TAIZE MACHADO AUGUSTO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Morfologia e Patologia Básica / Faculdade de Medicina de Jundiaí. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. SERGIO LUIS FELISBINO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que sempre acreditaram em mim e nunca hesitaram em me amar e apoiar em cada decisão ao longo de toda minha trajetória. Obrigada por celebrar e viver comigo cada conquista: mãe **Aurileide Alves Canuto de Lima**; pai **José de Lima Filho** e minha irmã **Milene Canuto de Lima**.

Agradecimentos Especiais

Primeiramente, quero agradecer aos pilares da minha vida, minha família: meus pais **José de Lima Filho**, minha mãe **Aurileide Alves Canuto de Lima** e minha irmã **Milene Canuto de Lima**. Obrigada por cada sacrifício, por cada palavra de incentivo e por todos os momentos por terem me apoiado e me dado forças para continuar, mesmo quando eu mesma queria desistir. Tudo o que eu conquistei é também de vocês.

Ao meu namorado, **Carlos Henrique Silva Simões**, meu maior companheiro durante essa jornada. Obrigada por me apoiar nos meus momentos mais difíceis, por celebrar cada vitória como se fosse a sua e por me lembrar, todos os dias, para ter uma vida mais leve e feliz. Sua presença mudou minha vida e, sou imensamente feliz por ter você ao meu lado.

Aos meus amigos do “LabMigos” - **Ana Beathriz Lorente, Érika Perez, Geovanna Amaro, Hector Baptista, Luiz Frediani Portela, Renato Mattos, e Victor Hugo Livani** – Gostaria de agradecer pela parceria, pelo apoio e por cada momento de aprendizado que compartilhamos. Nossas conversas, saídas e cafés tornaram essa jornada mais leve e significativa para mim. Obrigada por me salvarem e saibam que eu sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar ao lado de pessoas tão legais e incríveis como vocês.

Agradecimentos aos meus velhos amigos do “**Migos**”, grandes companheiros de jornada. Muito obrigada pelo excepcional apoio e incentivo que me deram durante toda minha jornada, vocês foram uma família para mim em Botucatu, amo vocês. E ao meu velho amigo do ensino médio **Hebrayn Dearo**.

A minha grande amiga e orientadora, **Caroline Nascimento Barquilha**, por ser a minha maior inspiração na ciência, sem você eu não seria a cientista que sou e que irei me tornar, obrigada por ter me dado oportunidade de estar aqui e pela honra de ter passado esse ano ao seu lado.

Agradecimento especial para **Veridiana Moura**, minha fada madrinha científica, todos os momentos ao seu lado foram de felicidade e aprendizado. Sua luz e sensibilidade são únicas, e levo comigo cada conselho e ensinamento que você me deu. Obrigada por tudo. Sinto saudades e sigo aprendendo com você, mesmo à distância.

Por fim, mas não menos importante ao meu grupo **do Laboratório de Matriz Extracelular**, - **Ana, Beatriz e Caio**, e ao meu orientador, Sérgio Luis Felisbino, por toda a

orientação, paciência e dedicação. Este trabalho não seria possível sem sua expertise e apoio. Muito obrigada por acreditar em mim.

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho representa não apenas o esforço acadêmico e científico, mas também a soma do apoio, incentivo e dedicação de muitas pessoas que, de diferentes formas, contribuíram para essa trajetória. A todos que fizeram parte dessa jornada, expresso minha mais profunda gratidão.

Gostaria de iniciar meus agradecimentos ao meu orientador, **Sérgio Luis Felisbino**, e à minha orientadora, **Caroline Nascimento Barquilha**, pela orientação, dedicação e suporte ao longo desta jornada acadêmica. Seu conhecimento e comprometimento foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos professores do departamento de **Biologia Estrutural e Funcional**, em especial aos professores **Luís Antônio Justulin Jr e Flávia Karina Delella** que contribuíram com seus ensinamentos e experiências, enriquecendo minha formação e ampliando meus horizontes acadêmicos. Seu trabalho inspira e motiva a busca pelo conhecimento.

Aos **servidores** do departamento de **Biologia Estrutural e Funcional**, que, com eficiência e disposição, garantem o funcionamento da instituição e proporcionam um ambiente propício para o desenvolvimento de pesquisas e estudos.

Aos meus **colegas e aos professores** do programa de pós-graduação em **Biologia Geral e Aplicada** pela colaboração, troca de ideias e pelo ambiente de trabalho agradável e produtivo. Foi um privilégio compartilhar essa jornada com pessoas tão competentes e dedicadas.

Às agências de fomento, **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) protocolo - 2023/09886-3 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** (código de financiamento 001) protocolo - 8887.826900/2023-00 pelo financiamento e apoio que tornaram possível a realização desta pesquisa.

Por fim, à minha instituição, **Instituto de Biociências de Botucatu – IBB** da **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, por proporcionar a estrutura e o ambiente acadêmico necessários para a realização deste trabalho. Sou grata por fazer parte de uma comunidade que valoriza a pesquisa e o desenvolvimento intelectual.

Lista de abreviações

ADT: Androgen Deprivation Therapy (Terapia de Privação de Andrógenos)

AI: Early Apoptosis (Apoptose Inicial)

AP-1: Activator Protein-1 (Proteína Ativadora-1)

AR: Androgen Receptor (Receptor de Andrógenos)

AT: Late Apoptosis (Apoptose Tardia)

ATCC: American Type Culture Collection (Coleção Americana de Culturas de Tipo)

BAX: BCL2-Associated X Protein (Proteína Associada a BCL2)

BCL2: B-Cell Lymphoma 2 (Linfoma de Células B 2)

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

BSO: Buthionine Sulfoximine (Butionina Sulfoximina)

CaP: Câncer de Próstata

CAT: Catalase (Catalase)

CIS: Carcinoma in Situ (Carcinoma in Situ)

CP: Cysteine Peroxidatic (Cisteína Peroxidática)

CR: Cysteine Resolution (Cisteína de Resolução)

DMSO: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sulfóxido)

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition (Transição Epitelial-Mesenquimal)

FBS: Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino)

GPx: Glutathione Peroxidase (Glutathione Peroxidase)

GSH: Glutathione (Glutathione)

H₂O₂: Hydrogen Peroxide (Peróxido de Hidrogênio)

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

IC₅₀: Half Maximal Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mediana)

INCA: Instituto Nacional de Câncer

ISUP: International Society of Urological Pathology (Sociedade Internacional de Patologia Urológica)

J14: Inibidor Químico da Sulfirredoxina

KEAP1: Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 (Proteína Associada a ECH Semelhante a Kelch 1)

mCRPC: Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (Câncer de Próstata Metastático Resistente à Castração)

MK167: Marcador de Proliferação Celular

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio)

N: Necrosis (Necrose)

Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Fator Nuclear Relacionado a Fator Eritroide 2)

PARPi: Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor (Inibidor de Poli (ADP-Ribose) Polimerase)

PCa: Prostate Cancer (Câncer de Próstata)

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia (Neoplasia Intraepitelial Prostática)

PRDX: Peroxiredoxin (Peroxirredoxina)

PSA: Prostate-Specific Antigen (Antígeno Prostático Específico)

ROS: Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Meio de Cultura RPMI)

SOD: Superoxide Dismutase (Superóxido Dismutase)

SRXN1: Sulfiredoxin (Sulfirredoxina)

Trx: Thioredoxin (Tiorredoxina)

WH: Wound Healing (Cicatrização de Feridas)

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura anatômica e histológica da próstata humana. (a) Representação esquemática das diferentes zonas da próstata, incluindo zona central, zona de transição, zona periférica, região fibromuscular e região periuretral. A próstata está localizada abaixo da bexiga e envolve a uretra. (b) Estrutura histológica do ducto prostático, mostrando as camadas celulares do epitélio prostático, incluindo células luminais, basais, intermediárias e neuroendócrinas, além da lâmina basal, músculo liso e estroma circundante. Imagem retirada de (Rebello et al., 2021).

Figura 2 – Fases do câncer de próstata e alterações genéticas. As mutações comuns no câncer de próstata são apresentadas de acordo com seu enriquecimento em diferentes estágios da doença. PIN, neoplasia intraepitelial prostática; CIS, carcinoma in situ e adenocarcinoma. Imagem e legenda traduzida e alterada de (1)

Figura 3 - O conteúdo de ROS faz a diferença no destino do tumor. a) Nos tumores, o metabolismo das células cancerígenas (especialmente a glicólise) e o TME específico (hipóxia, células estromais, etc.) são os geradores de ROS endógenos. E as ROS em níveis baixos a moderados (nível patológico nos tumores) também são benéficas para a iniciação e adaptação do tumor. No entanto, quando a concentração de ROS aumenta além da capacidade antioxidante, as células tumorais não conseguem mais suportar o dano causado pelas ROS e acabam indo em direção à morte final com destruição e disfunção. Além disso, o excesso de ROS promove outras terapias anticâncer, como a imunoterapia. b) Para quebrar a homeostase redox, aumentar a capacidade antioxidante e diminuir as ROS pode levar à depleção de ROS nos tumores, uma estratégia preventiva contra o câncer. E os métodos de amplificação de ROS são mais vantajosos na erradicação de tumores existentes. Legenda traduzida integralmente e imagem retira de Zhang et al., 2023 (2)

Figura 4 - A SRXN1 é capaz de reduzir as Prx 2-Cys hiperoxidadas, bem como regular suas atividades enquanto redoxinas e/ou chaperonas. Esquema retirado de “The sulfiredoxin-peroxiredoxin (Srx-Prx) axis in cell signal transduction and cancer development”; (Mishra et al., 2015)

Lista de Figuras – Capítulo 1

Figure 1 – A) Dose-response curve of the effects of SRXN1 chemical inhibition in advanced castration-resistant prostate cancer cells, with progressive exposure at three distinct time points. The graph represents the cell viability of PC-3 cells after exposure to the sulfiredoxin inhibitor at increasing doses of J14 (2-16 μ M), at 24 (orange), 48 (green), and 72 hours (blue). Absorbance data were expressed as a percentage, considering 100% viability at time 0. **B) Effects of the chemical inhibitor J14 at a dose of 6 μ M on PC-3 cells at 24h, 48h, and 72h.** The graph represents the cell viability of PC-3 cells after exposure to J14 at 24h (red), 48h (dark green), and 72h (dark blue), compared to the vehicle control, DMSO (white). Absorbance data were expressed as a percentage, considering 100% viability for cells exposed only to the DMSO vehicle at all time points. Statistically significant differences are indicated by ** for $p < 0.01$ and **** for $p < 0.0001$. **C) Representative images of PC-3 cells treated with J14 at a dose of 6 μ M at 24h, 48h, and 72h.** The left row shows cells treated with vehicle control (DMSO) over time, while the right row displays cells treated with the inhibitor J14 at a dose of 6 μ M. All images were captured at 5x magnification.

Figure 2 - A) Effects of the inhibitor J14 on PC-3 cell spheroids at different doses over 48 hours. The graph represents cell viability after exposure to J14 for 48 hours at different concentrations: 3 μ M (light gray), 6 μ M (green), and 18 μ M (black), compared to the vehicle control, DMSO (white). Absorbance data were expressed as a percentage, considering 100% viability for cells exposed only to the DMSO vehicle. Statistically significant differences are indicated by **** for $p < 0.0001$. **B) Representative images of spheroids at different time points and concentrations of J14 exposure.** The images represent groups exposed to different doses of J14 (3, 6, and 18 μ M) over the exposure time, with row (I) at 0 hours of treatment (48 hours after plating) and row (II) at 48 hours of treatment. All images were taken at 5x magnification.

Figure 3 – Impact of the J14 inhibitor on benign prostate cells (PNT-2) at different doses over 48 hours. The graph represents cell viability after 48 hours of exposure to J14 at different concentrations: light gray (2 μ M), medium gray (4 μ M), green (6 μ M), dark gray (8 μ M), and black (16 μ M), compared to the vehicle control, DMSO (white). Absorbance data were expressed as a percentage, considering 100% viability for cells exposed only to the DMSO vehicle. Statistically significant differences are indicated by **** for $p < 0.0001$.

Figure 4 - Effects of J14-Mediated Inhibition of SRXN1 on Cell Death Parameters in Advanced PC-3 prostate Cancer Cells. Dot plot graphs are presented by time and group: the vehicle control (DMSO) group is represented by A | D | G, and the J14-treated group (6 μ M) is represented by B| E| H at 24, 48, and 72 hours, respectively. Comparative graphs of cell death parameters for each time point are shown in C (24h) | F (48h) | I (72h). The analyzed parameters include V - viable cells; AI - early apoptotic cells; AT - late apoptosis; and N - necrotic cells. The p-values are indicated as ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$, and **** for $p < 0.0001$.

Figure 5 - Effects of J14-Mediated Inhibition of SRXN1 on Cell Cycle Phases in PC-3 Cells. Dot plot graphs are presented by time and group: the vehicle control (DMSO) group is represented as A and D, while the J14-treated group (6 μ M) is represented as B and E at 24 and 48 hours, respectively. Comparative graphs of cell cycle phases by time point are shown in C (24h) and F (48h). The analyzed parameters include the G1, S, and G2 phases. p-values are indicated as * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$.

Figure 6 – A) Sulfiredoxin (J14) Chemical Inhibitor Reduces PC-3 Cell Migration After Treatment. The graph and images represent the wound healing (WH) assay of PC-3 cells following exposure to the J14 inhibitor (green) or vehicle (DMSO- white) for 24, 48, and 72 hours. The graph data (wound closure area) are expressed as a percentage relative to the initial empty area at 0 hours, used as a reference. p-values are indicated as * for $p < 0.05$ and *** for $p < 0.001$. **B) Representative image of wound closure over time after exposure to J14 at a dose of 6 μ M.** The columns represent the different time points analyzed: 0h, 24h, 48h, and 72h, respectively, while the rows show the experimental conditions, with the first row corresponding to the vehicle control (DMSO) and the second to the treatment (J14, 6 μ M)

Supplemental figure 1 – Dose-response curve of the effects of the chemical inhibitor (J14) on benign prostate cells (PNT-2). The graph represents the cell viability of PNT-2 cells after exposure to the sulfiredoxin inhibitor at increasing doses of J14 (2-16 μ M), at 48 (green). Absorbance data were expressed as a percentage, considering 100% viability at time 0.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

Você sabia que o câncer de próstata é o segundo câncer mais incidente no Brasil e o segundo maior em mortalidade masculina? Isto significa que, em comparação com todos os outros cânceres existentes e que afetam os homens, o câncer de próstata é um dos que mais atinge e que mais mata essa parcela da população. Mas o que é o câncer? De maneira geral e resumida, "câncer" é um termo utilizado para referenciar mais de 100 tipos de doenças, as quais tem em comum o crescimento rápido e sem controle de células de determinado órgão, sendo que essas células podem ou não se espalhar para outros locais do corpo. Este projeto de pesquisa tem como objetivo encontrar um novo tratamento auxiliar que ajude os quimioterápicos, medicamentos capazes de matar as células cancerígenas que estão se multiplicando muito, a serem mais eficazes no combate ao câncer de próstata avançado. Nesses estágios, quando os tratamentos convencionais já não funcionam mais, os pacientes alcançam um estágio chamado de "câncer de próstata resistente à castração" onde 70% dos pacientes têm uma expectativa de vida menor que 5 anos de vida. Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso laboratório apontaram que no câncer de próstata avançado existe um aumento nos níveis de produção de uma enzima antioxidante chamada sulfirredoxina, a qual age neutralizando os radicais livres produzidos pela célula, protegendo as células cancerígenas dos tratamentos convencionais contra o câncer. No câncer, essa alta produção pode ajudar o tumor a se estabelecer e pode tornar ele mais resistente aos tratamentos, principalmente aqueles que tem como mecanismo de ação a produção de radicais livres. Por isso, a nossa hipótese (pergunta norteadora) é avaliar se quando diminuirmos a produção dessa enzima há uma melhora do paciente. Durante meu mestrado, o modo que escolhemos para diminuir a atividade dessa enzima foi utilizando um inibidor químico, que nada mais é do que uma molécula capaz de se ligar a enzima e impedir que ela faça o seu papel naquela célula. Acreditamos que, com a inibição da sulfirredoxina, as células tumorais se tornarão mais sensíveis aos radicais livres e mais vulneráveis à ação dos medicamentos, o que pode levar à regressão do câncer de próstata mesmo em estágios avançados refletindo num aumento na sobrevida dos pacientes. Mesmo nossa pesquisa sendo direcionada para os estágios mais avançados do câncer de próstata, essa doença ainda tem um percentual de cura muito alto quando diagnosticado e tratado em estágios iniciais e, por isso, a importância de fazer o exame do câncer de próstata, principalmente em homens acima de 50 anos. Então se você se encaixa ou conhece algum homem com mais de 50 anos, o incentive a procurar um médico e fazer o exame de próstata.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia mais comum entre homens e uma das principais causas de mortalidade por câncer no mundo. Nos estágios mais avançados, como o metastático e resistente à castração (mCPRC), as opções de tratamento são limitadas, e a sobrevivência dos pacientes é drasticamente reduzida. Em estudos recentes, a enzima antioxidante sulfirredoxina (SRXN1) tem sido associada à progressão tumoral e à resistência ao tratamento, especialmente àqueles que têm como mecanismo de ação a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A partir dessa premissa, o atual trabalho teve como objetivo investigar os efeitos funcionais do inibidor químico da SRXN1 (J14) em células de CaP avançado (linhagem PC-3), esferoides 3D e células benignas de próstata (PNT-2). Foram realizados ensaios de viabilidade celular (MTT), análise de apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo, além de análises de migração (*Wound Healing*). Os resultados demonstraram que o J14 reduz significativamente a viabilidade das células PC-3, com valores de IC₅₀ de 7,5 μ M (24 horas), 6,9 μ M (48 horas) e 5,1 μ M (72 horas). Em esferoides 3D, apenas a concentração mais alta (18 μ M) reduziu a viabilidade, enquanto células benignas (PNT-2) apresentaram menor sensibilidade (IC₅₀ = 12,08 μ M), indicando seletividade do composto para células tumorais. A análise do ciclo celular revelou que o J14 interfere na síntese de DNA, reduzindo a porcentagem de células na fase S após 24 horas e na fase G2 após 48 horas, levando à parada do ciclo e à indução de apoptose inicial após 48 e 72 horas. Além disso, o J14 inibiu a migração celular após 48 e 72 horas, sugerindo um efeito antimetastático. Esses achados destacam o potencial terapêutico da inibição da SRXN1 no tratamento do CaP avançado, com efeitos seletivos sobre células tumorais e promissores para futuras investigações pré-clínicas. Portanto, futuras pesquisas devem se dedicar a investigar mais detalhadamente a SRXN1 e suas implicações na terapia do CaP, utilizando modelos ainda mais complexos, com o objetivo de desenvolver novas estratégias que melhorem o diagnóstico e a sobrevida dos pacientes.

Palavras-chave: SRXN1 – alvo terapêutico – inibição química – J14 – esferoides.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer among men and one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide. In advanced stages, such as metastatic and castration-resistant prostate cancer (mCRPC), treatment options are limited, and patient survival is drastically reduced. Recent studies have associated the antioxidant enzyme sulfiredoxin (SRXN1) with tumor progression and treatment resistance, particularly in therapies that rely on the production of reactive oxygen species (ROS). Based on this premise, the present study aimed to investigate the functional effects of the SRXN1 chemical inhibitor (J14) on advanced PCa cells (PC-3 cell line), 3D spheroids, and benign prostate cells (PNT-2). Cell viability assays (MTT), apoptosis and cell cycle analysis by flow cytometry, and migration assays (Wound Healing) were performed. The results demonstrated that J14 significantly reduces the viability of PC-3 cells, with IC₅₀ values of 7.5 μ M (24 hours), 6.9 μ M (48 hours), and 5.1 μ M (72 hours). In 3D spheroids, only the highest concentration (18 μ M) reduced viability, while benign cells (PNT-2) showed lower sensitivity (IC₅₀ = 12.08 μ M), indicating the compound's selectivity for tumor cells. Cell cycle analysis revealed that J14 interferes with DNA synthesis, reducing the percentage of cells in the S phase after 24 hours and in the G2 phase after 48 hours, leading to cell cycle arrest and the induction of early apoptosis after 48 and 72 hours. Additionally, J14 inhibited cell migration after 48 and 72 hours, suggesting an antimetastatic effect. These findings highlight the therapeutic potential of SRXN1 inhibition in the treatment of advanced PCa, with selective effects on tumor cells and promising prospects for future preclinical investigations. Therefore, future research should focus on further investigating SRXN1 and its implications in PCa therapy, using more complex models, with the aim of developing new strategies to improve diagnosis and patient survival.

Keywords: SRXN1 – therapeutic target – chemical inhibition – J14 – spheroids.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Próstata	14
1.2 Câncer de Próstata	15
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio e Câncer.....	18
1.4 Enzima Sulfirredoxina (SRXN1).....	20
1.5 Inibição da Sulfirredoxina como Estratégia Terapêutica	22
1.6 Inibidor de sulfirredoxina (J14).....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. RESULTADOS.....	26
5. CONSTATAÇÕES.....	26
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
Capítulo 1 –	33
Artigo Científico.....	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Próstata

A próstata humana é uma glândula exócrina cuja principal função é a produção de secreções para o fluido seminal, correspondente a cerca de 30% do seu volume total. Essa glândula pertence ao sistema reprodutor masculina e está localizada na base na bexiga urinária apresentando o tamanho semelhante ao de uma noz (1,4). Além do seu papel essencial na reprodução, a próstata também possui grande relevância clínica devido à sua associação patológicas como; a hiperplasia prostática benigna (HPB), as prostatites e ao câncer de próstata (CaP) (5)

Anatomicamente, a próstata humana adulta é composta por diferentes zonas; central, de transição, periférica, além das regiões fibromuscular (estroma) e periuretral. Cada zona apresenta características e funções específicas dentro do ambiente prostático: (a) A zona periférica corresponde a maior porção da próstata, representando mais de 70% da sua área total, sendo também a região com maior incidência de tumores, uma vez que 80% dos tumores ocorrem nesse local; (b) A zona central representa aproximadamente 20-25% da próstata, com ductos que começam perto dos ductos ejaculatórios e se ramificam perto da base da próstata. (c) Zona de transição, corresponde de 5-10% do volume da próstata e é separada das demais zonas por uma faixa fibromuscular (1,6,7).

A próstata é composta por ductos e ácinos, compostos por um epitélio glandular, embutidos em um estroma fibromuscular. O epitélio da porção glandular é composto por duas camadas diferentes: a primeira camada é a luminal secretora, composta principalmente por células colunares altas que são responsáveis pela produção dos componentes do fluido seminal, sendo esses componentes; fosfatase ácida, calicreína-2 humana e antígeno prostático específico (PSA). O PSA é uma serina protease ativada transcricionalmente pelo receptor de andrógenos (AR) e frequentemente elevada em homens com disfunções prostáticas como HPB ou CaP, portanto, amplamente utilizada na detecção e diagnóstico do CaP, revolucionando assim o rastreamento do CaP. Essa camada luminal é sustentada por uma segunda camada basal de células epiteliais cuboides e células neuroendócrinas, que, por sua vez, é circundada por uma membrana basal de matriz extracelular, que separa a células basais do estroma (1,6,7).

Estudar a próstata é fundamental, pois é nesse órgão que se desenvolve o câncer de próstata (CaP), a neoplasia maligna mais comum entre os homens e uma das principais causas de mortalidade por câncer no mundo (8). Devido à sua alta incidência e impacto clínico,

REFERENCE

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I and Jemal A: Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74: 229–263, 2024.
2. Siegel RL, Giaquinto AN and Jemal A: Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 74: 12–49, 2024.
3. Attard G, Parker C, Eeles RA, *et al.*: Prostate cancer. *The Lancet* 387: 70–82, 2016.
4. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, *et al.*: Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1 7: 1–27, 2021.
5. Weinberg F and Chandel NS: Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell Mol Life Sci* 66: 3663–3673, 2009.
6. Kim H, Lee GR, Kim J, *et al.*: Sulfiredoxin inhibitor induces preferential death of cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial damage. *Free Radic Biol Med* 91: 264–274, 2016.
7. Zhang H, Mao Z, Kang Y, Zhang W, Mei L and Ji X: Redox regulation and its emerging roles in cancer treatment. *Coord Chem Rev* 475: 214897, 2023.
8. E.M. H, J.R. G, C. B, C. H and C.H. and L: Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 19: 1539–1605, 2013.
9. Mishra M, Jiang H, Chawsheen HA, Gerard M, Toledano MB and Wei Q: Nrf2-activated expression of sulfiredoxin contributes to urethane-induced lung tumorigenesis. *Cancer Lett* 432: 216–226, 2018.
10. Wei Q, Jiang H, Xiao Z, Baker A, Young MR, Veenstra TD and Colburn NH: Sulfiredoxin-peroxiredoxin IV axis promotes human lung cancer progression through modulation of specific phosphokinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7004–7009, 2011.
11. Kim YS, Lee HL, Lee KB, *et al.*: Nuclear factor E2-related factor 2 dependent overexpression of sulfiredoxin and peroxiredoxin III in human lung cancer. *Korean Journal of Internal Medicine* 26: 304–313, 2011.
12. Hao Y, Jiang H, Thapa P, *et al.*: Critical Role of the Sulfiredoxin-Peroxiredoxin IV Axis in Urethane-Induced Non-Small Cell Lung Cancer. *Antioxidants* 12, 2023.

13. Chawsheen HA, Jiang H, Ying Q, Ding N, Thapa P and Wei Q: The redox regulator sulfiredoxin forms a complex with thioredoxin domain–containing 5 protein in response to ER stress in lung cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 294: 8991–9006, 2019.
14. Jiang H, Wu L, Chen J, Mishra M, Chawsheen HA, Zhu H and Wei Q: Sulfiredoxin promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis through a novel mechanism of enhancing EGFR signaling. *Molecular Cancer Research* 13: 1554–1566, 2015.
15. Wei Q, Jiang H, Matthews CP and Colburn NH: Sulfiredoxin is an AP-1 target gene that is required for transformation and shows elevated expression in human skin malignancies., 2008.
16. Lan K, Zhao Y, Fan Y, *et al.*: Sulfiredoxin may promote cervical cancer metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Int J Mol Sci* 18, 2017.
17. Chen X, Lan K, Liu Q, Yang X and Wang H: Sulfiredoxin may promote metastasis and invasion of cervical squamous cell carcinoma by epithelial–mesenchymal transition. *Tumor Biology* 39: 1–10, 2017.
18. Barquilha CN, Santos NJ, Moncaõ CCD, *et al.*: Sulfiredoxin as a Potential Therapeutic Target for Advanced and Metastatic Prostate Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2020, 2020.
19. Portela LM, Santos SA, Constantino FB, *et al.*: Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. *Mol Cell Endocrinol* 523: 111148, 2021.
20. Chio IIC and Tuveson DA: ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med* 23: 411–429, 2017.
21. Wang Y, Qi H, Liu Y, *et al.*: The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics* 11: 4839, 2021.
22. Boyd LK, Mao X and Lu YJ: The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity. *Nature Reviews Urology* 2012 9:11 9: 652–664, 2012.
23. Wasim S, Lee SY and Kim J: Complexities of Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 14257 23: 14257, 2022.
24. Rao QW, Zhang SL, Guo MZ, *et al.*: Sulfiredoxin-1 is a promising novel prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* 9: 8318–8332, 2020.
25. Kim J, Lee GR, Kim H, *et al.*: Effective killing of cancer cells and regression of tumor growth by K27 targeting sulfiredoxin. *Free Radic Biol Med* 101: 384–392, 2016.
26. Mishra M, Jiang H, Wu L, Chawsheen HA and Wei Q: The sulfiredoxin–peroxiredoxin (Srx–Prx) axis in cell signal transduction and cancer development. *Cancer Lett* 366: 150–159, 2015.

27. Kim M, Kwon J, Goo J il, Choi Y and Cho AE: Elucidation of the inhibition mechanism of sulfiredoxin using molecular modeling and development of its inhibitors. *J Mol Graph Model* 92: 208–215, 2019.
28. Wang W, Liu X, Zhang Z, Yin M, Chen X, Zhao S and Wu L: Apigenin Induced Apoptosis by Downregulating Sulfiredoxin Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 2022.
29. Song IS, Jeong YJ, Kim JE, Shin J and Jang SW: Frugoside induces mitochondria-mediated apoptotic cell death through inhibition of sulfiredoxin expression in melanoma cells. *Cancers (Basel)* 11, 2019.
30. Findlay VJ, Tapiero H and Townsend DM: Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59: 374–379, 2005.
31. Song IS, Jeong YJ, Jung Y, *et al.*: The sulfiredoxin-peroxiredoxin redox system regulates the stemness and survival of colon cancer stem cells. *Redox Biol* 48, 2021.
32. Jeong W, Bae SH, Toledano MB and Rhee SG: Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radic Biol Med* 53: 447–456, 2012.
33. Jiang H, Thapa P, Ding N, *et al.*: Sulfiredoxin Promotes Cancer Cell Invasion through Regulation of the miR143-Fascin Axis. *Mol Cell Biol* 42, 2022.
34. Rodrigues PC, Sawazaki-Calone I, de Oliveira CE, *et al.*: Fascin promotes migration and invasion and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8: 74736, 2017.
35. Lv X, Yu H, Zhang Q, *et al.*: SRXN1 stimulates hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis through modulating ROS/p65/BTG2 signalling. *J Cell Mol Med* 24: 10714–10729, 2020.