UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* da associação farmacológica entre Genisteína e quimioterápicos no tratamento de câncer de mama

Patrícia Heloise Alves Bezerra

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* da associação farmacológica entre Genisteína e quimioterápicos no tratamento de câncer de mama

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Patrícia Heloise Alves Bezerra

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Torqueti

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 26/11/2020 (Data da Defesa). A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

ALVES BEZERRA, P.H.	Avaliação <i>in vitro</i> da associação farmacológica entre Genisteína e quimioterápicos no tratamento de câncer de mama	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO FCFRPUSP 2020
---------------------------	--	---	---------------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Alves Bezerra, Patrícia Heloise

Avaliação *in vitro* da associação farmacológica entre Genisteína e quimioterápicos no tratamento de câncer de mama. Ribeirão Preto, 2020.

94 p : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Torqueti, Maria Regina.

1. Câncer de mama. 2. Genisteína. 3. SERM. 4. IA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Heloise Alves Bezerra

Avaliação *in vitro* da associação farmacológica entre Genisteína e quimioterápicos no tratamento de câncer de mama

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais e amigos, que me apoiaram
e tornaram possível a realização desta.

Aos cientistas brasileiros que, apesar de
todas as dificuldades, buscam promover
melhorias significativas nas vidas das
pessoas.

Agradecimientos

Primeiramente, agradeço a Deus, que é o meu maior guia e que coloca sempre as melhores pessoas em meu caminho.

À minha família, pais, irmãos, cunhadas e sobrinho que me apóiam em meus projetos e me inspiram a perseverar diante das dificuldades, que compreendem as minhas ausências e se fazem presentes mesmo à distância.

Aos meus amigos, cientistas ou cotidianos, que compartilham experiências e tornam a vida mais leve e apreciada: aos momentos de risada e parceria. Em especial, à Giovanna Celucci e à Mariana Bartilotti.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Regina Torqueti que faz o impossível pelos seus alunos. Pelos conhecimentos transferidos, pela oportunidade, pela paciência, pela atenção e por resgatar o significado da palavra Mestra no cenário da educação brasileira. Pelas conversas e orientações profissionais e pessoais e pelo grande respeito que sempre demonstrou para qualquer um que entrasse em seu gabinete.

Aos colegas de laboratório, pelos ensinamentos, pelas horas de diversão e pelas de trabalho também. Pela doçura e carinho com que me acolheram e dividiram o dia-a-dia comigo. Em especial, à Beatriz Tinoco, Isadora Marques e Bianca Leite.

Aos colaboradores deste trabalho, Isadora Marques Ferreira e Ms. Fabien Trouille, por se dedicarem às etapas de *Western Blot* e Estudo de células-tronco tumorais, gerando resultados importantes que foram incorporados à essa tese.

Aos técnicos Tânia Mara Casare, Luciana Ambrósio, Luiz Chaim e Solange Fernandes, pelos ensinamentos, favores, parcerias, bom humor e paciência.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Natércia Teixeira, por possibilitar a realização de um doutorado sanduíche na Universidade do Porto. Pela orientação e zelo, pelo empenho em estreitar laços com a Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e à Universidade do Porto, por prover o necessário à realização desse trabalho.

À equipe e coordenação da Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP pela solicitude e pelos direcionamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Epígrafe

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muita, nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

ALVES BEZERRA, P. H. Avaliação *in vitro* da associação farmacológica entre Genisteína e quimioterápicos no tratamento de câncer de mama. 2020. 94f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete e a que mais mata mulheres no mundo. A abordagem terapêutica primária para este tipo de câncer na rede pública brasileira se dá através dos moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), como o Tamoxifeno, e dos inibidores da enzima aromatase (IAs), como o Exemestano, Anastrozol e Letrozol. A grande problemática para esses tratamentos é o desenvolvimento de carcinomas resistentes à terapia convencional. Logo, a Genisteína, fitoestrogênio presente na soja, vem mostrando resultados antitumorais promissores. A fim de elucidar se a Genisteína possui efeito benéfico quando associada a esses quimioterápicos, esse trabalho se propôs a estudar o efeito combinado destes compostos através dos parâmetros de viabilidade celular, combinação farmacológica, progressão de ciclo celular, ativação de morte celular (apoptose, necrose e autofagia) e número de células-tronco tumorais (CTT) em 3 linhagens de câncer de mama: Luminal (MCF7), que superexpressa HER2 (SKBR3) e Triplo Negativo (MDAMB231), tendo como controle células epiteliais mamárias benignas (MCF10A). Além disso, também foram avaliados os efeitos combinados nas linhagens MCF7aro e LTEDaro, tendo como controle fibroblastos humanos (HFF1). Dessa forma, os resultados mostraram que a dose de 100µM da Genisteína quando combinada aos metabólitos do Tamoxifeno diminui grandemente o IC₅₀ dos metabólitos frente às linhagens MCF7 e MDAMB231, havendo sinergia, mas não à SKBR3, havendo, ainda, benefícios em relação à linhagem benigna. Assim, há indução de apoptose (vias intrínseca e extrínseca), diminuição de autofagia e maior retenção do ciclo celular nas linhagens tumorais quando tratadas com as combinações. Ainda, a combinação da Genisteína a 1µM potencializou os efeitos do Exemestano, mas não dos outros inibidores de aromatase (Anastrozol e Letrozol), através de promoção da atividade antiproliferativa, mas não pró-apoptótica, na linhagem MCF7aro, mas a isoflavona não mostrou efeitos significativos na linhagem LTEDaro. Finalmente, a combinação do Tamoxifeno e Exemestano com a Genisteína mostra-se um tratamento promissor diante de condições tumorais de mama específicas, tendo o potencial de diminuir os efeitos colaterais promovidos por tais quimioterápicos e alongar o período de não-resistência do tumor ao tratamento, devido à promoção de menores doses de quimioterápico.

Palavras-chave: Genisteína, SERMs, inibidores da aromatase.

ABSTRACT

ALVES BEZERRA, P. H. *In vitro* evaluation of the pharmacologic association between Genistein and chemotherapeutics in breast cancer treatment. 2020. 94f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Breast cancer is the neoplasm that most affects and kills women in the world. The primary therapeutic approach for this type of cancer in the Brazilian public health system is through selective estrogen receptor modulators (SERMs), such as Tamoxifen, and aromatase inhibitors (AIs), such as Exemestane, Anastrozole and Letrozole. The major problem for these treatments is the development of carcinomas which are resistant to the conventional therapy. Genistein, a phytoestrogen present in soybeans, has shown promising antitumor results. In order to elucidate whether Genistein has a beneficial effect when associated with these chemotherapeutic agents, this study proposed to elucidate the combined effect of these compounds through the parameters of cell viability, pharmacological combination, cell cycle progression, activation of cell death (apoptosis, necrosis and autophagy) and number of cancer stem cells (CSCs) in 3 breast cancer cell lines: Luminal (MCF7), HER2-enhanced (SKBR3) and Triple Negative (MDAMB231), having benign breast epithelial cells (MCF10A) as control. In addition, the combined effects in MCF7aro and LTEDaro cell lines were also evaluated, having human fibroblasts (HFF1) as control. Thus, the present results showed that when combined with the metabolites of Tamoxifen, Genistein at the dose of 100 μ M greatly decreases the IC₅₀ of the metabolites against the MCF7 and MDAMB231 cell lines, demonstrating synergy, but not for SKBR3, showing benefits in relation to the benign strain. Therefore, there was induction of apoptosis (intrinsic and extrinsic pathways), decreased autophagy and greater retention of the cell cycle in tumor cell lines when treated with the combinations. In addition, the combination of 1 μ M Genistein potentiated the effects of Exemestane, but not of the other aromatase inhibitors (Anastrozole and Letrozole), by promoting antiproliferative, but not pro-apoptotic, activity in the MCF7aro cell line, but the isoflavone did not show significant effects on the LTEDaro cell line. Finally, the combination of Tamoxifen and Exemestane with Genistein proves to be a promising treatment to specific breast tumors, having the potential to reduce the side effects caused by chemotherapeutic agents and to lengthen the period of non-resistance of the tumor to treatment, due to the promotion of lower doses of chemotherapy.

Keywords: Genistein, SERMs, aromatase inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência estimada para novos casos de câncer em 2018 e 2040 para todas as neoplasias, ambos os sexos e todas as idades. Adaptado de GLOBOCAN (2018) (1).....	11
Figura 2. Estimativa global da incidência dos diferentes tipos de câncer para o ano de 2018. Adaptado de GLOBOCAN (2018) (1).....	11
Figura 3. Estimativa da incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres para 2020 no Brasil.....	12
Figura 4. Transição epitélio-mesenquimal e metástase dos carcinomas mamários.....	16
Figura 5. Metabolismo do Tamoxifeno pelas enzimas do citocromo P450.....	22
Figura 6. Teoria das células-tronco tumorais: resistência à terapia convencional e recidiva. ..	27
Figura 7. Marcadores biológicos dos carcinomas.....	27
Figura 8. Viabilidade celular das linhagens de mama (tumorais e benigna) frente ao tratamento com Genisteína por 24h, quantificada via ensaio de incorporação de vermelho neutro. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,01$ vs. o controle negativo (RPMI) (ANOVA combinada com pós-teste de Dunnett).....	45
Figura 9. Viabilidade celular das diferentes linhagens celulares após tratamentos combinados com a Genisteína e os metabólitos do Tamoxifeno por 24h. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo (RPMI) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnett). ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ vs. quimioterápico correspondente em tratamento isolado; ns: diferença não significativa (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). G: Genisteína; D: N-desmetiltamoxifeno; H: 4-hidroxitamoxifeno.	48
Figura 10. Isobogramas para comparação do IC_{50} após tratamentos com os metabólitos do Tamoxifeno isolados e em combinação com a Genisteína a $100\mu M$ nas linhagens tumorais de mama MCF7, SKBR3 e MDAMB231. Cada ponto representa a média de 3 ensaios de viabilidade celular em triplicata. O IC_{50} representa a dose do antitumoral em que há diminuição de 50% da viabilidade celular.	49
Figura 11. Avaliação das fases do ciclo celular nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDAMB231 após tratamentos combinados com a Genisteína e os metabólitos do Tamoxifeno por 24h pelo método de citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. controle negativo (RPMI) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ vs. quimioterápico correspondente em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Ausência de marcação indica diferença não-significativa. G: Genisteína; D: N-desmetiltamoxifeno; H: 4-hidroxitamoxifeno.	52
Figura 12. Caracterização da morte celular das linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDAMB231 após tratamentos combinados com a Genisteína e os metabólitos do Tamoxifeno por 24h pelo método de citometria de fluxo após marcação com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo (RPMI) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$ vs. quimioterápico correspondente em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de	

Bonferroni). Ausência de marcação indica diferença não-significativa. G: Genisteína; D: N-desmetiltamoxifeno; H: 4-hidroxitamoxifeno. 55

Figura 13. Caracterização da morte celular nas linhagens MCF7 e MDAMB231 através da expressão de proteínas-chave nas vias de sinalização da apoptose e autofagia pelo método de *Western Blot*. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo (RPMI) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ vs. quimioterápico correspondente em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). ns: diferença não-significativa. G: Genisteína; D: N-desmetiltamoxifeno. 56

Figura 14. Avaliação das células-tronco tumorais (CTTs) na linhagem MDAMB231 após tratamentos combinados com a Genisteína e os metabólitos do Tamoxifeno por 24h pelo método de citometria de fluxo após marcação com APC-anti-CD44, FITC-anti-CD24 e iodeto de propídeo. A: quantificação de células-tronco tumorais viáveis; B: quantificação de células não tronco tumorais não-viáveis. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. *** $p < 0,001$ vs. controle negativo (RPMI) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). ## $p < 0,01$ vs. quimioterápico correspondente em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Ausência de marcação e ns indicam diferença não-significativa. G: Genisteína; D: N-desmetiltamoxifeno; H: 4-hidroxitamoxifeno. 60

Figura 15. Viabilidade celular das linhagens de mama resistentes (MCF7aro e LTEDaro) e linhagem de fibroblastos (HFF1) (controle) frente ao tratamento com Genisteína por 72h, quantificada via ensaio de MTT. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,01$ vs. o controle negativo (0) (ANOVA combinada com pós-teste de Dunnett). 62

Figura 16. Viabilidade celular da linhagem MCF7aro após tratamentos combinados com a Genisteína e os inibidores da aromatase Exemestano, Anastrozol e Letrozol por 72h. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ vs. quimioterápico correspondente em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Ausência de marcação indica diferença não-significativa. 63

Figura 17. Avaliação das fases do ciclo celular na linhagem MCF7aro após tratamentos isolado e combinado da Genisteína com o Exemestano por 72h pelo método de citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo (MEM + T) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). # $p < 0,05$ vs. Exemestano em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Ns indica diferença não-significativa. G: Genisteína; Exe: Exemestano. 65

Figura 18. Quantificação da expressão proteica de Ciclina E na linhagem MCF7aro após tratamentos isolado e combinado da Genisteína com Exemestano por 72h, através de metodologia *Western Blot*. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes. **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo (MEM + T) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). ## $p < 0,01$ vs. Exemestano em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). A ausência de marcação indica diferença não-significativa. G: Genisteína; Exe: Exemestano. 66

Figura 19. Caracterização da morte celular da linhagem MCF7aro após tratamentos isolado e combinado da Genisteína com o Exemestano por 72h. A: quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) por método colorimétrico. B: expressão das proteínas PARP e Pró-caspase 7 pelo método de *Western Blot*. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. controle

negativo (MEM + T) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). # $p < 0,05$ vs. Exemestano em tratamento isolado (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). A ausência de marcação e ns indicam diferença não-significativa. G: Genisteína; Exe: Exemestano. 68

Figura 20. Efeitos da Genisteína e de sua combinação com o Exemestano na enzima aromatase da linhagem MCF7ARO. A: comparação entre a viabilidade celular do tratamento com Genisteína em meio de cultura (MEM + T) vs. meio de cultura com o inibidor da atividade de aromatase, o Estradiol (MEM + E₂), quantificada através de MTT, após tratamentos de 72h. B: expressão da enzima Aromatase pelo método de Western Blot, após tratamentos de 8h. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $p < 0,0001$ vs. controle negativo (MEM + T) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). A ausência de marcação e ns indicam diferença não-significativa. G: Genisteína; Exe: Exemestano; T: Testosterona; E₂: Estradiol; MIC: Microssomas de placenta (controle positivo para expressão de Aromatase)..... 70

Figura 21. Efeitos da Genisteína e de sua combinação com o Exemestano nos receptores de estrogênio da linhagem MCF7ARO, após tratamentos de 72h. A, B: comparação entre a viabilidade celular do tratamento com Genisteína em meio de cultura (MEM + T) vs. meio de cultura com o inibidor de receptores de estrogênio alfa (ICI) ou beta (PHTPP), quantificada através de MTT. C, D: expressão dos receptores de estrogênio alfa e beta pelo método de Western Blot. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $p < 0,0001$ vs. controle negativo (MEM + T) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). A ausência de marcação e ns indicam diferença não-significativa. G: Genisteína; Exe: Exemestano; T: Testosterona; ICI: ICI 182,780; PHTPP: 4- [2-fenil-5,7-bis(trifluorometil) pirazolo [1,5-a] pirimidin-3-il] fenol..... 72

Figura 22. Efeitos da Genisteína e de sua combinação com o Exemestano no receptor de androgênio da linhagem MCF7ARO, após tratamentos de 72h. A: comparação entre a viabilidade celular do tratamento com Genisteína em meio de cultura (MEM + T) vs. meio de cultura com o inibidor de receptor de androgênio (CDX), quantificada através de MTT. B: expressão do receptor de androgênio pelo método de Western Blot. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) de pelo menos 3 ensaios independentes. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo (MEM + T) (de acordo com ANOVA e pós-teste de Bonferroni). A ausência de marcação e ns indicam diferença não-significativa. G: Genisteína; Exe: Exemestano; T: Testosterona; CDX: Casodex..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de risco para o câncer de mama.....	13
Tabela 2. Taxa de mortalidade bruta feminina por câncer de mama no Brasil de acordo com a característica étnico-racial autodeclarante.	13
Tabela 3. Características dos diferentes subtipos de câncer de mama e suas respectivas linhagens celulares para estudos <i>in vitro</i>	17
Tabela 4. Relação entre IC e efeito farmacológico.	40
Tabela 5. IC ₅₀ da Genisteína nas diferentes linhagens celulares após tratamentos por 24h.....	46
Tabela 6. IC ₅₀ dos metabólitos do Tamoxifeno em MCF7 após tratamentos por 24h.	46
Tabela 7. Índice de Combinação (CI) dos tratamentos com a Genisteína combinada com os metabólitos do Tamoxifeno e respectiva caracterização da associação farmacológica.	50
Tabela 8. Potencialização dos efeitos do Exemestano na diminuição da viabilidade celular de MCF7aro frente à combinação com a Genisteína a 1µM.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E2	17 β -estradiol
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor para o fator de crescimento epidermal
ERE	Elemento de resposta ao estrogênio
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IAs	Inibidores da aromatase
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MAPK	Quinase proteica ativada por mitógenos
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina
PI3K	Fosfatidil-3-quinase
RA	Receptor de Androgênio
RE	Receptor de Estrogênio
RE α	Receptor de Estrogênio alfa
RE β	Receptor de Estrogênio beta
RP	Receptor de Progesterona
RP-A	Receptor de Progesterona A
RP-B	Receptor de Progesterona B
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SERD	<i>Selective estrogen receptor down-regulator</i>
TEM	Transição epitélio-mesenquimal

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
Revisão de literatura	10
1.1 Câncer de mama – Estatísticas e Fatores de Risco.....	11
1.2 Perspectiva histórica.....	14
1.3 Subtipos de Câncer de Mama.....	15
1.4 Carcinogênese mamária.....	17
1.4.1 Importância do estrogênio.....	17
1.4.2 Importância da progesterona.....	18
1.4.3 Importância do HER-2.....	19
1.4.4 Importância do Ki-67.....	20
1.5 Tratamentos convencionais.....	20
1.5.1 Endocrinoterapia.....	21
1.5.1.1 Tamoxifeno.....	21
1.5.1.2 Inibidores da aromatase.....	22
1.5.1.3 Fulvestranto.....	23
1.5.2 Imunoterapia.....	24
1.5.3 Terapia citotóxica.....	24
1.5.4 Obstáculos e dificuldades.....	25
1.6 Busca por novas terapias.....	27
1.6.1 Alternativas terapêuticas – Fitoestrógenos.....	28
1.6.2 Genisteína.....	29
Justificativa	31
Objetivos	33
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
Materiais e Métodos	36
4.1 Cultura de células.....	37
4.2 Genisteína e Antitumorais.....	37
4.3 Ensaio de viabilidade celular- Incorporação de vermelho neutro.....	38
4.4 Ensaio de viabilidade celular- MTT.....	39
4.5 Avaliação da associação farmacológica.....	39
4.6 Avaliação da progressão do ciclo celular.....	40
4.7 Análise do perfil de morte celular por marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo.....	40
4.8 Avaliação da morte celular por necrose.....	41

4.9 Avaliação da expressão de proteínas por <i>Western Blot</i>	41
4.10 Quantificação das células-tronco tumorais por citometria de fluxo.....	42
4.11 Análise Estatística	42
Resultados e Discussão	44
PARTE I – GENISTEÍNA E OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO	45
5.1 Ensaios preliminares: Determinação das doses de trabalho e regime de tratamento	45
5.2 Análise da combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína na viabilidade celular das linhagens tumorais e caracterização farmacológica.....	46
5.3 Avaliação da combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína no Ciclo Celular	51
5.4 Caracterização da morte celular causada pela combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína	53
5.5 Avaliação dos efeitos da combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína nas células-tronco tumorais	60
PARTE II – GENISTEÍNA E OS INIBIDORES DA AROMATASE	61
5.6 Ensaios preliminares: Determinação das doses de trabalho.....	61
5.7 Análise da combinação dos inibidores da aromatase com a Genisteína na viabilidade celular da linhagem MCF7aro e caracterização farmacológica.....	62
5.8 Avaliação da combinação do Exemestano com a Genisteína no Ciclo Celular da linhagem MCF7aro.....	64
5.9 Caracterização da morte celular causada pela combinação do Exemestano com a Genisteína na linhagem MCF7aro.....	66
5.10 Análise dos possíveis mecanismos de ação da Genisteína isolada e da sua combinação com o Exemestano na linhagem MCF7aro.....	69
Conclusões	75
Referências Bibliográficas	77

Revisão de literatura

1.1 Câncer de mama – Estatísticas e Fatores de Risco

Em 2018, a Organização Mundial da Saúde, através da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) publicou um estudo sobre as neoplasias em escala global chamado GLOBOCAN 2018 (1), onde era previsto, para aquele ano, a ocorrência de mais de 18 milhões de novos casos de câncer no mundo. Ainda, esta iniciativa previu um aumento gradativo e constante nos casos de neoplasias para os próximos anos, totalizando mais de 29,5 milhões de novos casos de câncer em 2040, isto é, um acréscimo de 63,4% nos números atuais (Figura 1).

FIGURA 1. INCIDÊNCIA ESTIMADA PARA NOVOS CASOS DE CÂNCER EM 2018 E 2040 PARA TODAS AS NEOPLASIAS, AMBOS OS SEXOS E TODAS AS IDADES. ADAPTADO DE GLOBOCAN (2018) (1).

Dos casos previstos para 2018, a pesquisa GLOBOCAN previu que 11,6% (2,088 milhões) seriam de câncer de mama, sendo o tipo de neoplasia mais incidente na população, juntamente com o câncer de pulmão (Figura 2). Além disso, o câncer de mama foi previsto como a neoplasia mais fatal a mulheres, sendo responsável por mais de 600 mil óbitos no ano de 2018 (1).

FIGURA 2. ESTIMATIVA GLOBAL DA INCIDÊNCIA DOS DIFERENTES TIPOS DE CÂNCER PARA O ANO DE 2018. ADAPTADO DE GLOBOCAN (2018) (1).

No Brasil, para o triênio 2020-2022, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), previu a incidência de 66.280 casos/ano de carcinoma mamário, correspondendo a 29,7% das neoplasias em mulheres (2). Logo, observa-se que o país segue a tendência global de o câncer de mama ser o mais incidente na população feminina e o tipo de neoplasia que mais causa óbitos em mulheres (1). Além disso, o relatório do INCA aponta que o câncer de mama é a neoplasia mais frequente na população feminina em todas as regiões do Brasil, mas tem riscos estimados diferentes, assumindo, por exemplo, 81,06 casos a cada 100 mil mulheres na Região Sudeste, mas 21,34 casos a cada 100 mil mulheres na Região Norte (Figura 3) (2).

FIGURA 3. ESTIMATIVA DA INCIDÊNCIA DE CâNCER DE MAMA POR 100 MIL MULHERES PARA 2020 NO BRASIL.

Muitos fatores estão relacionados ao risco de se desenvolver tumores mamários. Esses fatores de risco podem ser divididos em três categorias: fatores ambientais e comportamentais; fatores da história reprodutiva e hormonal; e fatores genéticos e hereditários (3), como observado na Tabela 1. Além destes, é importante ressaltar que um dos principais fatores de risco para o câncer de mama é a idade, sendo que cerca de 80% dos casos são diagnosticados em mulheres na faixa etária acima dos 50 anos (3).

No Brasil, apesar de haver tratamento disponível na rede pública de saúde, a taxa de mortalidade do câncer de mama ainda é elevada devido ao diagnóstico tardio (3), totalizando no ano de 2017, 16.724 óbitos, o equivalente a um risco de 16,16 por 100 mil mulheres (2). Ainda, foi mostrado que a mortalidade por câncer de mama está relacionada também à etnicidade autodeclarante das pacientes brasileiras, onde a etnia Branca associada à faixa etária acima de 50 anos apresenta maior mortalidade, seguida pela etnia Preta associada novamente à faixa etária acima de 50 anos (Tabela 2). Esses dados ganham importância ao se evidenciar que a população feminina brasileira é majoritariamente constituída pelas etnias Branca e Preta (cerca de 55%) (4).

TABELA 1. FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA.

Fatores ambientais e comportamentais	Fatores da história reprodutiva e hormonal	Fatores genéticos e hereditários
	Primeira menstruação (menarca) antes de 12 anos	
	Não ter tido filhos	
Obesidade e sobrepeso após a menopausa	Primeira gravidez após os 30 anos	Histórico familiar de câncer de ovário
Sedentarismo	Não ter amamentado	Vários casos de câncer de mama na família, principalmente antes dos 50 anos
Consumo de bebida alcoólica	Menopausa após os 55 anos	
Exposição frequente a radiações ionizantes (Raios-X)	Uso de contraceptivos hormonais (estrogênio-progesterona)	Histórico familiar de câncer de mama em homens
	Ter feito reposição hormonal pós-menopausa, principalmente por mais de cinco anos	Alteração genética, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2

FONTE: (3).

TABELA 2. TAXA DE MORTALIDADE BRUTA FEMININA POR CÂNCER DE MAMA NO BRASIL DE ACORDO COM A CARACTERÍSTICA ÉTNICO-RACIAL AUTODECLARANTE.

Característica étnico-racial/ idade	Taxa bruta de mortalidade (por 100.000 mulheres)
Branca / <50 anos	7,7
Branca / >50 anos	53,2
Preta / <50 anos	7,1
Preta / >50 anos	40,4
Amarela / <50 anos	1,9
Amarela / >50 anos	21,5
Parda / <50 anos	5,1
Parda / >50 anos	28,5
Indígena / <50 anos	1,3
Indígena / >50 anos	4,6

FONTE: (4).

1.2 Perspectiva histórica

O câncer de mama não é uma enfermidade recente na História da humanidade. Devido aos sintomas evidentes em casos avançados, como retração da pele, proeminências e ulcerações, esta neoplasia já era relatada em papiros de tempos remotos no Antigo Egito, Grécia e China entre os anos de 3500 a.C. e 400 d. C (5). Em tais documentos, não era somente descrito individualmente o caso dos pacientes, como também a abordagem clínica, que, na época, se tratava da cauterização do tumor com tochas (6).

Com o passar do tempo, algumas teorias da origem dos tumores foram elaboradas, como a “Teoria Humoral da Medicina”, proposta por Hipócrates (460-370 d. C.), onde ele teoriza que o corpo seria formado por quatro humores: sangue, fleuma, bile amarela e bile negra (7), sendo que o excesso de bile negra seria o responsável pelo desenvolvimento dos tumores de mama (6). Apesar da teoria de Hipócrates não ser a atual, este estudioso foi o primeiro a se utilizar do termo *karkinoma* (ou carcinoma) para definir esta patologia, visto que a aparência dos tumores, devido ao inchaço local e às reentrâncias cutâneas, assemelhava-se, por vezes, à de um caranguejo (*karkinos*, em Grego). Além disso, Hipócrates não aconselhava o tratamento cauterizante utilizado na época, visto que as pacientes viviam mais e melhor quando não tratadas (6).

Pouco foi desenvolvido em termos de teorias e tratamentos para o câncer de mama do tempo de Hipócrates até a Idade Moderna. No entanto, um marco importante para se entender esta patologia começou a ser revelado em 1713, por Bernardino Ramazzini, o qual observou várias profissões femininas e suas relações com diversas doenças. Assim, o médico italiano notou uma maior incidência de câncer de mama em freiras (8) e insinuou a importância do fator endócrino e da nuliparidade como fatores de risco para esta neoplasia. Tal relação se fortaleceu quando, em 1895, George Thomas Beatson realizou uma ooforectomia bilateral em uma paciente que apresentava lesões neoplásicas extensivas de mama e observou a redução do carcinoma tal como aumento da expectativa de vida da paciente. Ainda, em 1896, foi observado que uma paciente com câncer de mama metastático apresentou diminuição da massa tumoral quando entrou na menopausa. Finalmente, em 1897, Stanly Boyd, um cirurgião inglês, relatou que em um terço de suas pacientes com câncer de mama, a ooforectomia bilateral havia surtido efeitos benéficos e pela primeira vez criou a hipótese de que, em alguns casos, a secreção interna dos ovários poderia estimular o crescimento dos tumores de mama (9). A retirada dos ovários passou então a ser o padrão de tratamento para o câncer de mama pelos 60 anos a seguir, visto que mimetizava um estado pós-menopausa (5).

Considerando a taxa de mortalidade elevada e os efeitos colaterais drásticos associados à ooforectomia, em 1960 foram lançados os primeiros fármacos que teriam como seu alvo o estrogênio. Os primeiros inibidores da aromatase, Testolactona e

Aminoglutetimida, eram alvo inespecíficos, mas foram utilizados clinicamente até 1980 (5). No entanto, a segunda e terceira gerações dos inibidores da aromatase, desenvolvidas em 1980 (como o Fadrozol e Formestano) e 1990 (como o Anastrozol, Letrozol e Exemestano), respectivamente, procuraram melhor direcionar o alvo desses fármacos (10). Além disso, paralelamente ao desenvolvimento da primeira geração dos inibidores da aromatase, em 1970 foi desenvolvido o Tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio (*selective estrogen receptor modulator* – SERM), o qual, pela sua eficácia, se tornou a primeira linha de tratamento para o câncer de mama hormônio-dependente pelos anos a seguir (5). Atualmente, além dos inibidores da aromatase e aos SERMs, também foram desenvolvidos os SERDs (*selective estrogen receptor down-regulator*), como o Fulvestranto, também usado como endocrinoterapia (6).

Nos anos 2000, com o advento da genômica, foi possível identificar molecularmente diferentes subtipos de câncer de mama, explicando o porquê de alguns tumores responderem à endocrinoterapia e outros não. Além disso, foi possível rastrear mutações que promovem o aparecimento e desenvolvimento de tumores, como mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. Ademais, a classe dos fármacos inibidores do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (*human epidermal growth factor receptor 2* – HER-2), como o Lapitinib e o Trastuzumabe (também conhecido como Herceptina), foi desenvolvida e mais um passo foi dado para a melhoria na abordagem terapêutica dos carcinomas de mama (6). Logo, os tratamentos atuais bem como as suas complicações e a classificação dos tumores mamários serão esclarecidos a seguir neste trabalho.

1.3 Subtipos de Câncer de Mama

A classificação dos carcinomas mamários pode ser feita a partir de dois campos de referência: a histologia e a biologia molecular. Ambas as classificações são importantes para a clínica, visto que fornecem informações para se delinear o prognóstico do paciente e a melhor abordagem terapêutica (11).

Em relação à classificação histológica, 95% dos tumores mamários são adenocarcinomas, os quais podem se originar tanto no tecido mamário lobular quanto no ductal, sendo nomeados Carcinoma Lobular e Carcinoma Ductal, respectivamente. Além disso, tais carcinomas são ainda classificados nas formas *in situ* ou invasiva. A forma *in situ* apresenta massa tumoral bem delimitada e não extravasa a membrana basal (12). A forma invasiva, por sua vez, apresenta grande capacidade de transição epitélio-mesenquimal (TEM), onde há extravasamento da membrana basal e comprometimento, primeiramente, dos linfonodos periféricos da mama e, em seguida, da corrente sanguínea, onde as células tumorais podem gerar lesões neoplásicas em sítios secundários (13), como demonstrado na

Figura 4. A capacidade de invasão dos tumores será discutida mais detalhadamente a frente neste trabalho.

FIGURA 4. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E METÁSTASE DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS.

Em relação à classificação dos tumores de mama de acordo com as características moleculares, alguns marcadores tumorais se destacam: os receptores hormonais para estrogênio (RE) e progesterona (RP), o receptor para o fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER-2) e o fator de proliferação Ki-67. Logo, os carcinomas de mama são classificados nos subtipos Luminal (A e B), que superexpressa HER-2 e Triplo Negativo (11, 12, 15). Os tumores do tipo Luminal apresentam uma menor agressividade e um bom prognóstico, mas correspondem juntos a 70% dos tumores invasivos de mama (50% do Luminal A e 20% do Luminal B). Por sua vez, os tumores dos subtipos que superexpressa HER-2 e Triplo Negativo possuem uma maior agressividade e pior prognóstico, correspondendo a 15% cada um dos carcinomas invasivos (12). Assim, as características moleculares e histológicas, bem como as linhagens celulares mais utilizadas para o estudo *in vitro* de cada subtipo de carcinoma mamário encontram-se na Tabela 3. Além disso, cada um dos marcadores moleculares é melhor explorado na seção a seguir.

TABELA 3. CARACTERÍSTICAS DOS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA E SUAS RESPECTIVAS LINHAGENS CELULARES PARA ESTUDOS *IN VITRO*.

Linhagem Celular	Classificação Histológica	Classificação Molecular	Biomarcadores
HCC1428, ZR751, T47D, MCF7	AC, CDI, CDI, CDI	Luminal A	RE ⁺ /RP ⁺ /HER-2 ⁻ ou HER-2 ⁺ , Ki-67<14%
BT474, MDAMB361, UACC812	CDI, AC, CDI	Luminal B	RE ⁺ /RP ⁺ /HER-2 ⁻ ou HER-2 ⁺ , Ki-67>14%
AU565, MDAMB453, SKBR3	CDI, AC, CDI	Superexpressa HER-2	RE ⁻ / RE ⁻ /HER-2 ⁺⁺⁺
BT20, MDAMB436, BT549, MDAMB231	CDI, AC, CDI, CDI	Tripla Negativo	RE ⁻ / RP ⁻ /HER-2 ⁻

AC: ADENOCARCINOMA; CDI: CARCINOMA DUCTAL INVASIVO.

FONTE: (15, 16).

1.4 Carcinogênese mamária

1.4.1 Importância do estrogênio

Os hormônios esteroides são derivados do colesterol e incluem o cortisol, os hormônios sexuais e a vitamina D. Assim, os hormônios sexuais são produzidos nos testículos, ovários e córtex da adrenal, sendo responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias, pela diferenciação sexual e pela expressão de padrões de comportamento sexual para machos e fêmeas (17). Estudos mostram que os androgênios (ligados a características masculinas) e estrogênios (ligados a características femininas) podem regular o crescimento e progressão de tumores, principalmente dos ligados aos órgãos reprodutivos, isto é, mama, próstata, endométrio e ovário (18).

Os estrogênios são importantes no desenvolvimento e manutenção dos tecidos reprodutivos, bem como na fisiologia cardiovascular e óssea (19). O estrogênio mais prevalente em mulheres na pré-menopausa é o 17 β -estradiol (E2), produzido pelos ovários, sendo o hormônio sexual feminino com maior afinidade pelos respectivos receptores (20). Após a menopausa, os níveis de 17 β -estradiol caem abruptamente e a principal fonte de estrogênio passa a ser o tecido adiposo periférico, através da produção de androstenediona, a qual é transformada em estrona pela enzima aromatase (20).

Os efeitos fisiológicos destes hormônios são resultantes da sua interação com os receptores intracelulares de estrogênio α (RE α) e β (RE β) (21), pertencentes à superfamília de receptores nucleares (20), os quais podem facilmente modificar a expressão genética da célula (22). O RE α está presente na glândula mamária, útero, ovário, no trato reprodutor masculino e no fígado (23), sendo responsável por ativar vias de proliferação (20), enquanto que o RE β está presente na próstata, no ovário, no cólon, no tecido adiposo e no sistema imune (23) e está relacionado ao contrabalanço dos efeitos do RE α , tendo efeitos antiproliferativos, anti-invasivos e pró-apoptóticos (20, 21).

Em relação ao câncer de mama, níveis anormalmente altos de estrogênio já foram relacionados ao aumento da incidência desta neoplasia (24), havendo dois mecanismos complementares que podem resultar no surgimento, promoção e progressão deste tipo de tumor (25). No primeiro, chamado de genômico, há ligação do estrogênio aos seus receptores, dimerização desses receptores e sua translocação ao núcleo da célula mamária. Assim, há ativação de fatores de transcrição, através da ligação do complexo RE-estrogênio ao elemento de resposta ao estrogênio (ERE), localizado no sítio promotor de genes específicos, o qual atua no aumento de mRNA com ação proliferativa e diminuição de mRNA com ação antiproliferativa (20). Além disso, estudos recentes mostram que a via genômica pode ser ativada em sítios de ligação independentes de ERE (21). Já no segundo mecanismo, chamado não-genômico, o hormônio age em receptores alocados na membrana plasmática ou adjacentes a ela, levando a respostas celulares, como aumento de cálcio e óxido nítrico, e ativação massiva de quinases envolvidas em vias de proliferação, sobrevivência, diferenciação e motilidade celular, como a quinase proteica ativada por mitógenos (MAPK), fosfatidil-3-quinase (PI3K), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (20). Ademais, o estrogênio é capaz de promover a oxidação de catecóis, que, através de espécies reativas de quinonas, podem contribuir para o dano oxidativo ao material genético, gerando formas mutagênicas do DNA (25), principalmente em genes supressores de tumores como p53, BRCA-1 e BRCA-2, também chamados de proto-oncogenes (20). Desse modo, as mutações nos proto-oncogenes podem levar à proliferação celular descontrolada e consequente início da neoplasia (20), sendo que estudos mostraram que grande parte das mulheres com câncer de mama apresenta mutações em genes que codificam BRCA-1, BRCA-2 e p53, além de Chek2, LKB1, PTEN e outras mutações desconhecidas (26).

Cerca de 70% dos tumores de mama possuem altos níveis de RE α (21), sendo a sua proliferação classificada como hormônio-dependente. Concomitantemente, os tumores apresentam uma baixa expressão de RE β , a qual é relacionada não só à incapacidade antiproliferativa, mas também à maior habilidade de migração e invasão, através da indução da Transição Epitélio-Mesenquimal (22). Logo, o equilíbrio entre os REs α e β e suas funções parece ser importante para o processo de carcinogênese mamária. Assim, estudos mostram que pacientes que possuem tumor mamário RE- α positivos tem maiores chances de responder bem ao tratamento endócrino de privação hormonal do que pacientes que possuam carcinoma RE- α negativo (27). Ainda que a ocorrência de REs nos carcinomas mamários seja alta, o tratamento endócrino tem suas limitações, podendo deixar de ser efetivo quando as células tumorais desenvolvem resistência ao método (28).

1.4.2 Importância da progesterona

A progesterona é um outro tipo de hormônio esteroide sexual, cujas funções fisiológicas se dão através da ligação desta aos receptores de progesterona A (RP-A) e B (RP-B) (29), ambos derivados de um mesmo gene através de promotores diferentes (30). Este hormônio desempenha um papel fundamental no ciclo menstrual, principalmente nos períodos peri e pós-ovulatórios, e também durante a gravidez. Após a menopausa, os níveis de progesterona decaem quase que completamente, normalmente são menores que 0,2 ng/mL de soro, sendo que a maior fonte de produção deste hormônio passa a ser as adrenais (31).

Pouco se sabe sobre a relação entre a progesterona e o câncer de mama, visto que os estudos são ambíguos, mostrando que este hormônio pode apresentar tanto características proliferativas, quanto antiproliferativas (32). A progesterona, na ausência de estrogênio, é incapaz de estimular o crescimento celular, enquanto o mesmo acontece com o estradiol na ausência de progesterona. Logo, já foi mostrado que a expressão dos RPs é dependente da interação entre o estrogênio e o RE α , a qual induz a transcrição de RPs (31). De fato, a duplicidade da presença de receptores de estrogênio e progesterona (ER⁺/PR⁺) constitui 55% a 65% dos tumores de mama (11).

Além da presença de RPs, a relação entre RP-A e RP-B parece ser determinante para a tumorigênese mamária, onde 60% dos carcinomas mamários invasivos expressam maiores níveis de RP-A do que RP-B (33). Logo, já foi mostrado que, quando ligada ao seu receptor, a progesterona pode controlar genes de transcrição, tais como genes para RE, receptores de insulina, fator de crescimento epidermal (EGF) e seus receptores, e o fator de crescimento transformador alfa (TGF α) (31), além de ser capaz de ativar as vias de sinalização da MAPK, PI3K/ Akt e JAK2/Stat3 (30). Assim, este hormônio ganha a capacidade de controlar fatores proliferativos e regular aspectos do ciclo celular, sendo primariamente responsável por sensibilizar as células tumorais da mama a fatores de crescimento e citocinas (32). Ainda, a expressão de RPs não é só relacionada à tumorigênese mamária, mas também à resistência *de novo* (também chamada intrínseca) à hormônios esteroides, e conseqüentemente, à endocrinoterapia (29).

1.4.3 Importância do HER-2

Ainda, um receptor não-hormonal importante no câncer de mama é o receptor para o fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2), também chamado de c-erbB-2, cerbB-2, C-erbB-2, HER-2/neu, ERBB2, erbB2, erbB-2, neu/ c-erbB-2, oncogene neu, proteína neu ou neu (18). Tal receptor pertence à família dos receptores para fator de crescimento epidermal (EGFR) cuja sinalização induz vias de proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular ao estimular PI3K, complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTORC1) e MAPK (34). Ainda que os ligantes de HER-2 não

estejam identificados, acredita-se que o mecanismo principal de ativação destes receptores seja através da sua dimerização com eles mesmos ou com outros membros da família EGFR, como o HER-3 (35).

Assim, a superexpressão do HER-2, tipicamente resultante da expressão de 6 vezes ou mais do seu respectivo gene ERBB2 (34, 36), ocorre em até 20% dos casos de câncer de mama ductal invasivo e 30% dos casos que evoluem para metástase (37). Essa característica corresponde a um pior prognóstico da doença (11), visto que é relacionada a uma maior agressividade do tumor, com grandes chances de envolvimento dos linfonodos periféricos (38), havendo menor taxa de sobrevivência e menor tempo até a recidiva da doença (39). Além disso, estudos mostraram que a superexpressão desse receptor está relacionada à resistência *de novo* dos tumores de mama à endocrinoterapia (12) e à terapia citotóxica com Doxorubicina (40), logo, neste caso outra abordagem terapêutica é adotada.

1.4.4 Importância do Ki-67

O fator de proliferação Ki-67 foi primeiramente descrito por Gerdes e colaboradores, em 1983, ao estudarem anticorpos monoclonais na Universidade de Kiel, onde esta proteína foi detectada na marcação de 67 de uma placa de 96 poços, explicando seu nome (41). Logo, tal proteína foi logo relacionada à proliferação celular, pois a sua expressão nuclear, apesar de indetectável na fase celular G0, aumentava progressivamente nas fases S e G2, atingindo os maiores níveis, tanto em tecidos benignos quanto malignos, quando as células entravam em mitose (42). Embora a função do Ki-67 não tenha sido completamente elucidada, acredita-se que este fator atue na divisão celular e na síntese de RNA ribossomal (41).

Em tumores de mama, a expressão de Ki-67 se tornou importante para o prognóstico dos pacientes, visto que, anteriormente, estudos mostraram que a maior presença deste fator (>25%) era relacionada a uma menor taxa de sobrevivência e menor período até a recidiva da doença (42). Assim, na clínica, este fator é detectado por imuno-histoquímica e reportado como um índice, o qual é contabilizado por quantas células malignas expressam esse fator em relação ao total de células malignas. Desse modo, é possível diferenciar dois subtipos de tumores de mama Luminal (A e B), onde o tipo B expressa maiores níveis de Ki-67 e está mais propício a desenvolver resistência à quimioterapia ou à endocrinoterapia (43), sendo nomeadamente necessário à manutenção de células-tronco tumorais (44).

1.5 Tratamentos convencionais

O tratamento do câncer de mama varia conforme o estadiamento da doença (estádios de I a IV, sendo o IV com pior prognóstico), as suas características biológicas e as condições da paciente, tais como idade, status da menopausa, coexistência de doenças e

preferências pessoais. Assim, os tratamentos podem ser aplicados da seguinte forma (separadamente ou em conjunto): a) local, em que se pode fazer uma intervenção cirúrgica e/ou radioterapia; b) sistêmico, com aplicação de quimioterápicos: endocrinoterapia, imunoterapia e terapia citotóxica. Logo, neste trabalho, serão evidenciados apenas os tratamentos sistêmicos, os quais podem ser realizados previamente ao tratamento local, também chamados de tratamentos neoadjuvantes, ou posteriormente ao tratamento local, chamados de tratamentos adjuvantes (45).

1.5.1 Endocrinoterapia

Também chamada de hormonioterapia ou terapia endócrina, esta terapia sistêmica é indicada para tumores RE e RP-positivos, visto que tem como alvo a proliferação estrogênio-dependente que ocorre nesses tipos de tumores. Assim, esta abordagem terapêutica age, em geral, bloqueando a ligação do estrogênio ao seu receptor através da ablação do hormônio, da implementação de antagonistas do receptor de estrogênio α ou ainda da diminuição da expressão desse mesmo receptor (46).

1.5.1.1 Tamoxifeno

No Brasil, a primeira linha de tratamento para carcinomas mamários que expressam receptores de estrogênio é o Tamoxifeno, independentemente do estadiamento da doença (47). O Tamoxifeno é um modulador não-esteroidal seletivo de receptores de estrógeno (SERM), o qual antagoniza os REs, ligando-se ao receptor ao invés do estrogênio endógeno, o que resulta na inibição do crescimento (efeito citostáticos) e/ou na regressão (efeito citotóxico) dos tumores mamários cuja proliferação é hormônio-dependente (48). Ademais, estudos sugerem que o Tamoxifeno também é capaz de estimular a síntese de TGF- β , responsável por modular negativamente a secreção autócrina e parácrina de hormônios (49). Ainda, já foi descrito que em tumores de mama RE-negativos, o Tamoxifeno e seus metabólitos podem atuar em receptores relacionados ao estrogênio (RRE), os quais, apesar de não terem a sua via de sinalização completamente elucidada, compartilham grande identidade com os REs (50). Para tal ação antitumoral, este pró-fármaco é metabolizado em 4-hidroxitamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno, os quais se interconvertem em Endoxifeno através de enzimas do citocromo P450 (51), conforme mostra a Figura 5.

ADAPTADO DE (52).

FIGURA 5. METABOLISMO DO TAMOXIFENO PELAS ENZIMAS DO CITOCROMO P450.

Apesar de cada metabólito apresentar uma capacidade de ligação ao RE diferente, sendo que o potencial antiestrogênico do Tamoxifeno segue a ordem (do maior potencial para o menor) Endoxifeno > Tamoxifeno > N-desmetiltamoxifeno > 4-hidroxitamoxifeno (53), é importante lembrar que por depender de metabolização, a biodisponibilidade do fármaco também é um fator crucial para a sua ação. Assim, a biodisponibilidade do Tamoxifeno e seus metabólitos segue a ordem (da maior biodisponibilidade para a menor) N-desmetiltamoxifeno > Tamoxifeno > Endoxifeno > 4-hidroxitamoxifeno (54), sendo que após a metabolização, as concentrações de N-desmetiltamoxifeno, Endoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno no plasma são de 170, 10 e 2% em relação ao Tamoxifeno (55). Finalmente, a dose diária recomendada de Tamoxifeno é de 20mg, aplicada via oral e o tratamento pode ser continuado por 5-10 anos (45, 47).

1.5.1.2 Inibidores da aromatase

A aromatase, também chamada CYP19A, é uma enzima chave na conversão de androgênios adrenais, como testosterona e androstenediona, em estrogênios aromáticos, como o estradiol e a estrona. A expressão dessa enzima é finamente controlada, estando presente principalmente nos ovários na pré-menopausa, na placenta durante a gravidez e em fibroblastos do tecido adiposo na pós-menopausa (56). Assim, tecidos tumorais de mama expressam maiores níveis de aromatase que tecidos não tumorais (57), mostrando a importância desta enzima para a biodisponibilidade de estrogênio no microambiente tumoral. Ainda, estudos mostraram que a ablação de estrogênio pela ação do Tamoxifeno pode resultar em uma expressão ainda maior de aromatase em tumores de mama e subsequente hipersensibilização do carcinoma ao estrogênio, onde a proliferação passa a requerer concentrações deste hormônio até 4 graus de magnitude menores do que normalmente (58). Logo, para tumores que expressam a aromatase, outra abordagem terapêutica é indicada: os inibidores da aromatase (IAs).

Os IAs atuam na enzima de forma com que a produção de estrogênio endógeno seja menor (59). Os inibidores utilizados atualmente na clínica são os de terceira geração e são classificados como esteroides e não-esteroides, sendo que os primeiros, representados principalmente pelo Exemestano, ligam-se à aromatase irreversivelmente, enquanto que os não-esteroides, representados pelo Anastrozol e Letrozol, ligam-se à aromatase temporariamente (10). Mais especificamente, estudos mostram que o Exemestano liga-se covalentemente à aromatase (60), sendo capaz de degradá-la através do proteassoma, além de reter o ciclo celular e induzir apoptose e autofagia (61). O Anastrozol é um inibidor seletivo da aromatase, ligando-se competitivamente ao grupo heme da enzima CYP e reduzindo a biossíntese de estrogênio no tecido periférico e no tecido mamário (60). O Letrozol, por sua vez, além de inibir a biossíntese de estrogênio, também permite que o androgênio endógeno exerça funções antiproliferativas na mama através da sua ligação ao receptor de androgênio (RA) (62), sendo que o aumento na expressão do RA foi recentemente demonstrado também para o Exemestano (63).

No Brasil, dependendo da característica da paciente (pré-menopausa ou pós-menopausa) e do tipo de tumor mamário (metastático ou não), os inibidores da aromatase podem ser utilizados como primeira ou segunda linha de tratamento. Assim, pode-se utilizar essa classe de antitumorais juntamente com o Tamoxifeno e, ainda, trocar-se um inibidor esteroidal por um não-esteroidal, de acordo com a progressão de cada caso clínico. Logo, a administração dos IAs é feita oralmente nas doses diárias recomendadas de 1mg, 2,5mg e 25mg para Anastrozol, Letrozol e Exemestano, respectivamente. Ainda, o período médio de tratamento com os IAs é de 5 anos (45).

1.5.1.3 Fulvestranto

O Fulvestranto ou ICI182,780 atua tanto como antagonista como infrarregulador do receptor de estrogênio (SERD), ligando-se ao $RE\alpha$ com 100 vezes mais afinidade que o Tamoxifeno (59) e causando a sua degradação (64). Em relação ao $RE\beta$, este fármaco estabiliza tal receptor de forma a contribuir para seus efeitos antiproliferativos (65). Ainda, estudos mostram que o Fulvestranto também é capaz de infrarregular tanto os RPs quanto o fator de proliferação Ki-67 em tumores de mama (65, 66), além de também inibir a aromatase (67). Devido a tais propriedades, tumores resistentes ao Tamoxifeno e aos inibidores da aromatase, em geral, continuam sensíveis ao Fulvestranto (59, 64), sendo este fármaco utilizado como segunda ou terceira linha de tratamento para carcinoma de mama no Brasil (45) e cuja eficácia é notável em tumores metastáticos (66). Logo, este SERD é aplicado na dose mensal de 250-500mg via intramuscular (45) e o tempo de tratamento médio para a transição deste fármaco para o próximo (SERM ou inibidor da aromatase) é de 6 meses (64).

1.5.2 Imunoterapia

Esta terapia é indicada para tumores de mama que apresentam superexpressão de HER-2, uma proteína da família das tirosina quinases, apresentando ou não receptores hormonais. No sistema público de saúde do Brasil, a única linha de tratamento disponível nesta categoria é o Trastuzumabe, mas, mediante análise da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias em Saúde (CONITEC), o uso dos medicamentos Lapatinibe, Bevacizumabe e Trastuzumabe-entansina pode ser autorizado para os avançados (metastático ou recidivado) em que há progressão tumoral mesmo após o uso de Trastuzumabe (45).

O Trastuzumabe, também conhecido como Herceptina, é um anticorpo monoclonal IgG humanizado que tem como alvo o domínio extracelular do HER-2. Apesar do mecanismo de ação não ter sido perfeitamente elucidado, acredita-se que a Herceptina diminua a expressão de HER-2 na superfície celular, impedindo sua dimerização, além de causar a retenção do ciclo celular pela inibição da via de PI3K/MAPK e sensibilizar as células à terapia citotóxica ao diminuir a expressão de Mcl-1, uma proteína antiapoptótica. Além disso, este fármaco é capaz de inibir a angiogênese e mediar a resposta imune de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) contra o tumor, permitindo seu reconhecimento pelas células NK ou macrófagos (34, 38). Logo, a administração do Trastuzumabe é feita por via intravenosa com dose inicial de 4-8mg/Kg e doses subsequentes de 2-6mg/Kg por um período de 2-12 meses (45).

1.5.3 Terapia citotóxica

A terapia citotóxica é o tratamento utilizado para casos avançados, agressivos, metastáticos e/ou recidivados, principalmente em tumores de mama refratários à endocrinoterapia. Assim, os fármacos mais adotados nesta categoria no Brasil são os antracíclicos (Doxorrubicina e Epirrubicina) e taxanos (Paclitaxel e Docetaxel), além de outros agentes com atividade antitumoral, tais como 5-Fluorouracila, Ciclofosfamida e Cisplatina (45). Desse modo, em geral, a terapia citotóxica tem como alvo células com alta taxa proliferativa (68) e, visto que não tem um alvo específico para câncer de mama, pode ser utilizada para diversos carcinomas, como pulmão, estômago, próstata, cólon, rins, ovários, pele, entre outros (69-71). Logo, essa classe de fármacos apresenta diversos mecanismos de ação.

Acredita-se que a Doxorrubicina, embora não tenha o seu mecanismo de ação completamente elucidado, atue em duas funções principais, sendo a primeira a intercalação ao DNA e interrupção do mecanismo de reparo ao DNA pela topoisomerase II; e a segunda, a geração de radicais livres que causam danos à membrana das células, ao material genético e a proteínas (40). O taxano Docetaxel, por sua vez, atua na estabilização e

promoção da montagem de microtúbulos, ao mesmo tempo que impede a sua despolimerização, resultando, então, na inibição da divisão celular (69). A 5-Fluorouracila é um análogo das pirimidinas, cujos metabólitos citotóxicos são incorporados no material genético de forma a inibir a enzima timidilato sintase, reter o ciclo celular e induzir a apoptose (72). A Ciclofosfamida, utilizada há mais de 50 anos como agente antitumoral, após ativação enzimática e química, liga-se ao DNA, intra-fitas e interfitas, de forma a enrijecer a sua estrutura molecular e impedir a replicação (73). Finalmente, a Cisplatina age de forma similar à Ciclofosfamida, criando formas truncadas de DNA que resultam na retenção do ciclo celular e indução da apoptose (71).

Logo, a administração da terapia citotóxica é feita por via intravenosa, a 50-60mg/m² para Doxorrubicina, 75mg/m² para Docetaxel, 500mg/m² para 5-Fluororacila, 500-600mg/m² para Ciclofosfamida (45) e 120-300mg/m² para Cisplatina (71), sendo que o tempo de avaliação do tratamento (continuação ou transição) é de 6-12 semanas (45).

1.5.4 Obstáculos e dificuldades

Apesar de o Tamoxifeno ser utilizado como primeira linha de tratamento para o câncer de mama desde 1973 (74), alguns dados começaram a chamar a atenção quanto à sua eficácia. Estudos mostraram que cerca de 30% dos tumores de mama apresentam resistência *de novo* ao tratamento com Tamoxifeno, sendo que mesmo que respondam em um primeiro momento, a maioria dos tumores adquirem resistência durante o tratamento, ainda que continuem a apresentar alta expressão de ER α (59). Além disso, cerca de 1/3 das mulheres em estágio inicial de carcinoma mamário RE-positivo que foram tratadas com Tamoxifeno recidivam no período de 2 a 5 anos (75). Por se tratar de um pró-fármaco, a eficácia da ação do Tamoxifeno é altamente dependente do fator farmacogenético, ligado principalmente à enzima CYP2D6, uma das enzimas do citocromo P450 mais polimórficas (51, 55). Ademais, outros problemas já foram mostrados com este SERM: ele pode ter uma ação estrogênica, atuando como agonista do ER α no útero, o que leva a um maior risco de desenvolvimento de lesões neoplásicas nesse tecido (76), além de atuar no tecido mamário como antagonista do RE β , inativando uma via importante de indução de morte tumoral (77). Ainda, a dosagem do Tamoxifeno é limitada pela sua citotoxicidade, sendo que pacientes que apresentam altos níveis de Endoxifeno são mais propícios a apresentar efeitos colaterais (54).

Os inibidores da aromatase, por sua vez, apesar de apresentarem, em geral, uma boa tolerabilidade, quando utilizados por períodos longos estão associados com efeitos adversos sérios, como complicações ósseas e cardiovasculares (78). Embora os IAs tenham um efeito puramente antiproliferativo, mecanismos de resistência a estes fármacos já foram extensivamente descritos, a saber: para o Exemestano, a resistência adquirida é veiculada

através da indução da via de MAPK, através da superexpressão de RAs (79), e promoção do ciclo celular, enquanto há diminuição da expressão dos REs; para o Anastrozol, diminuição da expressão de REs enquanto há ativação de RE independente de estrogênio, além da indução da via de proliferação de IGFR1 e PI3K/AKT/mTOR; e para o Letrozol, promoção do ciclo celular, modulação da expressão de HER2 e diminuição da expressão de REs enquanto há ativação de RE independente de estrogênio (78).

Em relação ao Fulvestranto, devido à sua via de administração, este fármaco tem certas limitações quanto ao volume e, conseqüentemente, à dose a ser entregue (64). Além disso, estudos recentes mostraram que alguns tumores já desenvolveram resistência a este fármaco. Apesar de não bem elucidados, os mecanismos de resistência ao Fulvestranto envolvem uma proliferação independente de REs, onde há superexpressão de ciclinas E2 e E3 (80) e mutações no gene *PIK3CA*, o qual codifica a subunidade p110 α das PI3Ks (81).

Para o Trastuzumabe, o principal obstáculo à terapia é a resistência adquirida durante a terapia. Para isso, já foram estudados alguns mecanismos de evasão dos tumores ao tratamento, tais como: a produção de uma forma truncada de HER-2, chamada de p95HER2, a qual, apesar de apresentar atividade proliferativa, não apresenta o domínio extracelular no qual se liga o anticorpo monoclonal; aumento da expressão de vias de sinalização *downstream* a HER-2; e ativação da via de proliferação por comunicação cruzada com outras vias, como a de IGFR1, HER3 e EGFR (82).

Em geral, a terapia citotóxica age tanto em tecidos benignos quanto em malignos, desde que tenham a característica de alta taxa de proliferação. Assim, os efeitos citotóxicos mais importantes ligados a este tipo de quimioterapia são mucosite, mielodepressão, cardiotoxicidade, neurotoxicidade periférica e central (68) e neutropenia severa (69). Além disso, para cada mecanismo de ação dos medicamentos desta categoria, mecanismos de resistência já foram descritos (40, 70, 71, 73).

Ademais, uma nova teoria relacionada aos mecanismos de metástase e recidiva vem ganhando espaço na literatura. Estudos com vários tipos de câncer demonstram que a população tumoral celular é heterogênea, apresentando células que se auto-renovam e possuem maior capacidade de formação de novos tumores, as quais são chamadas de células-tronco tumorais (CTTs) (83). Assim, os carcinomas que apresentam CTTs são mais resistentes ao tratamento com quimioterápicos (84), sendo estas células também responsáveis por recidivas da doença (Figura 6). Além disso, há evidências de que as CTTs estão relacionadas com a capacidade de transição epitélio-mesenquimal dos tumores, estando associadas diretamente à metástase (85).

ADAPTADO DE (84).

FIGURA 6. TEORIA DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS: RESISTÊNCIA À TERAPIA CONVENCIONAL E RECIDIVA.

1.6 Busca por novas terapias

As células malignas desenvolvem mecanismos que permitem a proliferação ao mesmo tempo que inibem a morte (86) (Figura 7). Assim, para que uma nova terapia antitumoral seja eficaz, ela precisa afetar em uma ou mais dessas características essenciais à sobrevivência das células tumorais.

ADAPTADO DE (86).

FIGURA 7. MARCADORES BIOLÓGICOS DOS CARCINOMAS.

Especificamente para o câncer de mama, novos compostos que possam atuar no tecido mamário como antagonistas de $RE\alpha$ ao mesmo tempo que sejam agonistas de $RE\beta$ são desejados na clínica (59). Ainda, a busca por compostos que possam potenciar os efeitos da quimioterapia convencional é constante (65), pois torna possível combinar mecanismos de ação de modo a reduzir o tempo de tratamento e, consequentemente os

efeitos colaterais crônicos, além de prolongar o tempo de remissão clínico e de sobrevivência (87). Além disso, a combinação de antitumorais pode diminuir a resistência adquirida dos tumores ao eliminar a comunicação entre as vias de proliferação, sobrevivência e anti-apoptose (88).

1.6.1 Alternativas terapêuticas – Fitoestrógenos

Na última década, o interesse médico e farmacêutico em compostos naturais cresceu dramaticamente (89). Neste papel, os fitoestrógenos se destacam por demonstrar capacidade de inibir o desenvolvimento de tumores (89, 90), bem como atuar em disfunções e doenças relacionadas à idade, processos mentais, metabolismo, doenças cardiovasculares e da reprodução, osteoporose, arteriosclerose, neurodegeneração e acidente vascular encefálico (89). Os fitoestrógenos são um grupo de compostos não-esteroidais derivados de frutas, vegetais e grãos, presentes sobretudo em leguminosas, que são capazes de se ligar a receptores esteroides de animais (91), sendo principalmente das classes das isoflavonas, coumestans e lignanas (90). Esses compostos apresentam um anel fenólico que interage com REs, podendo atuar como agonistas ou como antagonistas, dependendo da quantidade e tipo dos REs, bem como da quantidade de estrogênio endógeno circulante. Os fitoestrógenos obtidos na dieta são metabolizados por bactérias intestinais, absorvidos, conjugados no fígado, circulados via plasma e excretados na urina, sendo que a composição da microbiota intestinal parece exercer certa importância para a eficácia destes compostos (89).

Apesar desta classe de compostos naturais ligar-se aos REs, com preferência ao RE β , outros efeitos biológicos já foram descritos, tais como ativação de receptores serotoninérgicos, IGFR1, ligação a radicais livres, indução de metilação de DNA, efeitos nos mecanismos de PI3K/Akt/MAPK, atividade em DNA topoisomerase, expressão de RNA, ciclo celular e apoptose. Todas essas atividades são responsáveis por efeitos antioxidante, antiproliferativa, antimutagênica e antiangiogênica que promovem saúde e longevidade (89).

Em relação ao potencial antitumoral, uma grande quantidade de fitoestrógenos provenientes da soja, chá verde (89), uva (90), mirtilo, trevo vermelho, entre outros (92) já foram relatados. O Resveratrol, por exemplo, é um fitoestrógeno presente na uva e no vinho que vem sendo largamente utilizado na medicina tradicional chinesa e japonesa por apresentar atividades antiangiogênica, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e protetora do sistema cardiovascular (93, 94). Ainda, o Resveratrol tem mostrado atividade antiproliferativa marcante em estudos *in vitro* de câncer de mama, estimulando vias de morte celular, como apoptose, e autofagia (95-97), além de mostrar-se também como um potencializador de quimioterápicos tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (98). Outro exemplo de fitoestrógeno é o Pterostilbeno, um polifenol presente no mirtilo que é capaz de

causar retenção no ciclo celular em linhagem tumoral de mama Luminal ao diminuir a expressão de Ciclina D1, enquanto aumenta a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e citocromo C em linhagens Luminal e Triplo Negativa de câncer de mama (92).

1.6.2 Genisteína

A soja é largamente consumida no Oriente há mais de 5000 anos, sendo considerada uma das cinco culturas sagradas, juntamente com o arroz, o trigo, a cevada e o milho. Em 1999, o *Food and Drugs Administration* (FDA) aprovou a proteína de soja como alimento funcional, por proporcionar grandes benefícios à saúde. Apesar de o Brasil apresentar grande produção de soja, ainda há certa resistência da população em consumir essa leguminosa (99). De fato, ao se comparar o consumo de soja entre mulheres orientais e ocidentais, nota-se que as primeiras consomem de 20 a 50g/dia, enquanto as ocidentais consomem cerca de 1g/dia. Ainda, observou-se que a quantidade de estrogênio endógeno das orientais, em especial das japonesas, é de 29-30% menor quando comparadas às pacientes ocidentais, resultando em menor incidência de câncer de mama (100). Logo, é possível que o consumo da soja, que é rica em fitoestrógenos, esteja relacionado à menor ocorrência de câncer de mama em mulheres.

As isoflavonas da soja podem ser encontradas na sua maioria na forma de glicosídeos (Genistina e Daidzina) e na sua minoria na forma de agliconas (Genisteína e Daidzeína). Assim, as isoflavonas glicosídeos podem ser transformadas em isoflavonas agliconas por bactérias da flora intestinal, embora ambas as formas possuam atividade antioxidante, estabilizando radicais livres, os quais estão diretamente envolvidos no processo de carcinogênese e doenças do coração (100). Entre os fitoestrógenos da soja mais estudados, a Genisteína vem apresentando grande potencial antitumoral *in vitro*, especialmente para linhagens tumorais de mama (101).

A Genisteína foi primeiramente isolada em 1899 de *Genista tinctoria* L., mas foi também descoberta como um metabólito secundário em *Glycine max* L., conhecida popularmente como soja. Assim, esta isoflavona vem mostrando atividade antitumoral *in vitro* em vários tipos de carcinoma, como câncer metastático de bexiga, cervical, próstata, renal e mama (102, 103). Este fitoestrógeno não-esteroidal possui característica molecular semelhante ao 17 β -estradiol, tendo grande afinidade pelos REs, preferencialmente pelo RE β , que está relacionado com a inibição da proliferação celular. Logo, estudos indicam que a Genisteína possui uma dualidade de efeitos, em que há ação estrogênica quando o estrogênio endógeno é encontrado em baixas concentrações, mas ação antiestrogênica quando o estrogênio endógeno está alto. Além disso, apresenta atividade inibitória em enzimas tirosina quinase e DNA topoisomerase II, que estão relacionadas à proliferação celular; e estimulatória do hormônio sexual ligado à globulina (SHBG), relacionado à

diminuição de estrogênio ativo circulante (100, 103, 104). Devido a esse papel ora estrogênico, ora antiestrogênico, a literatura se mostra controversa quanto a ação da Genisteína em células tumorais de mama, visto que enquanto alguns estudos mostram um potencial antitumoral frente a linhagens celulares de carcinoma mamário Luminal (MCF7) e Triplo Negativo (MDAMB231) (105-107), outros indicam que em baixas concentrações ($<10\mu\text{M}$), a Genisteína tem efeito estrogênico, estimulando o desenvolvimento e progressão dos carcinomas mamários, através do estímulo à síntese de DNA e proliferação celular (108).

Em relação à combinação farmacológica da Genisteína com a terapia convencional, diversos estudos apontam uma sinergia do fitoestrógeno com alguns quimioterápicos, como Doxorubicina e Docetaxel em modelos celulares tumorais de mama tanto estrógeno-dependente quando independente (102). Quanto à interação da isoflavona com os tratamentos de endocrinoterapia mais utilizados no Brasil para o câncer de mama, a literatura mostra dados conclusivos apenas para o Tamoxifeno, mas sem considerar a sua característica de pró-fármaco. Logo, foi mostrado em ensaios *in vivo*, a sensibilização do tumor à ação do Tamoxifeno por intermédio da Genisteína quando esta é consumida via dieta e desde o nascimento (109).

Justificativa

É muito grande a procura da ciência por terapias alternativas para o câncer de mama, pois a maioria dos fármacos disponíveis no mercado tem seu uso limitado por alguns fatores, como a elevada toxicidade, resistência (*de novo* e adquirida) e baixa biodisponibilidade. Nesse contexto, as combinações entre compostos vêm ganhando espaço na literatura, sendo que cada vez mais acredita-se em tratamentos personalizados, dependendo das características dos tumores de mama.

No presente estudo, foram usadas as linhagens tumorais MCF7, SKBR3, MDAMB231, e a linhagem controle MCF10A, por se tratar dos tipos celulares mais estudados e melhor caracterizados para o câncer de mama até o momento. Além disso, tais linhagens permitem correlacionar diferentes aspectos fisiopatológicos dos carcinomas mamários, pois correspondem ao subtipo Luminal A ($RE^+/RP^+/HER-2^-$), ao que superexpressa HER-2 ($RE^-/RP^-/HER-2^+$), ao Triplo Negativo ($ER^-/PR^-/HER-2^-$) e às células epiteliais de glândula mamária não-cancerígenas, respectivamente. Ainda, uma colaboração com o Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto permitiu o acesso a dois modelos celulares geneticamente modificados que superexpressam a enzima aromatase: as células MCF7aro; e as células LTEDaro, que além de superexpressarem a aromatase também tem crescimento independente de estrogênio e são resistentes à ação dos Inibidores da Aromatase. Para estes ensaios, a linhagem de fibroblastos HFF1 foi utilizada como controle.

Os fármacos escolhidos são os mais frequentemente utilizados no Brasil para a terapêutica deste tipo de tumor. Assim, procurou-se entender como o N-desmetiltamoxifeno e o 4-hidroxitamoxifeno, metabólitos do Tamoxifeno, bem como os IAs Exemestano, Letrozol e Anastrozol funcionam quando combinados com a Genisteína, a qual foi escolhida por apresentar prévia atividade antitumoral tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Ainda, procurou-se estudar diferentes doses da isoflavona a fim de se perceber a diferença de mecanismos que poderiam explicar a sua dualidade de efeitos. Por fim, de modo geral, sabe-se que as drogas podem atuar como sensibilizadores de células tumorais quando aplicadas previamente ao tratamento quimioterápico, ou ainda podem atuar como indutores efetivos de morte celular quando utilizadas após os antitumorais, logo foram também avaliados regimes de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento.

Assim, a finalidade deste trabalho foi avaliar conclusivamente se a Genisteína auxilia no tratamento do câncer de mama e em que condições os benefícios acontecem, possibilitando, assim, uma melhor visão da aplicação clínica do fitoestrógeno. Esta análise deu-se através da avaliação da viabilidade celular, da progressão do ciclo celular, do perfil de morte celular (apoptose, necrose e autofagia) e da análise quantitativa de células-tronco tumorais. Além disso, avaliou-se a capacidade da Genisteína em reverter o quadro de resistência adquirida aos IAs.

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral da combinação da Genisteína com os quimioterápicos convencionais em células de câncer de mama dos subtipos a) Luminal: comum (MCF7), com superexpressão de aromatase (MCF7aro) e resistente aos IAs (LTEDaro); b) que superexpressa HER-2 (SKBR3) e c) Triplo Negativo (MDAMB231), tendo como controle células epiteliais de glândula mamária não-cancerígenas (MCF10A) e fibroblastos (HFF1).

3.2 Objetivos específicos

Para a PARTE I do presente trabalho, que se refere aos tratamentos com a Genisteína combinada ao N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno (metabólitos do Tamoxifeno) nas linhagens MCF7, SKBR3 e MDAMB231, os objetivos específicos foram:

- A) Avaliar a viabilidade celular utilizando o método de incorporação de vermelho neutro, tendo como controle as células benignas MCF10A.
- B) Avaliar o caráter da associação farmacológica (efeito sinérgico, aditivo ou antagônico) pelo método matemático de Chou-Talalay.
- C) Avaliar a progressão do ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) por marcação com Iodeto de Propídeo utilizando metodologia de citometria de fluxo, tendo como controle as células benignas MCF10A.
- D) Analisar o perfil de morte celular (apoptose/necrose) através de marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídeo utilizando a metodologia de citometria de fluxo, tendo como controle as células benignas MCF10A.
- E) Caracterizar a morte celular através do estudo da expressão de proteínas-chave nas vias de apoptose (Pró-caspase 8, Pró-caspase 9, Bcl-2 e Bcl-xl) e autofagia (Beclina-1 e LC3 A/B) por meio de *Western Blot*.
- F) Avaliar os efeitos nas células-tronco tumorais da linhagem de câncer de mama Triplo Negativo (MDAMB231) através de marcação com CD24-APC, CD44-FITC e Iodeto de Propídeo pelo método de citometria de fluxo.

Para a PARTE II do trabalho, que se refere aos tratamentos com a Genisteína combinada ao Letrozol, Anastrozol e Exemestano (inibidores da aromatase) nas linhagens MCF7aro e LTEDaro:

- A) Avaliar a viabilidade celular utilizando o método de oxirredução de 3-(4,5-Dimetiltiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio (MTT), tendo como controle fibroblastos (HFF1).
- B) Avaliar o caráter da associação farmacológica (efeito sinérgico, aditivo ou antagônico) pelo método matemático de Chou-Talalay.
- C) Avaliar a progressão do ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) por marcação de Iodeto de Propídeo utilizando a metodologia de citometria de fluxo e expressão de Ciclina E por *Western Blot*.
- D) Analisar o perfil de morte celular por detecção da atividade de lactato desidrogenase (LDH) e da expressão proteica de PARP clivada/total e de Pró-caspase 7 pela metodologia de *Western Blot*.
- E) Avaliar os possíveis mecanismos de ação da Genisteína em MCF7aro através da observação do ensaio de citotoxicidade MTT após a combinação da isoflavona com o produto da aromatase (Estradiol) e com os inibidores do receptor de estrogênio alfa (Fulvestranto – ICI 182,780), do receptor do estrogênio beta (4- [2-fenil-5,7-bis(trifluorometil) pirazolo [1,5-a] pirimidin-3-il] fenol – PHTPP) e do receptor de androgênio (Casodex – CDX).
- F) Avaliar os efeitos na expressão da aromatase, receptores de estrogênio α e β e receptor de androgênio por meio de *Western Blot*.

Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células

As linhagens celulares de adenocarcinoma mamário do subtipo Luminal (MCF7), com superexpressão de HER-2 (SKBR3) e Triplo Negativo (MDAMB231), bem como a linhagem controle de células epiteliais de glândula mamária não-cancerígenas (MCF10A) foram cultivadas em frascos de cultivo de 75 cm² em meio RPMI suplementado de 10% de soro fetal bovino (SBF) inativado e antibióticos/antimicótico (1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B). Por sua vez, a linhagem celular geneticamente modificada de adenocarcinoma Luminal que superexpressa a enzima aromatase (MCF7aro) foi cultivada em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) suplementado com sais de Earle, 1mM de piruvato de sódio, 1% de L-glutamina, 100µg/ml de geneticina, 10% de soro fetal bovino (SBF) inativado e antibióticos/antimicótico (1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B). Finalmente, a linhagem celular resistente a estrogênio LTEDaro foi cultivada em meio MEM sem vermelho de fenol, 1mM de piruvato de sódio, 1% de L-glutamina, 100µg/ml de geneticina, 10% de soro fetal bovino tratado com carvão ativado (SFB-CT) e antibióticos/antimicótico (1% de penicilina – estreptomicina – anfotericina B). Todas as linhagens foram mantidas em estufa de CO₂ 5% e a temperatura de 37°C.

Antes de cada experiência, as células foram plaqueadas em meio com soro fetal bovino tratado com carvão ativado (SFB-CT) a fim de minimizar a interferência de estrogênios exógenos. Da mesma forma, as células MCF7aro, ainda, foram cultivadas três dias antes dos experimentos em meio MEM sem vermelho de fenol, 1mM de piruvato de sódio, 1% de L-glutamina, 100µg/ml de geneticina, 5% de SFB-CT e antibióticos/antimicótico (1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B). As experiências com as MCF7aro foram realizadas, ainda, com a incubação de 1nM de Testosterona (T), que funciona como um agente de proliferação celular, uma vez que corresponde ao substrato natural da enzima aromatase (61).

Para determinar a densidade celular, as células foram tripsinizadas, coradas com corante vital azul de Tripán a 0,1% e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer. Após a determinação da densidade celular, as células foram plaqueadas nas diferentes placas de cultura na densidade celular desejada para cada experiência.

4.2 Genisteína e Antitumorais

Todos os quimioterápicos foram adquiridos comercialmente, bem como a Genisteína de *Glycine max* da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

- N-desmetiltamoxifeno (cat. #D9069) a 20µM;
- 4-hidroxitamoxifeno (cat. #H7904) a 30µM;
- Exemestano (cat. #PZ0006) a 1-10µM;
- Anastrozol (cat. #A2736) a 1-10µM;

- Letrozol (cat. #L6545) a 0,2-10 μ M;
- Genisteína de *Glycine max* (cat. #G6776) a 1-100 μ M.

As doses de trabalho da seguinte forma:

- a) para os estudos com os metabólitos do Tamoxifeno, a dose dos metabólitos foi a menor dose que diminuiu a viabilidade celular em 50%;
- b) para os estudos com os inibidores da aromatase, as doses de trabalho foram estabelecidas pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, conforme estudos anteriores;
- c) para as combinações com o Tamoxifeno, a dose da Genisteína utilizada foi a maior possível, desde que não provocasse morte celular à linhagem benigna;
- d) para as combinações com os inibidores da aromatase, a dose de Genisteína utilizada foi a dose de 1 μ M.

Para os metabólitos do Tamoxifeno, foi determinado o tempo de tratamento de 24h, seguindo as recomendações da bula do fármaco, enquanto para os inibidores da aromatase, foi estabelecido o tempo de tratamento de 72h, conforme protocolo do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Além disso, ensaios preliminares com os metabólitos do Tamoxifeno determinaram o regime de tratamento, sendo que foram estudados os regimes de pré-tratamento com a isoflavona por 24h, seguido de 24h de tratamento com cada um dos metabólitos; o regime de tratamento simultâneo em que a isoflavona e os metabólitos são colocados em contato com as células simultaneamente; e o regime de pós-tratamento, no qual primeiramente são colocados os metabólitos do Tamoxifeno por 24h, seguidos de 24h de incubação com a Genisteína.

4.3 Ensaio de viabilidade celular- Incorporação de vermelho neutro

Para avaliar a viabilidade celular nas linhagens MCF7, SKBR3, MDAMB231 e MCF10A, foi utilizado o método de incorporação do vermelho neutro, como descrito previamente (110). Este método é baseado na capacidade das células vivas em incorporar o corante vermelho neutro e acumulá-lo em seus lisossomos. Desse modo, após a incubação por 24 horas das linhagens tumorais (2×10^4 células/poço) com os diferentes tratamentos (em meio livre de estrogênio), foi adicionado o vermelho neutro na concentração de 50 μ g/mL. A placa foi então incubada por 3 horas em estufa umidificada, 5% de CO₂ e a 37 °C. Após este período, a solução foi removida e os poços lavados com solução de cloreto de cálcio 1% e formoldeído 1% para fixação das células na placa. Em seguida, a solubilização do corante foi feita com adição de uma solução de etanol 50% e ácido acético 1% em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 por 15 minutos em temperatura ambiente. A placa foi lida em espectrofotômetro a 540nm. A viabilidade celular foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{[(D.O_{\text{célula+substância teste}}) - (D.O_{\text{basal}})]}{[(D.O_{\text{célula+meio de cultura}}) - (D.O_{\text{basal}})]} \times 100 \quad [1]$$

D.O.: densidade óptica

4.4 Ensaio de viabilidade celular- MTT

O ensaio foi realizado como previamente (111), para avaliar a viabilidade celular da linhagens MCF7aro, LTEDaro e HFF-1 mediante tratamentos isolado com a Genisteína e combinados da isoflavona com os inibidores da aromatase (Exemestano, Anastrozol e Letrozol). Além disso, este método também foi usado como ferramenta para elucidação de possíveis vias de atuação da Genisteína, através da sua combinação com o produto da aromatase (Estradiol – E₂, a 1nM) e com os inibidores do receptor de estrogênio alfa (Fulvestranto – ICI 182,780, a 100nM), do receptor do estrogênio beta (4- [2-fenil-5,7-bis(trifluorometil) pirazolo [1,5-a] pirimidin-3-il] fenol – PHTPP, a 1μM) e do receptor de androgênio (Casodex – CDX, a 1μM), administrados 1h antes da isoflavona. Em células vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimetiltiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio (MTT), levando à redução desta molécula e formando o Azul de Formazan. O Azul de Formazan foi solubilizado com dodecilsulfato de sódio (DMSO) em meio ácido. A leitura foi medida através do espectrofotômetro em 540nm. Deste modo, após a incubação dos diferentes tratamentos nas linhagens tumorais (2x10⁴ células/poço), foram adicionados 20μL de MTT na concentração de 5mg/mL. A placa foi incubada de 2,5-4 horas em estufa umidificada, 5% de CO₂ e 37°C. Após este período, foram acrescentados 200μL de DMSO para dissolver os sais de Formazan. As placas de cultivo celular foram mantidas por 30 minutos à 37°C ou agitadas por 15 minutos à temperatura ambiente e a quantificação da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. O mesmo cálculo aplicado ao item 4.3 também foi aplicado neste ensaio.

4.5 Avaliação da associação farmacológica

Através dos resultados de viabilidade celular foram plotados os isobologramas das interações entre a Genisteína e os antitumorais, sendo calculado o índice combinação (CI) e a concentração de inibição de 50% (IC₅₀) pelo método de Chou-Talalay (112). Tal método matemático utiliza uma equação que relaciona a mediana a um efeito, o qual é convertido a um valor de IC que quantifica o sinergismo, o efeito aditivo e o antagonismo entre os fármacos. Assim, a tabela abaixo, baseada em G.Al-Jassim, Alabbassi (113) mostra como o índice de combinação foi aplicado. Ademais, para o cálculo do IC, o software Compusyn foi utilizado (CompuSyn Inc, Paramus, NJ, EUA, 2005).

TABELA 4. RELAÇÃO ENTRE IC E EFEITO FARMACOLÓGICO.

IC	Descrição
0 – 0,1	Sinergismo muito forte
0,1 – 0,3	Sinergismo forte
0,3 – 0,7	Sinergismo
0,7 – 0,85	Sinergismo moderado
0,85 – 0,90	Sinergismo leve
0,90 – 1,10	Aditivo
1,10 – 1,20	Antagonismo leve
1,20 – 1,45	Antagonismo moderado
1,45 – 3,3	Antagonismo
3,3 - 10	Antagonismo forte
> 10	Antagonismo muito forte

ADAPTADO DE (113)

4.6 Avaliação da progressão do ciclo celular

Após os tratamentos, as linhagens celulares (5×10^5 células/poço) foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 70% gelado. Após incubação de no mínimo 8h, as células foram novamente lavadas com PBS e ressuspensas em solução para marcação de DNA, contendo Iodeto de Propídeo (PI) a $5 \mu\text{g/mL}$, 0,1% Triton X-100 e $100 \mu\text{g/mL}$ de RNase A (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, EUA) em PBS. O contingente de DNA foi analisado por citômetro de fluxo Canto II ou AccuriC6 (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-EUA) com o auxílio do software FACSDiva (Becton Dickinson, San Jose, CA-EUA), do AccuriC6 (Becton Dickinson, San Jose, CA-EUA) e do ModFit LT 5.0 (Verity Software House, Topsham, ME-EUA).

4.7 Análise do perfil de morte celular por marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo

Células em apoptose são positivas para Anexina V, podendo ser negativas (apoptose precoce) ou positivas (apoptose tardia) para o Iodeto de Propídeo (PI), o que indica a externalização de fosfatidilserina e o nível de integridade das membranas, sendo que células positivas apenas para PI indicam necrose (114). Após os tratamentos, as células (5×10^5 células/poço) foram incubadas com $100 \mu\text{L}$ tampão de ligação (10mM HEPES - pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1,8mM CaCl_2) e com $1 \mu\text{L}$ de Anexina-V FITC (Roche Applied Science) a cada 10^6 células por 20 minutos. Finalmente, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de tampão de ligação e $2 \mu\text{L}$ de Iodeto de propídeo ($100 \mu\text{g/mL}$ -Sigma Aldrich). As

amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Canto II (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA) com o auxílio do software FACSDiva.

4.8 Avaliação da morte celular por necrose

A enzima lactato desidrogenase (LDH) está solubilizada no citoplasma celular e é apenas liberada para o meio extracelular quando há ruptura na membrana plasmática, evento este que acontece em células necróticas (115). Assim a quantificação de LDH foi realizada através do kit CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen, CA, EUA). Brevemente, após plaqueadas e tratadas (2×10^4 células/poço), 20µL do sobrenadante das células foram transferidos para uma placa limpa e 20µL da solução de quantificação de LDH do kit foram adicionados. A placa foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos e, após breve agitação, lida em espectrofotômetro a 492nm.

4.9 Avaliação da expressão de proteínas por *Western Blot*

Para verificar a indução da apoptose, a expressão das proteínas pró-apoptóticas Pró-Caspase 8 e Pró-Caspase 9, e antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl foi avaliada. Ainda, a indução da autofagia foi investigada através da expressão das proteínas Beclina-1 e LC3A/B. Na linhagem MCF7aro, se estudou a expressão dos receptores de estrogênio α e β , androgênio, da proteína PARP clivada, da enzima aromatase, da proteína pró-apoptótica Pró-Caspase 7 e da Ciclina E. Assim, após os tratamentos, as células foram lisadas com tampão de lise (Tris-HCl 20mM pH7,5, NaCl 150mM, EDTA 1mM e Igepal CA 630 1% v/v) contendo inibidores de protease (cat. #p8340) e fosfatase (pirofosfato de sódio 25mM, ortovanadato de sódio 10mM, β -glicerofosfato 10mM) e a quantificação das proteínas foi realizada por Bradford ou kit de BCA. 25-50µg de proteína foram ressuspensos em tampão de amostra com 5% de mercaptoetanol, 4% de SDS, 20% de glicerol e 100mM de Tris-Cl (pH 6) e submetidos à corrida eletroforética, seguida de eletrotransferência para membranas de PVDF ou nitrocelulose. As membranas foram então bloqueadas em tampão de lavagem com 5% de leite desnatado e subsequentemente incubadas com anticorpos primários para detecção de Pró-caspase-7 (*caspase-7 mouse monoclonal antibody*- Santa Cruz), Pró-caspase-8 (*caspase-8 mouse monoclonal antibody*- BD Pharmingen), Pró-caspase-9 (*caspase-9 mouse monoclonal antibody*- BD Pharmingen), PARP clivada (*PARP rabbit polyclonal antibody*- Cell Signaling), Bcl-2 (*Bcl-2 rabbit polyclonal antibody*- Cell signaling), Bcl-xl (*Bcl-xl rabbit monoclonal antibody*- Cell Signaling), Beclina-1 (*Beclin-1 rabbit monoclonal antibody* - Cell Signaling), LC3 A/B (*LC3A/B mouse monoclonal antibody*- Cell Signaling), Receptor de estrogênio alfa (*ER α mouse monoclonal antibody*- Santa Cruz), Receptor de estrogênio beta (*ER β mouse monoclonal antibody*- Thermo Fisher), Receptor de androgênio (*AR mouse monoclonal antibody*- Santa Cruz), Aromatase (*CYP19 mouse monoclonal antibody*- Santa Cruz) e Ciclina E (*cyclin E mouse monoclonal antibody* – Santa

Cruz). Os anticorpos foram diluídos em diferentes concentrações (conforme o protocolo do fabricante) em tampão de lavagem e foram incubados com a membrana por um período de 12-18h a 4°C. Após três lavagens de 10 minutos, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (*Peroxidase-conjugated AffinitiPure Anti-Rabbit* e *Peroxidase-conjugated AffinitiPure Anti-mouse* – Jackson ImmunoResearch) por 1h à temperatura ambiente e a detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência, utilizando filme ultrasensível ou em fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA-EUA).

É importante ressaltar que o estudo de proteínas realizado na Universidade de São Paulo foi desenvolvido através do projeto de Iniciação Científica intitulado “Avaliação *in vitro* da associação entre Genisteína e Tamoxifeno na morte celular do câncer de mama: apoptose e autofagia”, executado pela discente Isadora Marques Ferreira, sob orientação da Profa. Dra. Maria Regina Torqueti e com bolsa CNPq (nº 143514/2018-0).

4.10 Quantificação das células-tronco tumorais por citometria de fluxo

As células da linhagem tumoral MDAMB231 (5×10^5 células/poço) foram plaqueadas e, após os tratamentos isolados e combinados, essas células foram recuperadas em tubo FACs e incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com os fluorocromos, anticorpos APC-anti-CD44 (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) e FITC-anti-CD24 (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA), por 30 minutos, à 4°C e no escuro, e marcador de viabilidade Iodeto de Propídeo a 100µg/ml, conforme instruções do fabricantes. Em seguida, as análises procederam em citômetro de fluxo Canto II com o software FACSDiva (FACScan, Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) (116). Foram consideradas células-tronco tumorais as células com marcação CD44⁺/CD24^{-/low} (116-118) e Iodeto de Propídeo-negativas. É importante ressaltar que tal técnica, da maneira que se apresenta, foi desenvolvida no próprio Laboratório de Citologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) para este trabalho e já foi utilizada para uma publicação do mesmo laboratório.

Acresce que tal estudo foi realizado como parte de um intercâmbio na forma de estágio, realizado pelo Ms. Fabien Trouille, vinculado à Universidade do Porto, com projeto intitulado “Avaliação da combinação entre Genisteína e metabólitos do Tamoxifeno na subpopulação de células-tronco tumorais de câncer de mama”, orientado pela Profa. Dra. Maria Regina Torqueti.

4.11 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa Graph Pad Prisma® (versão 6, Graph Pad, USA). Foi utilizada a análise de variância entre os grupos

(ANOVA) “one-way”, com os testes complementares de Dunnett ou Bonferroni. Foram feitos pelo menos três experimentos independentes e em triplicatas.

Resultados e Discussão

PARTE I – GENISTEÍNA E OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO

5.1 Ensaios preliminares: Determinação das doses de trabalho e regime de tratamento

Primeiramente, foram determinadas as doses de trabalho para este estudo através de ensaios preliminares de viabilidade celular por incorporação de vermelho neutro. Assim, para a Genisteína, foi determinada a maior dose que não causasse efeito nas células benignas, ou seja, que não a diminuísse significativamente a viabilidade das células MCF10A (Figura 8) ($p>0,01$). Logo, a dosagem definida para todos os ensaios seguintes de combinação farmacológica foi a de 100 μ M. Além disso, a fim de se avaliar se doses baixas da Genisteína influenciavam a ação dos quimioterápicos, ensaios também foram realizados com a dose de 5 μ M. Por fim, calculou-se a concentração de Genisteína que diminuía a viabilidade celular em 50% (IC_{50}) de cada uma das linhagens celulares tumorais (Tabela 5), sendo que a maior IC_{50} foi apresentada em células tumorais Triplo Negativas (MDAMB231), seguidas da linhagem benigna (MCF10A) e das linhagens tumorais que superexpressa HER2 (SKBR3) e Luminal A (MCF7). Ainda, ressalta-se que a maior dose de trabalho definida (100 μ M) encontra-se muito abaixo da IC_{50} para as células benignas (MCF10A).

FIGURA 8. VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS DE MAMA (TUMORAIS E BENIGNA) FRENTE AO TRATAMENTO COM GENISTEÍNA POR 24H, QUANTIFICADA VIA ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. * $P<0,01$ VS. O CONTROLE NEGATIVO (RPMI) (ANOVA COMBINADA COM PÓS-TESTE DE DUNNETT).

Assim, esses resultados corroboram estudos anteriores, que mostram a maior citotoxicidade da Genisteína contra linhagens tumorais de mama do que contra a linhagem benigna e, ainda, o maior efeito antiproliferativo na linhagem Luminal (MCF7) do que na Triplo Negativa (MDAMB231) (119).

TABELA 5. IC₅₀ DA GENISTEÍNA NAS DIFERENTES LINHAGENS CELULARES APÓS TRATAMENTOS POR 24H.

Linhagem Celular	IC ₅₀ Genisteína (µM)
MCF10A	171,81 ± 2,78
MCF7	96,14 ± 3,25
SKBR3	112,63 ± 3,37
MDAMB231	186,21 ± 3,74

IC₅₀: DOSE QUE DIMINUI 50% DA VIABILIDADE CELULAR DE ACORDO COM ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± SEM DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA.

Para os dois metabólitos do quimioterápico Tamoxifeno, a saber, N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, foi determinada a dose de trabalho no modelo tumoral para o qual o Tamoxifeno é indicado, ou seja, a linhagem celular Luminal (MCF7). Assim, as doses escolhidas foram 20µM para o N-desmetiltamoxifeno e 30µM para o 4-hidroxitamoxifeno, visto que estas doses se aproximaram do IC₅₀ desses fármacos para a linhagem citada (Tabela 6).

TABELA 6. IC₅₀ DOS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO EM MCF7 APÓS TRATAMENTOS POR 24H.

Linhagem Celular	Antitumorais	IC ₅₀ (µM)	Dose de trabalho (µM)
MCF7	N-desmetiltamoxifeno	25,55 ± 2,07	20
	4-hidroxitamoxifeno	32,02 ± 2,52	30

IC₅₀: É REPRESENTADO PELA DOSE QUE DIMINUI 50% DA VIABILIDADE CELULAR DE ACORDO COM ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± SEM DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES.

É importante ressaltar que os estudos com os metabólitos do Tamoxifeno são escassos no momento, no entanto, foi recentemente reportado que o IC₅₀ do 4-hidroxitamoxifeno em células MCF7 é de 29µM (120), o que foi confirmado pelos presentes resultados.

A fim de se escolher o melhor regime de tratamento para este estudo, as combinações com os antitumorais foram feitas em regimes de Pré-tratamento, Tratamento Simultâneo e Pós-tratamento com a Genisteína. Assim, resumidamente, o regime de Pré-tratamento com a Genisteína a 100µM apresentou grande diminuição de viabilidade das células benignas, não se mostrando interessante à terapêutica, enquanto o regime de Pós-tratamento não mostrou benefícios marcantes em relação ao regime de Tratamento Simultâneo (dados não mostrados). Logo, decidimos utilizar o regime de Tratamento Simultâneo ao longo de todo o trabalho, visto que este regime permite caracterizar a interação farmacológica entre os compostos (sinergia, antagonismo e efeito aditivo).

5.2 Análise da combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína na viabilidade celular das linhagens tumorais e caracterização farmacológica

Os resultados da viabilidade celular das combinações da isoflavona com os metabólitos do Tamoxifeno em regime simultâneo de tratamento foram apresentados na Figura 9. Assim, na linhagem benigna (MCF10A), foi observado que apesar dos quimioterápicos diminuírem significativamente a viabilidade celular ($p < 0,0001$), quando combinados com ambas as doses baixa e alta de Genisteína (5 μ M e 100 μ M) não houve diferença significativa na viabilidade.

Quanto ao subtipo Luminal A (MCF7), notou-se que as combinações dos quimioterápicos com a dose de 5 μ M da Genisteína não foi benéfica, havendo aumento da viabilidade celular desta linhagem ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$ para N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, respectivamente). Interessantemente, observou-se que a combinação da Genisteína a 5 μ M com o metabólito 4-hidroxitamoxifeno apresentava a mesma viabilidade de quando o tratamento era realizado com a isoflavona isoladamente e na mesma concentração, sugerindo que a dose baixa não é o suficiente para auxiliar a ação do antitumoral. Além disso, o efeito observado com as combinações com a baixa concentração de Genisteína é totalmente revertido com a Genisteína a 100 μ M, havendo ainda menor viabilidade celular do que em tratamentos com os quimioterápicos isoladamente ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ para combinação com N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, respectivamente).

Um comportamento semelhante ao da MCF7 aconteceu em células tumorais de mama que superexpressam o HER2 (SKBR3), onde a combinação dos quimioterápicos com a baixa dose da Genisteína provocou aumento da viabilidade celular ($p < 0,001$ para a combinação com ambos quimioterápicos), enquanto que a combinação com a dose de 100 μ M da isoflavona provocou a reversão desses efeitos e até mesmo a diminuição da viabilidade celular ($p < 0,001$ para a combinação com o 4-hidroxitamoxifeno).

Por fim, curiosamente, para as células tumorais de mama do tipo Triplo Negativo (MDAMB231), observou-se que a dose baixa de Genisteína provoca um efeito de diminuição da viabilidade celular muito desejável quando combinada com o N-desmetiltamoxifeno ($p < 0,0001$), mas tal efeito não foi observado para o 4-hidroxitamoxifeno, não havendo diferença significativa entre o tratamento isolado com este metabólito e a combinação com a isoflavona. No entanto, quando a combinação é realizada com a Genisteína a 100 μ M, há menor viabilidade celular para ambos os metabólitos, em relação aos tratamentos com os quimioterápicos isoladamente ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ para combinação com N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, respectivamente).

FIGURA 9. VIABILIDADE CELULAR DAS DIFERENTES LINHAGENS CELULARES APÓS TRATAMENTOS COMBINADOS COM A GENISTEÍNA E OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO POR 24H. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. **** $P < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (RPMI) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE DUNNETT). ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ E #### $P < 0,0001$ VS. QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE EM TRATAMENTO ISOLADO; NS: DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). G: GENISTEÍNA; D: N-DESMETILTAMOXIFENO; H: 4-HIDROXITAMOXIFENO.

Assim, de modo geral, a combinação dos quimioterápicos com a Genisteína na maior dose (100μM) mostrou-se mais benéfica, não alterando a viabilidade celular das células benignas de mama (MCF10A) ao mesmo tempo que diminui a viabilidade celular de todas as células tumorais de mama (MCF7, SKBR3 e MDAMB231). De fato, ao calcular-se o IC₅₀ do N-desmetiltamoxifeno e do 4-hidroxitamoxifeno quando associados à Genisteína a 100μM, observou-se uma diminuição de 86,30 e 88,76% para MCF7 e de 57,96 e 55,08% para MDAMB231, respectivamente (Figura 10). No entanto, os resultados não apontaram diminuição do IC₅₀ para as células SKBR3, somente há diminuição do IC₇₅ para o 4-hidroxitamoxifeno, indicando que, para este tipo de tumor, somente em altas doses do antitumoral é que a combinação com Genisteína a 100μM se torna vantajosa.

FIGURA 10. ISOBOLOGRAMAS PARA COMPARAÇÃO DO IC₅₀ APÓS TRATAMENTOS COM OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO COM A GENISTEÍNA A 100µM NAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA MCF7, SKBR3 E MDAMB231. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DE 3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR EM TRIPPLICATA. O IC₅₀ REPRESENTA A DOSE DO ANTITUMORAL EM QUE HÁ DIMINUIÇÃO DE 50% DA VIABILIDADE CELULAR.

De fato, a análise da interação farmacológica entre a Genisteína a 100µM e os metabólitos do Tamoxifeno mostrou que para a linhagem MCF7, há sinergismo entre os tratamentos; para a linhagem SKBR3, há antagonismo, sendo que tal é revertido em doses altas do antitumoral; e para a linhagem MDAMB231, há também sinergismo (Tabela 7).

TABELA 7. ÍNDICE DE COMBINAÇÃO (CI) DOS TRATAMENTOS COM A GENISTEÍNA COMBINADA COM OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO E RESPECTIVA CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO FARMACOLÓGICA.

Linhagem Celular	Tratamento	Diferença significativa*	CI	Caracterização da associação
MCF7	G100µM + D20µM	Sim	0,81746	Sinergismo moderado
	G100µM + H30µM	Sim	0,15191	Sinergismo forte
SKBR3	G100µM + D20µM	Não	-----	-----
	G100µM + H30µM	Sim	4,19766	Antagonismo forte
MDAMB231	G100µM + D20µM	Sim	0,49618	Sinergismo
	G100µM + H30µM	Sim	0,28505	Sinergismo forte

* EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO COM O QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE (ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI A 5% DE SIGNIFICÂNCIA). G: GENISTEÍNA; D: N-DESMETILTAMOXIFENO; H: 4-HIDROXITAMOXIFENO.

Logo, a Genisteína vem se mostrando uma molécula interessante quando combinada com agentes quimioterápicos, ao aumentar a eficácia do antitumoral ao mesmo tempo que diminui a toxicidade do tratamento (121). De fato, já foi mostrado que esta isoflavona tem associação sinérgica com a Doxorubicina, aumentando sua eficácia contra células MCF7-Adr, uma linhagem Luminal que é resistente à terapia convencional, através da retenção do ciclo celular e indução de apoptose (122). Da mesma forma, a Genisteína age sinergicamente ao Ormeloxifeno (SERM) nas linhagens MCF7 e MDAMB231, entre outras linhagens tumorais de mama (119); e age do mesmo modo nessas linhagens quando associada ao ácido eicosapentaenoico, um componente do óleo de peixe que está sendo estudado pelo seu potencial antitumoral (123).

Em relação à combinação com o Tamoxifeno, a Genisteína em baixas doses (1-10µg/mL) tem um efeito inibitório aditivo em células tumorais de mama MCF7, MDAMB231 e MDAMB435 (124). Nossos resultados, no entanto, mostram que em altas doses da isoflavona (100µM), a combinação se torna ainda mais benéfica para os tumores Luminal e Triplo Negativo, apresentando efeito sinérgico com os metabólitos do Tamoxifeno. Ainda, é importante lembrar que há diferença no potencial antiestrogênico do Tamoxifeno e dos seus metabólitos, a qual também poderia explicar a diferença da caracterização farmacológica aqui apresentada. De qualquer forma, até aqui, os resultados mostram que a Genisteína combinada ao Tamoxifeno se mostra benéfica ao tratamento dos tumores Luminal (MCF7) e Triplo Negativo (MDAMB231), mas não aos tumores que superexpressam HER2 (SKBR3). Logo, o trabalho com as combinações foi continuado apenas para as linhagens para as quais estes tratamentos se mostraram vantajosos.

A literatura mostra que as células SKBR3, apesar de apresentar um nível baixo ou indetectável de RE α , possui uma expressão distinta de RE β , próxima à expressão de linhagens Luminais, como a T47D (125, 126). Assim, uma possível explicação para o antagonismo entre a Genisteína e os metabólitos do Tamoxifeno demonstrado nessas

células seria a competição pelo sítio de ligação do RE β . De fato, apesar de antagonizar primordialmente os RE α , estudos de *docking* mostram que o Tamoxifeno e seus metabólitos podem se ligar ao RE β (127), o qual é alvo preferencial da Genisteína (128). Logo, hipotetiza-se que na ausência do alvo do Tamoxifeno, RE α , haja competição entre a Genisteína e o antitumoral no RE β . Ademais, interessante, um estudo com a combinação entre Tamoxifeno e Genisteína em BT474, uma linhagem tumoral de mama Luminal B que superexpressa HER2 e apresenta altos níveis de RE α (129), mostra sinergia entre os tratamentos (124), apontando mais uma vez para a importância da presença desse receptor para um efeito combinado benéfico em células que superexpressam HER2.

5.3 Avaliação da combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína no Ciclo Celular

Sabendo que as combinações dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína a 100 μ M foram benéficas para as linhagens MCF7 e MDAMB231, foi avaliado se as combinações interferiam no ciclo celular dessas linhagens (Figura 11). Assim, os resultados mostraram que para a linhagem MCF10A há retenção do ciclo em G0/G1 quando as células benignas são tratadas com os ambos metabólitos do Tamoxifeno ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ para N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, respectivamente) e, apesar de a Genisteína isolada causar uma retenção em G2/M ($p < 0,001$), quando associada aos quimioterápicos, há uma tendência em amenizar os efeitos dos antitumorais ao diminuir significativamente a retenção em G0/G1 causada por ambos ($p < 0,001$ para combinação com ambos metabólitos), proporcionando um efeito protetivo no ciclo das células benignas.

Na linhagem Luminal (MCF7), foi observado a retenção em G0/G1 para ambos metabólitos do Tamoxifeno ($p < 0,05$ para ambos), havendo, ainda, diminuição da fase S para o 4-hidroxitamoxifeno ($p < 0,01$). Quando os metabólitos foram combinados com a Genisteína, o perfil do ciclo celular assemelhou-se ao da isoflavona isolada, com menor quantidade de células em fase G0/G1 ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ para combinação com N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, respectivamente) e, para a combinação com N-desmetiltamoxifeno, retenção em G2/M ($p < 0,0001$). Logo, pelo menos para o N-desmetiltamoxifeno, a combinação com o fitoestrógeno aumenta a atividade antiproliferativa nesta linhagem celular.

Finalmente, para a linhagem Triplo Negativo (MDAMB231), os resultados mostraram uma retenção em S frente ao tratamento com a isoflavona ($p < 0,0001$); e nos tratamentos combinados com os metabólitos do Tamoxifeno, o perfil de retenção se assemelha ao da Genisteína isolada. Ainda, para ambos tratamentos combinados, percebe-se uma maior retenção das fases do ciclo do que quando os antitumorais são administrados sozinhos,

mostrando que a Genisteína contribui para o fator antiproliferativo dos quimioterápicos nesta linhagem.

FIGURA 11. AVALIAÇÃO DAS FASES DO CICLO CELULAR NAS LINHAGENS CELULARES MCF10A, MCF7 E MDAMB231 APÓS TRATAMENTOS COMBINADOS COM A GENISTEÍNA E OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO POR 24H PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO APÓS MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDEO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. CONTROLE NEGATIVO (RPMI) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ### $P < 0,01$; #### $P < 0,001$; ##### $P < 0,0001$ vs. QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO INDICA DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; D: N-DESMETILTAMOXIFENO; H: 4-HIDROXITAMOXIFENO.

O ciclo celular é definido como “o período entre divisões sucessivas de uma célula”, sendo caracterizado por quatro fases. Na primeira fase, chamada de G1 (G= *gap*), as células estão se preparando para a replicação do DNA. Na fase seguinte, chamada fase S (S= *synthesis*), o DNA é efetivamente replicado. Na terceira fase, chamada de G2, a replicação já foi finalizada e a célula cresce e se prepara para a divisão. Na última fase, chamada de M (M= *mitosis*), a célula se divide em duas células filhas, com igual quantidade de DNA. Ainda, a fase G0 representa o período reversível em que a célula se retira do ciclo de divisão celular. Assim sendo, quando os mecanismos do ciclo celular se apresentam desregulados, a proliferação celular incontrolada é estimulada, podendo ativar mutações

tumorigênicas e levar a fenótipos malignos, como as neoplasias. De fato, a análise do ciclo celular é comum para prever novos insumos terapêuticos oncológicos, sendo que, especificamente para o câncer de mama, em que há um fenótipo predominante de ciclo celular acelerado, promovendo a proliferação celular, normalmente há respostas positivas para tratamentos que afetam as fases S e M (130).

Estudos anteriores mostram que a Genisteína induz retenção do ciclo celular em G2/M, sendo que as células tumorais de mama tem maior susceptibilidade a essa alteração que as células benignas (131, 132). Os resultados aqui mostrados para as células MCF10A e MCF7 corroboram a literatura. Os resultados, no entanto, para a linhagem Triplo Negativa divergem da literatura, sendo que tal diferença pode ser explicada pelo tempo de tratamento com a isoflavona, em que os estudos anteriores usam 48-72h de incubação com a Genisteína e o presente estudo usou 24h, indicando que os efeitos no ciclo também são tempo-dependentes.

Em relação ao metabólitos do Tamoxifeno, ambos metabólitos são descritos por causar retenção em G0/G1, ao mesmo tempo que diminuem a proporção de células em fase S e diminuem ou mantém a proporção de células em G2/M, na linhagem MCF7 (133). O presente estudo mostra claramente a retenção em G0/G1, mostrando ora a diminuição de G2/M, ora a diminuição de células na fase S. Em se tratando da linhagem MDAMB231, o mesmo perfil de retenção em G0/G1 já foi observado frente ao tratamento com Tamoxifeno (134), no entanto, os resultados aqui apresentados foram divergentes da literatura, destacando novamente a importância do tempo de incubação para esta linhagem celular. Ainda, é importante ressaltar que para ambas as linhagens, quando a Genisteína foi combinada com os metabólitos do Tamoxifeno, houve maior retenção em fases do ciclo celular, o que, juntamente com os resultados de menor viabilidade mostrados no vermelho neutro, demonstram uma maior atividade antiproliferativa quando os antitumorais são associados a esta isoflavona.

5.4 Caracterização da morte celular causada pela combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína

A fim de se caracterizar o tipo de morte celular vinculada às combinações da Genisteína com os metabólitos do Tamoxifeno, realizou-se ensaios de citometria de fluxo com marcação de Anexina-V-FITC e Iodeto de propídeo (Figura 12) e expressão de proteínas envolvidas nos processos de apoptose e autofagia por *Western Blot* (Figura 13).

Na linhagem benigna (MCF10A) foi observado que apesar de a Genisteína isolada induzir a apoptose, quando combinada com ambos os metabólitos do Tamoxifeno ($p < 0,0001$), há diminuição significativa da taxa de apoptose ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ para combinação com N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, respectivamente), indicando

mais uma vez um fator protetivo da isoflavona quando combinada aos antitumorais. Em relação às linhagens tumorais de mama, MCF7 e MDAMB231, a combinação com a Genisteína levou a maior quantidade de células em apoptose para ambos metabólitos ($p < 0,01$ para combinações com N-desmetiltamoxifeno em ambas as linhagens e $p < 0,05$ para combinação com 4-hidroxitamoxifeno em MDAMB231), exceto 4-hidroxitamoxifeno em MCF7, onde não houve diferença significativa. Em relação às células em necrose, não houve alterações expressivas mediante os tratamentos combinados, ainda que quando isolada, a Genisteína à $100\mu\text{M}$ tenha induzido necrose em MDAMB231. Interessantemente, é importante ressaltar que a isoflavona gerou perfis de morte diferentes nas duas linhagens tumorais, sendo que na linhagem estrógeno-dependente houve maior indução de apoptose e na estrógeno-independente houve maior indução de necrose, reforçando que a Genisteína atua de formas diferentes nessas duas linhagens.

Quanto à expressão proteica (Figura 13), para MCF7, a combinação da Genisteína com o N-desmetiltamoxifeno gerou aumento do número de células apoptóticas por via intrínseca (mitocondrial), havendo diminuição da proteína antiapoptótica Bcl-2 e diminuição de Pró-caspase 9, não houveram alterações significativas em Bcl-xl ou em Pró-caspase 8. Ainda, houve diminuição da expressão de Beclina-1, enquanto não houve diferença significativa quanto à expressão de LC3A/B. Em relação à linhagem MDAMB231, tal combinação resultou em diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-xl, ao mesmo tempo que diminuiu as expressões de Pró-caspase 8 e 9, indicando que o aumento na apoptose acontece tanto por via extrínseca quanto intrínseca. Ademais, houve um aumento na expressão de Bcl-2, que poderia ser explicado por um mecanismo de compensação. Finalmente, apesar de haver uma diminuição de Beclina-1, observou-se uma diminuição na expressão de LC3B em relação a LC3A em relação ao quimioterápico sozinho, indicando uma diminuição na autofagia.

FIGURA 12. CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR DAS LINHAGENS CELULARES MCF10A, MCF7 E MDAMB231 APÓS TRATAMENTOS COMBINADOS COM A GENISTEÍNA E OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO POR 24H PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO APÓS MARCAÇÃO COM ANEXINA-V-FITC E IODETO DE PROPÍDEO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ** $P < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (RPMI) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; #### $P < 0,0001$ VS. QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO INDICA DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; D: N-DESMETILTAMOXIFENO; H: 4-HIDROXITAMOXIFENO.**

FIGURA 13. CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR NAS LINHAGENS MCF7 E MDAMB231 ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS-CHAVE NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA APOPTOSE E AUTOFAGIA PELO MÉTODO DE *WESTERN BLOT*. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (RPMI) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ### $P < 0,01$; #### $P < 0,001$; ##### $P < 0,0001$ VS. QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). NS: DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; D: N-DESMETILTAMOXIFENO.**

A ocorrência de distúrbios na proliferação celular e na supressão da morte celular são características importantes para a patogênese do câncer, visto que promovem crescimento e proliferação celular desordenados (135). Nesse cenário, a apoptose é um fator limitante para as neoplasias, pois é um mecanismo antineoplásico inato, sendo que vários quimioterápicos tem como alvo a indução dessa via de morte. Assim, o principal mecanismo da apoptose se dá pela ação de genes e proteínas que ativam as Caspases (*cystein-dependent aspartate-specific protease*) (136), apesar de haver mecanismos de morte programada semelhante à apoptose que independem de caspases (137). A ativação das caspases pela apoptose pode ocorrer pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial), sendo que um marcador para a via extrínseca é a Pró-caspase iniciadora 8, a qual resulta na ativação da Pró-caspase efetora 3, que ocasiona a apoptose. Por sua vez, alguns marcadores para a via intrínseca são a Pró-caspase iniciadora 9, que também ativa a Pró-caspase 3, e as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl. É importante ressaltar que a via intrínseca pode ser desencadeada por diferentes tipos de estresses na célula, como a privação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (136). Ainda, o presente estudo abrangeu apenas as caspases iniciadoras, visto que já foi descrito que a linhagem MCF7 é deficiente na Pró-caspase efetora 3, apesar de não perder o seu potencial apoptótico devido a compensação por outras caspases efetoras (138).

A literatura mostra que a indução de apoptose pelo Tamoxifeno ocorre por via intrínseca, com maior ativação de Caspase 9, tanto em MCF7 quanto em MDAMB231 (139). Os resultados aqui apresentados concordam com a literatura, mostrando diminuição de Pró-Caspase 9 para estas linhagens e, ainda, diminuição de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl em MDAMB231, quando as células são tratadas com N-desmetiltamoxifeno. No entanto, curiosamente, foi constatado aumento de Bcl-2 em MCF7, o qual é indicativo do desenvolvimento de mecanismos de resistência ao Tamoxifeno nestas células, como observado anteriormente na linhagem MCF7/HER2 D 16 (140).

Em relação à combinação com a Genisteína com o N-desmetiltamoxifeno, houve maior indução da via intrínseca da apoptose, com menor expressão de Pró-caspase 9 para ambas as linhagens e, ainda, diminuição da superexpressão de Bcl-2 observada em MCF7, sendo que já foi mostrado na mesma linhagem que uma soja biotransformada, com maior quantidade de Genisteína e Daidzeína, induz apoptose através da diminuição de Bcl-2/Bad e Bcl-xl/Bad, isto é, diminuição de proteínas antiapoptóticas e aumento de proteínas pró-apoptóticas da via intrínseca (141). Além disso, a combinação, apesar de diminuir a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-xl em MDAMB231, também aumentou a expressão de Bcl-2. Tal comportamento já foi relatado anteriormente em células HeLa, onde constatou-se a redundância funcional entre as proteínas da família Bcl-2, isto é, Bcl-xl, Bcl-2 e Mcl-1, e

os mecanismos de compensação quando há diminuição de uma ou mais proteínas dessa família, sendo que esses mecanismos podem envolver o sequestro de proteínas pró-apoptóticas como Bak e Bim e a superexpressão de outros membros da família Bcl-2 (142).

A combinação dos agentes também promoveu apoptose pela via extrínseca, ao diminuir a expressão de Pró-caspase 8, mas somente na linhagem MDAMB231, o que corrobora os dados da literatura. Já foi mostrado que a Genisteína induz maior produção gênica de Caspase 8 em MDAMB231, mas não em MCF7 (143), sendo que tal efeito é mediado pela via de sinalização Notch-1 em câncer de cólon (144) e a mesma via já foi mostrada como inibidora de crescimento celular através da diminuição de NFkB e promotora de apoptose em MDAMB231 (145). Ainda, sabe-se que há um relacionamento íntimo entre a Caspase 8 (ativa) e os receptores de androgênio, sendo que esta é capaz de atuar fisicamente no RA, agindo como um cofator negativo, isto é inibindo a transcrição mediada por este receptor (146). A literatura mostra que as células MDAMB231, apesar de não apresentarem níveis significativos de REs, PR ou HER-2, apresentam altos níveis de RAs (147). Assim, o presente trabalho propõe que os efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos aqui observados tanto para Genisteína quanto para o Tamoxifeno na linhagem MDAMB231, e ainda mais com a combinação dos dois agentes, se dão através do antagonismo dos receptores de androgênio, visto que já foi mostrado que o Tamoxifeno e o 4-hidroxitamoxifeno são capazes de se ligar ao RA, ainda que fracamente (148) e que a Genisteína pode atuar como um modulador tecido-específico para os RAs, assumindo uma função bifásica, ora agonista, ora antagonista (149).

A autofagia é um processo responsável por degradar materiais citoplasmáticos, incluindo organelas e proteínas, através da ação de lisossomos. Até o momento, foram descritos 3 tipos de autofagia (macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas), mas a macroautofagia é o processo que está mais intimamente relacionado às vias de sobrevivência e morte celular. Apesar de frequentemente considerada como um mecanismo de sobrevivência celular mediante estresse e falta de nutrientes, estudos apontam que a autofagia pode não só influenciar como promover morte celular, dependendo do tipo e contexto da célula (150), sendo que defeitos nos mecanismos de apoptose e inibidores de Caspase são conhecidos como promotores de autofagia como via de morte celular (151). Assim, alguns marcadores para a via de autofagia são as proteínas Beclina-1, responsável pela agregação das proteínas em uma estrutura pré-autofágica (152), e as LC3-I e LC3-II, responsáveis pela formação do autofagossomo, cujo número é relacionado com a expressão intracelular de LC3-II (151).

A literatura mostra que o Tamoxifeno induz autofagia em MDAMB231, promovendo aumento da expressão de LC3B, diminuição de LC3A e aumento de Beclina-1 (153) e, em MCF7, o 4-hidroxitamoxifeno também promove aumento de LC3B (154), sendo que os

resultados do presente estudo concordam com tais dados, mostrando indução de autofagia quando os metabólitos são utilizados em regime isolado. Quando a Genisteína é combinada com os metabólitos, em ambas as células, há diminuição da indução da autofagia promovida pelo quimioterápico, sendo que tal diminuição pode ser explicada pela forte indução de apoptose com os tratamentos combinados. De fato, estudos mostram que a interação entre as Caspases com proteínas ligadas à autofagia leva à perda da função pró-autofágica das mesmas, sendo que o balanço homeostático tende a favor de um perfil apoptótico. Ainda, já foi mostrado que o aumento de Caspases ativas pode inibir a autofagia, onde as Caspases 8 e 9, especificamente, são capazes de clivar a Beclina-1, consumindo esse fator e inibindo a autofagia, sendo ainda possível que tais Caspases devolvam o fragmento da região C-terminal da Beclina-1 com propriedades pró-apoptóticas (155).

Dependendo dos diferentes estágios de progressão do câncer, a autofagia pode atuar como supressor tumoral (em estágios iniciais de desenvolvimento) ou promover a progressão do tumor (em estágios avançados da tumorigênese) (151). Maiores níveis de expressão de Beclina-1 e LC3 foram encontradas em linhagens tumorais de mama que eram resistentes ao Tamoxifeno, indicando que a autofagia tem um papel importante na resistência adquirida ao tratamento com este SERM. Assim, acredita-se que estratégias terapêuticas que diminuam os níveis de autofagia enquanto promovem a apoptose poderiam ressensibilizar tumores resistentes ao Tamoxifeno, superando a resistência endócrina em carcinomas RE-positivos (156).

Ao contrário do que se pensava, estudos indicam que a necrose também pode ser um tipo de morte celular programada, a qual ativa reguladores gênicos específicos que levam ao rompimento da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo plasmático para o meio extracelular (157), sendo este tipo de necrose chamada de necroptose (158). Assim, este tipo de morte celular é pró-inflamatória e, através do recrutamento de macrófagos e consequente produção de fatores angiogênicos e de crescimento, vem sendo apontada como uma forma de acelerar a tumorigênese (157), além de promover metástase e imunossupressão (158).

Os mecanismos de apoptose e necroptose estão intimamente ligados, sendo que a transição entre as duas vias é dependente da natureza do estímulo, do tipo de célula e da ativação de Caspases (159). Logo, os resultados aqui apresentados mostraram que a Genisteína quando isolada aumenta a taxa de células necróticas na linhagem Triplo negativa, mas quando combinada aos metabólitos do Tamoxifeno, não causa efeitos significativos na taxa de necrose. Uma possível explicação para a ausência de efeito nas combinações é a grande indução da apoptose nesses tratamentos, onde há deslocamento do equilíbrio das vias de morte celular contrariamente à necrose. De fato, há um fino equilíbrio entre a apoptose e a necroptose, sendo que já foi mostrado que diante de

inibidores de pan-caspases, há indução de morte celular por necrose (157, 159) e que a presença, em especial, de Caspase-8 inibe a formação do necrossomo (158).

5.5 Avaliação dos efeitos da combinação dos metabólitos do Tamoxifeno com a Genisteína nas células-tronco tumorais

De modo a se quantificar as células-tronco tumorais da linhagem MDAMB231 frente às combinações da Genisteína com os metabólitos do Tamoxifeno, realizou-se ensaios de citometria de fluxo com marcação de APC-anti-CD44, FITC-anti-CD24 e Iodeto de propídeo (Figura 14).

Assim, os resultados mostraram uma diminuição na população de células-tronco tumorais CD44⁺/CD24⁻ quando tratadas com N-desmetiltamoxifeno ($p < 0,001$) e, diante da combinação com a Genisteína, esse efeito foi revertido ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa em relação ao controle negativo para os tratamentos com a Genisteína isolada ou com 4-hidroxitamoxifeno. Também não houve diferença significativa entre o tratamento com 4-hidroxitamoxifeno isolado e combinado com a Genisteína. Ainda, a combinação da Genisteína com o N-desmetiltamoxifeno diminuiu a quantidade de células não-tronco tumorais não-viáveis ($p < 0,01$) (Figura 14B).

FIGURA 14. AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS (CTTs) NA LINHAGEM MDAMB231 APÓS TRATAMENTOS COMBINADOS COM A GENISTEÍNA E OS METABÓLITOS DO TAMOXIFENO POR 24H PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO APÓS MARCAÇÃO COM APC-ANTI-CD44, FITC-ANTI-CD24 E IODETO DE PROPÍDEO. A: QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS VIÁVEIS; B: QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NÃO TRONCO TUMORAIS NÃO-VIÁVEIS. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. * $P < 0,001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (RPMI) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ## $P < 0,01$ VS. QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO E NS INDICAM DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; D: N-DESMETILTAMOXIFENO; H: 4-HIDROXITAMOXIFENO.**

As primeiras células-tronco tumorais (CTTs) em câncer de mama foram observadas em 2003 por Al-Hajj *et.al*, onde foi identificada e isolada uma subpopulação com capacidade

iniciadora de tumores e com a característica CD44⁺/CD24^{-/low}. Ainda, o mesmo estudo descreveu que tal subpopulação é capaz de gerar uma nova população diversa de células tumorais, contendo células com igual capacidade tumorigênica ou ainda células tumorais, mas não-tumorigênicas (117). Já foi demonstrado que as diferentes linhagens tumorais de mama possuem quantidades diversas de CTTs (160), sendo que um trabalho do nosso grupo de pesquisa mostrou que dentre as linhagens estudadas na presente tese, a que contém maior quantidade de CTTs é a Triplo Negativa MDAMB231 (161).

Assim, os resultados aqui mostrados indicam que o N-desmetiltamoxifeno diminui a subpopulação de CTTs em MDAMB231, o que corrobora nosso estudo anterior (161). Além disso, a combinação com a Genisteína reverteu esse efeito, o que pode ser explicado pela diminuição da autofagia mostrada por tal combinação, constatada na sessão anterior pela diminuição das proteínas pró-autofágicas Beclina-1 e LC3-II. De fato, a morte celular por autofagia vem se mostrando determinante para a diminuição da subpopulação de CTTs frente a agentes antitumorais (161, 162). Um estudo com a ceramida C2, um conhecido promotor de autofagia, mostrou uma notável diminuição na subpopulação de células CD44⁺/CD24^{-/low} em linhagens tumorais de mama (MCF7) e de laringe (Hep-2) (163). Ademais, um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa mostrou que a Bothropstoxina, uma toxina derivada do veneno da cobra *Bothrops jararacussu*, é capaz de induzir autofagia e diminuir a população de CTTs na linhagem MDAMB231 (161). Logo, a influência da combinação da Genisteína com os metabólitos do Tamoxifeno nas CTTs sugere que esta terapia não seria eficaz em recidivas da doença.

PARTE II – GENISTEÍNA E OS INIBIDORES DA AROMATASE

5.6 Ensaios preliminares: Determinação das doses de trabalho

As doses de trabalho para este estudo foram determinadas através de ensaios preliminares de viabilidade celular por MTT, de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Bioquímica da Universidade do Porto. Assim, para a Genisteína, foram determinadas duas doses de trabalho, desde que a maior dose não provocasse efeito nas células benignas, ou seja, não diminuísse significativamente a viabilidade das células HFF1 ($p > 0,01$) (Figura 15). Logo, as doses definidas para os ensaios seguintes de combinação farmacológica foram 1 e 10 μ M para a linhagem MCF7aro. Além disso, os resultados mostraram que a Genisteína não causava efeito desejável, isto é, diminuição de viabilidade nas células LTEDaro, logo os ensaios com tal linhagem foram descontinuados. Ainda, as doses de trabalho para os inibidores da aromatase foram estabelecidas de acordo com a rotina do laboratório em doses experimentais de 1, 5 e 10 μ M.

FIGURA 15. VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS DE MAMA RESISTENTES (MCF7ARO E LTEDARO) E LINHAGEM DE FIBROBLASTOS (HFF1) (CONTROLE) FRENTE AO TRATAMENTO COM GENISTEÍNA POR 72h, QUANTIFICADA VIA ENSAIO DE MTT. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. * $P < 0,01$ VS. O CONTROLE NEGATIVO (0) (ANOVA COMBINADA COM PÓS-TESTE DE DUNNETT).

A linhagem MCF7aro é derivada da linhagem tumoral de mama do tipo Luminal MCF7 geneticamente modificada através da transfecção estável com o gene responsável pela transcrição da enzima aromatase, originado de tecido placentário humano, mimetizando uma via conhecida de resistência tumoral adquirida devido a ablação de estrogênio endógeno por antagonistas ou infrarreguladores do receptor de estrogênio, a exemplo, após tratamento prolongado com o Tamoxifeno (58). Por sua vez, a linhagem LTEDaro corresponde às células MCF7aro após um longo período de privação de estrogênio, tornando o seu crescimento independente deste hormônio (164), cenário este que mimetiza o microambiente tumoral após tratamento prolongado com os próprios inibidores de aromatase (IAs) (78). Em conjunto, essas duas linhagens vêm sendo usadas efetivamente para o estudo *in vitro* da resistência dos tumores mamários à terapia convencional (165). Assim, nossos resultados corroboram a literatura que já mostrou a diminuição da viabilidade das células MCF7aro frente ao tratamento com Genisteína a 10 μ M, mas não com 1 μ M (166). Até o momento não havia relatos dos efeitos deste fitoestrógeno frente às LTEDaro e a ausência de efeito significativo ressalta a importância do status hormonal no microambiente tumoral para que o tratamento com a isoflavona seja eficaz.

5.7 Análise da combinação dos inibidores da aromatase com a Genisteína na viabilidade celular da linhagem MCF7aro e caracterização farmacológica

Os resultados da viabilidade celular das combinações da isoflavona com os inibidores da aromatase em regime simultâneo de tratamento na linhagem MCF7aro foram apresentados na Figura 16. Assim, observou-se que apenas as combinações da Genisteína

a 1 μ M com o Exemestano provocaram menor viabilidade celular em relação ao quimioterápico sozinho ($p<0,0001$ para combinação com todas as concentrações de Exemestano). Ainda, tal efeito foi revertido com as combinações do Exemestano com a Genisteína a 10 μ M, aumentando a viabilidade das células nas combinações com Exemestano a 5 e 10 μ M ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente). Finalmente, as combinações da isoflavona com ambos Anastrozol e Letrozol apresentaram perfil semelhante de viabilidade celular, em que as combinações com o fitoestrógeno a 1 ou 10 μ M provocaram aumento de viabilidade (no mínimo $p<0,05$ para todas as combinações), impedindo, ainda, o efeito dos próprios IAs. Logo, diante de tais resultados, apenas os ensaios com o Exemestano foram continuados.

FIGURA 16. VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM MCF7ARO APÓS TRATAMENTOS COMBINADOS COM A GENISTEÍNA E OS INIBIDORES DA AROMATASE EXEMESTANO, ANASTROZOL E LETROZOL POR 72H. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPPLICATA. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; ** $P<0,0001$ VS. QUIMIOTERÁPICO CORRESPONDENTE EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO INDICA DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA.**

Em relação ao estudo da associação farmacológica, o método de Chou-Talalay prevê que para que haja tal determinação cada fármaco deve possuir efeito significativo separadamente (112), assim, como foi mostrado que a Genisteína a 1 μ M não possui diferença estatística em relação ao controle (Figura 15), os efeitos da combinação da

isoflavona nesta concentração com o Exemestano foram expressos na forma de potencialização (Tabela 8).

TABELA 8. POTENCIALIZAÇÃO DOS EFEITOS DO EXEMESTANO NA DIMINUIÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE MCF7ARO FRENTE À COMBINAÇÃO COM A GENISTEÍNA A 1 μ M.

Linhagem celular MCF7aro	Quimioterápico (%)*	Combinação com Genisteína a 1μM (%)*	Potencialização (%)
Exemestano a 1μM	101,41 $\pm$ 1,17	86,54 $\pm$ 1,96	14,66
Exemestano a 5μM	91,64 $\pm$ 1,92	70,49 $\pm$ 1,31	23,08
Exemestano a 10μM	89,48 $\pm$ 1.09	75,00 $\pm$ 1,84	16,18

*: OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA $\pm$ SEM DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES DA QUANTIFICAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT.

A linhagem LTEDaro é resistente aos efeitos promovidos pelo Exemestano, Anastrozol e Letrozol, enquanto que a linhagem MCF7aro é sensível aos mesmos (164). Os resultados aqui apresentados sugerem que a Genisteína combinada em doses baixas ao Exemestano pode melhorar a eficácia deste inibidor da aromatase, mas não do Anastrozol ou do Letrozol em células MCF7aro. De fato, a inibição dos efeitos do Letrozol quando na presença de concentrações dietéticas de Genisteína já foi mostrado em um modelo xenográfico de células estrogênio-dependentes MCF7Ca, que superexpressam aromatase (167). Até o momento, a literatura não mostra estudos com a combinação da Genisteína com Anastrozol ou Exemestano. Ainda, uma possível explicação para a diferença observada nos efeitos dos inibidores da aromatase mediante co-tratamento com a Genisteína é a natureza dos mesmos: sendo o Anastrozol e o Letrozol ambos não-esteroidais (10), a Genisteína poderia competir com tais compostos no sítio de ligação da aromatase, impedindo as suas atividades, enquanto que o Exemestano, por ser de natureza esteroide e formar uma ligação covalente com a aromatase (60), apenas é deslocado pela Genisteína na dose de 10 μ M.

5.8 Avaliação da combinação do Exemestano com a Genisteína no Ciclo Celular da linhagem MCF7aro

Sabendo que a combinação do Exemestano com a Genisteína a 1 μ M foi benéfica para a linhagem MCF7aro, foi avaliado se tal combinação interferia no ciclo celular dessas células, e ainda, como não havia dados na literatura, estudou-se também o efeito da Genisteína isolada (Figura 17). Assim, os resultados mostraram que a Genisteína em tratamento isolado provoca uma retenção do ciclo celular em G2/M ($p < 0,05$), com diminuição da fase S ($p < 0,001$) e de forma dose-dependente, levando, por fim, a uma redução da fase G0/G1 na dose mais alta testada ($p < 0,01$). O tratamento com o Exemestano revelou aumento da fase G0/G1 ($p < 0,001$), enquanto diminuía ambas as fases

S ($p<0,0001$) e G2/M ($p<0,001$). Finalmente, quando combinada com o Exemestano, a Genisteína provocou diminuição ainda maior da fase S ($p<0,05$), o que indica potencialização do efeito antiproliferativo. Ainda, tal combinação manteve o perfil de G0/G1 e G2/M encontrados no tratamento com o quimioterápico sozinho.

FIGURA 17. AVALIAÇÃO DAS FASES DO CICLO CELULAR NA LINHAGEM MCF7ARO APÓS TRATAMENTOS ISOLADO E COMBINADO DA GENISTEÍNA COM O EXEMESTANO POR 72H PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO APÓS MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDEO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. * $P<0,05$; * $P<0,001$; **** $P<0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (MEM + T) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). # $P<0,05$ VS. EXEMESTANO EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). NS INDICA DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; EXE: EXEMESTANO.**

Tendo em vista os resultados encontrados na citometria, a expressão da Ciclina E foi estudada (Figura 18). Assim, foi observado que o Exemestano diminui a expressão da Ciclina E em relação ao controle negativo ($p<0,0001$) e que, mediante combinação com a Genisteína, o tratamento provoca ainda menor expressão de Ciclina E ($p<0,01$) em células MCF7aro.

FIGURA 18. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE CICLINA E NA LINHAGEM MCF7ARO APÓS TRATAMENTOS ISOLADO E COMBINADO DA GENISTEÍNA COM EXEMESTANO POR 72H, ATRAVÉS DE METODOLOGIA WESTERN BLOT. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES. ** $p < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (MEM + T) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ## $p < 0,01$ VS. EXEMESTANO EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). A AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO INDICA DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; EXE: EXEMESTANO.**

Apesar de não haver dados na literatura dos efeitos da Genisteína na linhagem MCF7aro, a retenção das células na fase G2/M é bem característica da ação dessa isoflavona nas células tumorais de mama, como discutido anteriormente no item 5.3 deste trabalho, marcando uma atividade antiproliferativa e possivelmente pró-apoptótica. Ainda, o perfil de ciclo celular aqui apresentado para o Exemestano já foi encontrado anteriormente por Amaral *et. al* (2012) (61). Assim, a combinação com a Genisteína aumentou ainda mais a atividade antiproliferativa do Exemestano ao diminuir a quantidade de células na fase S. De fato, a diminuição da expressão da Ciclina E com o tratamento combinado indica a incapacidade de transição entre as fases G0/G1 e S das células tumorais, visto que tal progressão é finamente controlada por altas expressões desta Ciclina. Além disso, estudos anteriores mostraram que altos níveis de Ciclina E indicam um pior prognóstico para pacientes com câncer de mama, levando a uma menor sobrevida em 5 anos (168), sendo a sua diminuição um efeito desejável a uma terapia antitumoral.

5.9 Caracterização da morte celular causada pela combinação do Exemestano com a Genisteína na linhagem MCF7aro

De modo a se caracterizar a morte celular causada pelos tratamentos na linhagem MCF7aro, as análises da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Figura 19A) e

da expressão das proteínas PARP e Pró-caspase 7 (Figura 19B) foram realizados. Assim, primeiramente em relação à atividade da enzima lactato desidrogenase, não foi observado aumento na atividade da enzima em nenhum dos tratamentos, indicando que a diminuição da viabilidade constatada até o momento não é proveniente da via de morte celular por necrose nem para a Genisteína isolada nem para a sua combinação com o Exemestano. Ainda, a quantificação da expressão da proteína PARP revelou que há diminuição de PARP total e aumento de PARP clivada mediante tratamento com a Genisteína isoladamente de forma dose dependente ($p < 0,05$ para Genisteína a $1\mu\text{M}$ e $p < 0,01$ para Genisteína a $10\mu\text{M}$) e, quando associada ao Exemestano, há aumento da relação PARP clivada/ PARP total em relação ao quimioterápico isoladamente ($p < 0,05$), indicando maior indução de apoptose. Além disso, apesar de haver diminuição de Pró-caspase 7 para os tratamentos com Genisteína isolada ($p < 0,001$), quando combinada ao Exemestano, a isoflavona não altera os níveis de expressão desta proteína.

FIGURA 19. CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR DA LINHAGEM MCF7ARO APÓS TRATAMENTOS ISOLADO E COMBINADO DA GENISTEÍNA COM O EXEMESTANO POR 72H. A: QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) POR MÉTODO COLORIMÉTRICO. B: EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PARP E PRÓ-CASPASE 7 PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ vs. CONTROLE NEGATIVO (MEM + T) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). # $P < 0,05$ vs. EXEMESTANO EM TRATAMENTO ISOLADO (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). A AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO E NS INDICAM DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; EXE: EXEMESTANO.**

A quantificação da atividade da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) vem se mostrando uma forma eficaz, simples e linear de dimensionar a morte celular por necrose, apesar de não distinguir entre necrose primária e secundária (resultante da apoptose em microambientes artificiais *in vitro* pela ausência de integrantes imunológicos) (115). A função da necrose frente aos carcinomas ainda é pouco entendida, mas estudos

mostram que, como discutido neste trabalho no item 5.4, este tipo de morte celular é capaz de recrutar células imunes e pró-inflamatórias que induzem angiogênese, proliferação e invasão, conferindo capacidade tumorigênica e de invasibilidade às células tumorais (169). Desse modo, nem a Genisteína isolada, nem a sua combinação com o Exemestano foram capazes de aumentar a atividade de LDH, indicando a ausência de morte celular via necrose.

Como também discutido anteriormente no presente trabalho, as Caspases estão diretamente relacionadas à via de morte celular por apoptose, sendo produzidas na forma de zimogênios (Pró-caspases) que, mediante clivagem, tornam-se ativas (136). Assim sendo, tendo em vista que a linhagem MCF7 não possui Caspase 3 (138), uma outra forma de estudar os mecanismos da apoptose, além das Caspases iniciadoras abordadas no item 5.4, é a expressão da Caspase efetora 7. Além disso, após ativação das Caspases, há clivagem de proteínas-chave para o funcionamento celular e sobrevivência, sendo a poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) uma dessas proteínas. Logo, a clivagem de PARP é considerada um marcador para morte celular via apoptose (170). Desse modo, os resultados aqui apresentados mostraram que tanto a Genisteína isolada quanto a sua combinação com o Exemestano aumentam a expressão de PARP clivada, mas a combinação não altera os níveis de Pró-caspase 7 em relação ao quimioterápico sozinho. Uma possível explicação para esses efeitos seriam a de que a combinação com a Genisteína a 1 μ M aumenta os níveis de apoptose provocados pelo Exemestano, mas não por se tratar de uma combinação pró-apoptótica, mas sim por causar retenção do ciclo celular, como mostrado no item 5.8. Assim, ao impedir a transição das fases do ciclo, nomeadamente chamado de efeito antiproliferativo, a célula entra em morte por apoptose. De fato, estudos mostram que diante de um estímulo específico, como dano ao DNA, hipóxia ou tratamento com certos quimioterápicos, pode haver ativação do gene p53, um supressor tumoral, o qual leva a uma superexpressão do gene p21 e consequente retenção no ciclo celular por inibição de ciclinas, resultando na não-transição entre as fases G1 e S. Finalmente, diante da ativação do p53, há inibição da proteína do retinoblastoma (pRb), a qual resulta em sinalização pró-apoptótica (171).

5.10 Análise dos possíveis mecanismos de ação da Genisteína isolada e da sua combinação com o Exemestano na linhagem MCF7aro

A fim de melhor entender os possíveis mecanismos de ação da Genisteína isolada e da sua combinação com o Exemestano na linhagem MCF7aro, estudos de expressão proteica para os principais alvos nessas células, isto é, a aromatase (Figura 20) e os receptores hormonais (Figuras 21 e 22), foram realizados.

Assim, os resultados mostram que diante do produto da aromatase, a Genisteína perde significativamente a capacidade de diminuir a viabilidade das células MCF7aro a partir da dose de 5 μ M ($p < 0,05$) (Figura 20A). Ainda, a expressão proteica da aromatase revelou que a Genisteína é capaz de diminuir a expressão desta importante enzima na dose de 10 μ M ($p < 0,001$), mas não na de 1 μ M ($p > 0,05$) (Figura 20B), concordando com os resultados de viabilidade celular. Ainda, a combinação da Genisteína a 1 μ M com o Exemestano não mostrou diferença significativa quando comparada ao quimioterápico sozinho ($p > 0,05$).

FIGURA 20. EFEITOS DA GENISTEÍNA E DE SUA COMBINAÇÃO COM O EXEMESTANO NA ENZIMA AROMATASE DA LINHAGEM MCF7ARO. A: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DO TRATAMENTO COM GENISTEÍNA EM MEIO DE CULTURA (MEM + T) VS. MEIO DE CULTURA COM O INIBIDOR DA ATIVIDADE DE AROMATASE, O ESTRADIOL (MEM + E₂), QUANTIFICADA ATRAVÉS DE MTT, APÓS TRATAMENTOS DE 72H. B: EXPRESSÃO DA ENZIMA AROMATASE PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT, APÓS TRATAMENTOS DE 8H. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (MEM + T) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). A AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO E NS INDICAM DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; EXE: EXEMESTANO; T: TESTOSTERONA; E₂: ESTRADIOL; MIC: MICROSSOMAS DE PLACENTA (CONTROLE POSITIVO PARA EXPRESSÃO DE AROMATASE).**

A superexpressão de aromatase é uma via conhecida de resistência tumoral adquirida devido a ablação de estrogênio endógeno por antagonistas ou infrarreguladores do receptor de estrogênio, sendo uma forma de converter androgênios em estrogênios e biodisponibilizar novamente este hormônio atuante na proliferação dos tumores mamários (58). Assim, agentes inibidores da aromatase se tornam uma alternativa terapêutica interessante para tumores mamários RE-positivos que se tornaram resistentes à terapia primária (78). Desse modo, os resultados aqui apresentados mostraram que a Genisteína atua na aromatase de forma a diminuir a sua expressão, o que corrobora estudos anteriores que mostraram que a Genisteína diminui a atividade da aromatase em microsomas placentários humanos (166). No entanto, a ausência de efeito com a combinação da Genisteína a 1 μ M com o Exemestano leva a crer que esta não é a via pela qual a isoflavona potencia os efeitos deste inibidor da aromatase. Ainda, esses resultados reforçam a hipótese colocada no item 5.7 de competição da dose $\geq 10\mu$ M da Genisteína com os IAs Exemestano, Anastrozol e Letrozol, visto que, nessas doses, a isoflavona atua diretamente no mesmo alvo que os IAs.

Em relação ao efeito da Genisteína nos receptores hormonais, os resultados mostraram que diante do inibidor do RE α , o ICI 182,780, a Genisteína perde grandemente a capacidade de diminuir a viabilidade das células MCF7aro a partir da dose de 5 μ M ($p < 0,0001$) (Figura 21A). Ainda, a expressão proteica do RE α revelou que a Genisteína é capaz de diminuir a sua expressão, mesmo na menor dose testada ($p < 0,01$ para a dose de 1 μ M) (Figura 21B). Além disso, os resultados diante do inibidor do RE β , o PHTPP, mostraram que a atividade da Genisteína nas MCF7aro também é dependente deste receptor, visto que a isoflavona perdia a capacidade de diminuir a viabilidade celular tumoral em doses iguais ou superiores a 5 μ M ($p < 0,001$), diante da presença de tal inibidor (Figura 21C), sendo que a expressão proteica do RE β revelou que a Genisteína é capaz de aumentar a sua expressão em doses iguais ou superiores a 10 μ M ($p < 0,01$) (Figura 21B). Finalmente, foi observado que diante do inibidor do RA, o Casodex, a Genisteína também perdeu a capacidade de diminuir a viabilidade das células MCF7aro a partir da dose de 5 μ M ($p < 0,0001$) (Figura 22A) e que a expressão desse receptor é aumentada significativamente pela isoflavona em doses iguais ou superiores a 10 μ M ($p < 0,01$) (Figura 22B). Apesar disso, a combinação da Genisteína a 1 μ M com o Exemestano não mostrou diferença significativa na expressão de nenhum dos receptores hormonais testados, quando comparada ao quimioterápico sozinho ($p > 0,05$).

FIGURA 21. EFEITOS DA GENISTEÍNA E DE SUA COMBINAÇÃO COM O EXEMESTANO NOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO DA LINHAGEM MCF7ARO, APÓS TRATAMENTOS DE 72H. A, B: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DO TRATAMENTO COM GENISTEÍNA EM MEIO DE CULTURA (MEM + T) VS. MEIO DE CULTURA COM O INIBIDOR DE RECEPTORES DE ESTROGÊNIO ALFA (ICI) OU BETA (PHTPP), QUANTIFICADA ATRAVÉS DE MTT. C, D: EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO ALFA E BETA PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (MEM + T) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). A AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO E NS INDICAM DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; EXE: EXEMESTANO; T: TESTOSTERONA; ICI: ICI 182,780; PHTPP: 4- [2-FENIL-5,7-BIS(TRIFLUOROMETIL) PIRAZOLO [1,5-A] PIRIMIDIN-3-IL] FENOL.**

FIGURA 22. EFEITOS DA GENISTEÍNA E DE SUA COMBINAÇÃO COM O EXEMESTANO NO RECEPTOR DE ANDROGÊNIO DA LINHAGEM MCF7ARO, APÓS TRATAMENTOS DE 72H. A: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DO TRATAMENTO COM GENISTEÍNA EM MEIO DE CULTURA (MEM + T) VS. MEIO DE CULTURA COM O INIBIDOR DE RECEPTOR DE ANDROGÊNIO (CDX), QUANTIFICADA ATRAVÉS DE MTT. B: EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIO PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO (SEM) DE PELO MENOS 3 ENSAIOS INDEPENDENTES. ** $P < 0,01$; ** $P < 0,0001$ VS. CONTROLE NEGATIVO (MEM + T) (DE ACORDO COM ANOVA E PÓS-TESTE DE BONFERRONI). A AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO E NS INDICAM DIFERENÇA NÃO-SIGNIFICATIVA. G: GENISTEÍNA; EXE: EXEMESTANO; T: TESTOSTERONA; CDX: CASODEX.**

A Genisteína vem se mostrando um composto multialvo para atividade anticarcinogênica, podendo atuar nos receptores de estrogênio α e β e no receptor de androgênio (172). Apesar de estudos mostrarem que a Genisteína liga-se com 87% de afinidade ao RE β e somente 4% ao RE α , comparativamente ao estradiol (172), foi observado neste trabalho que ambos receptores contribuem para a atividade antitumoral da isoflavona em células MCF7aro, havendo antagonismo do RE α e agonismo do RE β , o que se mostra promissor para o tratamento anticarcinogênico (23). Ainda, o aumento da expressão dos RAs encontrado neste trabalho pode ser justificado como uma compensação

hormonal pela supressão do $RE\alpha$, sendo que estudos anteriores já mostraram em MCF7 que superexpressam aromatase e AR que a superexpressão de AR é um mecanismo de escape para sobrevivência (173).

Ademais, a expressão dos receptores hormonais aqui estudados não foram alteradas quando a Genisteína foi combinada ao Exemestano, o que mostra mais uma evidência para a hipótese considerada no item 5.9 de que a Genisteína contribui para o tratamento do quimioterápico adicionando uma atividade mais antiproliferativa, com retenção do ciclo celular, do que propriamente pró-apoptótica.

Conclusões

A Genisteína, fitoestrógeno encontrado na soja, vem mostrando atividade antitumoral *in vitro* em vários tipos de carcinoma. No presente trabalho, esta isoflavona foi associada às abordagens terapêuticas mais frequentes no Brasil, mostrando efeitos benéficos para dois tipos tumorais dentre os estudados (Luminal e Triplo Negativo). Neste trabalho a Genisteína mostrou atividade antitumoral sinérgica aos metabólitos do Tamoxifeno, corroborando a literatura, e potencializou os efeitos do Exemestano. Assim, houve indução de vias da apoptose, inibição da via da autofagia, e, conseqüentemente, um aumento nas células-tronco tumorais da linhagem Triplo Negativa. Ainda, a combinação com a Genisteína permitiu a maior retenção do ciclo celular nas células tumorais, quando associada tanto aos metabólitos do Tamoxifeno quanto ao Exemestano. Logo, os resultados aqui apresentados mostram que a Genisteína é capaz de atuar como um adjuvante na terapia antitumoral para casos específicos, tais como tumores Luminais comuns e que superexpressam a aromatase, e em tumores Triplo Negativos como tratamento inicial, apesar de não ser recomendada para tumores que superexpressam HER-2 ou em casos de tumores refratários ao tratamento com os inibidores da aromatase.

Referências Bibliográficas

1. IARC. GLOBOCAN 2018 2018 [Available from: <http://gco.iarc.fr/>].
2. INCA INdCJAGdS-. ESTIMATIVA 2020 Incidência de Câncer no Brasil. 2020.
3. INCA. ESTIMATIVA 2014 Incidência de Câncer no Brasil. 2014.
4. Soares LR, Gonzaga CM, Branquinho LW, Sousa AL, Souza MR, Freitas-Junior R. Mortalidade por câncer de mama feminino no Brasil de acordo com a cor. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015;37(8):388-92.
5. McNamara KM, Guestini F, Sakurai M, Kikuchi K, Sasano H. How far have we come in terms of estrogens in breast cancer? [Review]. *Endocr J*. 2016;63(5):413-24.
6. Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin*. 2017;7:64-77.
7. Rezende JMd. Dos quatro humores às quatro bases. À sombra do plátano: crônicas de história da medicina. São Paulo: Editora Unifesp; 2009. p. 49-53.
8. Franco G. Bernardino Ramazzini and women workers' health in the second half of the XVIIth century. *J Public Health (Oxf)*. 2012;34(2):305-8.
9. Love RR, Philips J. Oophorectomy for breast cancer: history revisited. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(19):1433-4.
10. INCA. Saad E, Bromberg S, Katz A, Simon S. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. 2019.
11. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281-94.
12. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31.
13. Bartis D, Mise N, Mahida RY, Eickelberg O, Thickett DR. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*. 2014;69(8):760-5.
14. Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular oncology*. 2013;7.
15. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*. 2017;8(16):3131-41.
16. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;83(3):249-89.
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Celula* - 5.ed: Artmed Editora; 2009.
18. INCA. Eisenberg ALAK, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Revista Brasileira de Cancerologia* 2001;47(4):377-88.
19. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;389(1-2):71-83.
20. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal research reviews*. 2008;28(6):954-74.
21. Chuffa LG, Lupi-Junior LA, Costa AB, Amorim JP, Seiva FR. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids*. 2017;118:93-108.
22. Thomas C, Gustafsson J-Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(8):597-608.
23. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ERα) and beta (ERβ): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. 2014;90:13-29.
24. Liang J, Shang Y. Estrogen and Cancer. *Annual Review of Physiology*. 2013;75(1):225-40.
25. Yager JD. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention--A review. *Steroids*. 2015;99(Pt A):56-60.
26. van Marcke C, De Leener A, Berlière M, Vikkula M, Duhoux FP. Routine use of gene panel testing in hereditary breast cancer should be performed with caution. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016;108:33-9.

27. Duffy MJ. Estrogen receptors: role in breast cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2006;43(4):325-47.
28. Zilli M, Grassadonia A, Tinari N, Di Giacobbe A, Gildetti S, Giampietro J, et al. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1795(1):62-81.
29. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2011;6(3):359-69.
30. Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids*. 2008;73(9-10):922-8.
31. Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ. Progesterone and breast cancer. *Endocrine reviews*. 2019.
32. Lange CA, Yee D. Progesterone and breast cancer. *Womens Health (Lond)*. 2008;4(2):151-62.
33. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*. 2002;4(5):197-201.
34. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *The Lancet*. 2017;389(10087):2415-29.
35. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*. 2012;2012:743193-.
36. Goel S, Wang Q, Watt AC, Tolaney SM, Dillon DA, Li W, et al. Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer Cell*. 2016;29(3):255-69.
37. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):719-26.
38. Engel RH, Kaklamani VG. HER2-Positive Breast Cancer. *Drugs*. 2007;67(9):1329-41.
39. Wu Y, Shang X, Sarkissyan M, Slamon D, Vadgama JV. FOXO1A Is a Target for HER2-Overexpressing Breast Tumors. *Cancer Research*. 2010;70(13):5475.
40. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(7):440-6.
41. Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology*. 2017;49(2):166-71.
42. Mannell A. The role of Ki-67 in breast cancer %J South African Journal of Surgery. 2016;54:10-3.
43. Niazi MKK, Senaras C, Pennell M, Arole V, Tozbikian G, Gurcan MN. Relationship between the Ki67 index and its area based approximation in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):867.
44. Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG, et al. Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget*. 2016;7(5):6281-93.
45. SAÚDE MD. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. In: SAÚDE SDAÀ, SECRETARIA DE CIÊNCIA TEIE, editors. PORTARIA CONJUNTA Nº 04, DE 23 DE JANEIRO DE 2018. p. 38.
46. Rastelli F, Crispino S. Factors Predictive of Response to Hormone Therapy in Breast Cancer. *Tumori Journal*. 2008;94(3):370-83.
47. Mastologia SBd. Câncer de Mama - Consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia - Regional Piauí - 2017: Edufpi; 2017.
48. Mandlekar S, Kong ANT. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2001;6(6):469-77.
49. Sporn MB LS. Agents for Chemoprevention and Their Mechanism of Action.: In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine.*; 2003 [6th edition]. :[Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12522/>].
50. Coward P, Lee D, Hull MV, Lehmann JM. 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8880-4.

51. Martinez de Duenas E, Ochoa Aranda E, Blancas Lopez-Barajas I, Ferrer Magdalena T, Bandres Moya F, Chicharro Garcia LM, et al. Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Breast*. 2014;23(4):400-6.
52. Dicksen K, Willmann S, Thelen K, Lippert J, Hempel G, Eissing T. Physiologically-based pharmacokinetic modeling of tamoxifen and its metabolites in women of different CYP2D6 phenotypes provides new insight into the tamoxifen mass balance. 2012;3(92).
53. de Vries Schultink AHM, Alexi X, van Werkhoven E, Madlensky L, Natarajan L, Flatt SW, et al. An Antiestrogenic Activity Score for tamoxifen and its metabolites is associated with breast cancer outcome. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2017;161(3):567-74.
54. Helland T, Gjerde J, Dankel S, Fenne IS, Skartveit L, Drangevag A, et al. The active tamoxifen metabolite endoxifen (4OHNDtam) strongly down-regulates cytokeratin 6 (CK6) in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122339.
55. Cronin-Fenton DP, Damkier P, Lash TL. Metabolism and transport of tamoxifen in relation to its effectiveness: new perspectives on an ongoing controversy. *Future Oncol*. 2014;10(1):107-22.
56. Chan HJ, Petrossian K, Chen S. Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and -resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;161:73-83.
57. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;125(1-2):13-22.
58. Goss PE, Strasser K. Tamoxifen resistant and refractory breast cancer: the value of aromatase inhibitors. *Drugs*. 2002;62(6):957-66.
59. Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett*. 2007;256(1):1-24.
60. Kelly CM, Buzdar AU. Anastrozole. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2010;9(6):995-1003.
61. Amaral C, Borges M, Melo S, da Silva ET, Correia-da-Silva G, Teixeira N. Apoptosis and autophagy in breast cancer cells following exemestane treatment. *PLoS One*. 2012;7(8):e42398.
62. Macedo LF, Guo Z, Tilghman SL, Sabnis GJ, Qiu Y, Brodie A. Role of Androgens on MCF-7 Breast Cancer Cell Growth and on the Inhibitory Effect of Letrozole. *Cancer Research*. 2006;66(15):7775.
63. Gao L, Bao Z, Deng H, Li X, Li J, Rong Z, et al. The beneficial androgenic action of steroidal aromatase inactivators in estrogen-dependent breast cancer after failure of nonsteroidal drugs. *Cell Death & Disease*. 2019;10(7):494.
64. Nathan MR, Schmid P. A Review of Fulvestrant in Breast Cancer. *Oncology and therapy*. 2017;5(1):17-29.
65. Rocca A, Maltoni R, Bravaccini S, Donati C, Andreis D. Clinical utility of fulvestrant in the treatment of breast cancer: a report on the emerging clinical evidence. *Cancer Manag Res*. 2018;10:3083-99.
66. Mello CA, Chinen LT, da Silva SC, do Nascimento Matias C, Benevides CF, Gimenes DL, et al. Prolonged time to progression with fulvestrant for metastatic breast cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2011;28(2):416-9.
67. McKeage K, Curran MP, Plosker GL. Fulvestrant: a review of its use in hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women with disease progression following antiestrogen therapy. *Drugs*. 2004;64(6):633-48.
68. Balducci L. CHAPTER 45 - Cancer. In: Ham RJ, Sloane PD, Warshaw GA, Bernard MA, Flaherty E, editors. *Primary Care Geriatrics (Fifth Edition)*. Philadelphia: Mosby; 2007. p. 533-45.
69. Lyseng-Williamson KA, Fenton C. Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs*. 2005;65(17):2513-31.
70. Figgitt DP, Wiseman LR. Docetaxel: an update of its use in advanced breast cancer. *Drugs*. 2000;59(3):621-51.
71. A. AS. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. . *Biomed Pharmacol J*. 2019;12(1).

72. Ponce-Cusi R, Calaf GM. Apoptotic activity of 5-fluorouracil in breast cancer cells transformed by low doses of ionizing alpha-particle radiation. *International journal of oncology*. 2016;48(2):774-82.
73. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2009;6(11):638-47.
74. Jordan VC. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*. 2007;72(13):829-42.
75. Fan W, Chang J, Fu P. Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Med Chem*. 2015;7(12):1511-9.
76. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)*. 2012;20(3):256-67.
77. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J-Å, Nilsson S. Differential Response of Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β to Partial Estrogen Agonists/Antagonists. 1998;54(1):105-12.
78. Augusto TV, Correia-da-Silva G, Rodrigues CMP, Teixeira N, Amaral C. Acquired resistance to aromatase inhibitors: where we stand! *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(5):R283-R301.
79. Amaral C, Augusto TV, Almada M, Cunha SC, Correia-da-Silva G, Teixeira N. The potential clinical benefit of targeting androgen receptor (AR) in estrogen-receptor positive breast cancer cells treated with Exemestane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(5):165661.
80. Kaminska KK, Akrap N, Staaf J, Borg Å, Bosch A, Honeth G. Abstract 5907: Fulvestrant resistance in estrogen receptor positive breast cancer models is driven by heterogeneous ER independent transcriptional programs [abstract]. In: *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018*. *Cancer Research*. 2018;78(13 Supplement):5907.
81. Huang D, Tang L, Yang F, Jin J, Guan X. PIK3CA mutations contribute to fulvestrant resistance in ER-positive breast cancer. *Am J Transl Res*. 2019;11(9):6055-65.
82. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(24):7479-91.
83. Pinho MdSL. Célula tronco tumoral: novo conceito em carcinogênese colorretal %J *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2009;29:120-4.
84. Bhojwani J. Understanding the Cancer Stem Cell Mechanistic in Model-Systems. *Journal of Stem Cell and Regenerative Biology*. 2015;1:1-3.
85. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(10):727-38.
86. Weinberg DHRA. Biological Hallmarks of Cancer. In *Holland-Frei Cancer Medicine* (eds RC Bast, WN Hait, DW Kufe, RR Weichselbaum, JF Holland, CM Croce, M Piccart-Gebart, H Wang, WK Hong and RE Pollock)2017. p. 1-10.
87. Mehta RS, Barlow WE, Albain KS, Vandenberg TA, Dakhil SR, Tirumali NR, et al. Overall Survival with Fulvestrant plus Anastrozole in Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(13):1226-34.
88. Lin S-X, Chen J, Mazumdar M, Poirier D, Wang C, Azzi A, et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010;6(9):485-93.
89. Sirotkin AV, Harrath AH. Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol*. 2014;741:230-6.
90. Hwang KA, Choi KC. Anticarcinogenic Effects of Dietary Phytoestrogens and Their Chemopreventive Mechanisms. *Nutr Cancer*. 2015;67(5):796-803.
91. Dean M, Murphy BT, Burdette JE. Phytosteroids beyond estrogens: Regulators of reproductive and endocrine function in natural products. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;442:98-105.
92. Basu P, Maier C. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;107:1648-66.
93. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(6):493-506.

94. Halicka HD, Zhao H, Li J, Lee YS, Hsieh TC, Wu JM, et al. Potential anti-aging agents suppress the level of constitutive mTOR- and DNA damage- signaling. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(12):952-65.
95. Chin YT, Hsieh MT, Yang SH, Tsai PW, Wang SH, Wang CC, et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. *Oncotarget*. 2014;5(24):12891-907.
96. Fu Y, Chang H, Peng X, Bai Q, Yi L, Zhou Y, et al. Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway. *PLoS One*. 2014;9(7):e102535.
97. Delmas D, Solary E, Latruffe N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(8):1100-21.
98. Rai G, Mishra S, Suman S, Shukla Y. Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin in vitro and in vivo models: A mechanistic insight. *Phytomedicine*. 2016;23(3):233-42.
99. Cunha D, Viana J, Silva W, Silva J. SOJA PARA CONSUMO HUMANO: BREVE ABORDAGEM. *Agrarian Academy*. 2015;2:101-13.
100. Kinouchi FL. "logurte" de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama: UNESP; 2006.
101. Zhu Y, Yao Y, Shi Z, Everaert N, Ren G. Synergistic Effect of Bioactive Anticarcinogens from Soybean on Anti-Proliferative Activity in MDA-MB-231 and MCF-7 Human Breast Cancer Cells In Vitro. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018;23(7).
102. Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Adv Nutr*. 2015;6(4):408-19.
103. Prietsch RF, Monte LG, da Silva FA, Beira FT, Del Pino FA, Campos VF, et al. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;390(1-2):235-42.
104. Russo M, Russo GL, Daglia M, Kasi PD, Ravi S, Nabavi SF, et al. Understanding genistein in cancer: The "good" and the "bad" effects: A review. *Food chemistry*. 2016;196:589-600.
105. Zhang L, Yang B, Zhou K, Li H, Li D, Gao H, et al. Potential therapeutic mechanism of genistein in breast cancer involves inhibition of cell cycle regulation. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1820-6.
106. Rajah TT, Peine KJ, Du N, Serret CA, Drews NR. Physiological concentrations of genistein and 17beta-estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing BAX/BCL-2 and reducing pERK1/2. *Anticancer research*. 2012;32(4):1181-91.
107. Zhao Q, Zhao M, Parris AB, Xing Y, Yang X. Genistein targets the cancerous inhibitor of PP2A to induce growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells. *International journal of oncology*. 2016;49(3):1203-10.
108. de Lemos ML. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother*. 2001;35(9):1118-21.
109. Zhang X, Cook KL, Warri A, Cruz IM, Rosim M, Riskin J, et al. Lifetime Genistein Intake Increases the Response of Mammary Tumors to Tamoxifen in Rats. *Clin Cancer Res*. 2017;23(3):814-24.
110. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*. 2008;3(7):1125-31.
111. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
112. Chou T-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*. 2010;70(2):440.
113. G.Al-Jassim Z, Alabbassi M, Yaseen N. The Cytotoxic Effect of 2-Deoxy-D-Glucose Combination with 5- Fluorourasil and NO-Aspirin on Mammary Adenocarcinoma Cell Line. 2014.
114. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1991;139(2):271-9.
115. Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*. 2013;979:65-70.

116. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*. 2011;64(11):937-46.
117. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
118. Oliveira LR, Jeffrey SS, Ribeiro-Silva A. Stem cells in human breast cancer. *Histol Histopathol*. 2010;25(3):371-85.
119. Kaushik S, Shyam H, Balapure A. Genistein synergizes centchroman action in human breast cancer cells. *Indian Journal of Pharmacology*. 2016;48:637.
120. Fang Q, Yao S, Luo G, Zhang X. Identification of differentially expressed genes in human breast cancer cells induced by 4-hydroxyltamoxifen and elucidation of their pathophysiological relevance and mechanisms. *Oncotarget*. 2017;9(2):2475-501.
121. Sahin I, Bilir B, Ali S, Sahin K, Kucuk O. Soy Isoflavones in Integrative Oncology: Increased Efficacy and Decreased Toxicity of Cancer Therapy. *Integr Cancer Ther*. 2019;18:1534735419835310-.
122. Xue JP, Wang G, Zhao ZB, Wang Q, Shi Y. Synergistic cytotoxic effect of genistein and doxorubicin on drug-resistant human breast cancer MCF-7/Adr cells. *Oncol Rep*. 2014;32(4):1647-53.
123. Nakagawa H, Yamamoto D, Kiyozuka Y, Tsuta K, Uemura Y, Hioki K, et al. Effects of genistein and synergistic action in combination with eicosapentaenoic acid on the growth of breast cancer cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2000;126(8):448-54.
124. Mai Z, Blackburn GL, Zhou J-R. Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Mol Carcinog*. 2007;46(7):534-42.
125. Ford CH, Al-Bader M, Al-Ayadhi B, Francis I. Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines. *Anticancer research*. 2011;31(2):521-7.
126. Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhi B, Francis I. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(3):537-44.
127. Flynn M, Heale KA, Alisaraie L. Mechanism of Off-Target Interactions and Toxicity of Tamoxifen and Its Metabolites. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(7):1492-507.
128. Manas ES, Xu ZB, Unwalla RJ, Somers WS. Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor- β Using X-Ray Crystallography and Computational Methods. *Structure*. 2004;12(12):2197-207.
129. Jan R, Huang M, Wambi J. Loss of pigment epithelium-derived factor: A novel mechanism for the development of endocrine resistance in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14:R146.
130. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*. 2012;226(2):352-64.
131. Upadhyay S, Neburi M, Chinni SR, Alhasan S, Miller F, Sarkar FH. Differential Sensitivity of Normal and Malignant Breast Epithelial Cells to Genistein Is Partly Mediated by p21^{WAF1}. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(6):1782.
132. Ye D, Li Z, Wei C. Genistein inhibits the S-phase kinase-associated protein 2 expression in breast cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(1):1069-75.
133. Reddel RR, Murphy LC, Sutherland RL. Effects of biologically active metabolites of tamoxifen on the proliferation kinetics of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Cancer Res*. 1983;43(10):4618-24.
134. Yaacob NS, Nik Mohamed Kamal NN, Wong KK, Norazmi MN. Cell Cycle Modulation of MCF-7 and MDA-MB-231 by a Sub-Fraction of *Strobilanthes crispus* and its Combination with Tamoxifen. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(18):8135-40.
135. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(1):238-59.
136. Grivicich IR, Andréa; Rocha, Adriana Brondani da. Morte celular por apoptose. *Rev bras cancerol* 2007;53(3):335-43.

137. Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(9):3155.
138. Janicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;117(1):219-21.
139. Yaacob N, Kamal N, Norazmi MN. Synergistic anticancer effects of a bioactive subfraction of *Strobilanthes crispus* and tamoxifen on MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014;14:252.
140. Cittelly D, Das P, Salvo V, Fonseca J, Burow M, Jones F. Oncogenic HER2 Δ 16 suppresses miR-15a/16 and deregulates BCL-2 to promote endocrine resistance of breast tumors. *Carcinogenesis*. 2010;31:2049-57.
141. Stocco B, Toledo KA, Fumagalli HF, Bianchini FJ, Fortes VS, Fonseca MJ, et al. Biotransformed soybean extract induces cell death of estrogen-dependent breast cancer cells by modulation of apoptotic proteins. *Nutr Cancer*. 2015;67(4):612-9.
142. Eichhorn JM, Alford SE, Sakurikar N, Chambers TC. Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. *Exp Cell Res*. 2014;322(2):415-24.
143. Yang S, Zhou Q, Yang X. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007;1773(6):903-11.
144. Zhou P, Wang C, Hu Z, Chen W, Qi W, Li A. Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-mesenchymal via a Notch1/NF-KB/slug/E-cadherin pathway. *BMC Cancer*. 2017;17.
145. Pan H, Zhou W, He W, Liu X, Ding Q, Lijun L, et al. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF- κ B activity via the Notch-1 pathway. *International journal of molecular medicine*. 2012;30:337-43.
146. Qi W, Wu H, Yang L, Boyd DD, Wang Z. A novel function of caspase-8 in the regulation of androgen-receptor-driven gene expression. *EMBO J*. 2007;26(1):65-75.
147. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzeppek T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*. 2010;4:35-41.
148. Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, et al. Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chemical Research in Toxicology*. 2003;16(10):1338-58.
149. Pihlajamaa P, Zhang FP, Saarinen L, Mikkonen L, Hautaniemi S, Janne OA. The phytoestrogen genistein is a tissue-specific androgen receptor modulator. *Endocrinology*. 2011;152(11):4395-405.
150. Das G, Shravage BV, Baehrecke EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):a008813.
151. Inguscio V, Panzarini E, Dini L. Autophagy Contributes to the Death/Survival Balance in Cancer PhotoDynamic Therapy. *Cells*. 2012;1(3):464-91.
152. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2011;18(4):571-80.
153. Wu S-T, Sun G-H, Cha T-L, Kao C-C, Chang S-Y, Kuo S-C, et al. CSC-3436 switched tamoxifen-induced autophagy to apoptosis through the inhibition of AMPK/mTOR pathway. *Journal of Biomedical Science*. 2016;23.
154. Nagelkerke A, Sieuwerts A, Bussink J, Sweep F, Look M, Foekens J, et al. LAMP3 is involved in tamoxifen resistance in breast cancer cells through the modulation of autophagy. *Endocrine-related cancer*. 2014;21:101-12.
155. Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy. *Cell death and differentiation*. 2017;24(8):1369-79.
156. Liu J, Yue W, Chen H. The correlation between autophagy and tamoxifen resistance in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(6):2066-74.

157. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2007;13(24):7271-9.
158. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*. 2019;18.
159. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(12):3448-59.
160. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of Clinical Pathology*. 2011;64(11):937.
161. Bezerra PHA, Ferreira IM, Franceschi BT, Bianchini F, Ambrosio L, Cintra ACO, et al. BthTX-I from *Bothrops jararacussu* induces apoptosis in human breast cancer cell lines and decreases cancer stem cell subpopulation. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019;25:e20190010.
162. Han Y, Fan S, Qin T, Yang J, Sun Y, Lu Y, et al. Role of autophagy in breast cancer and breast cancer stem cells (Review). *International journal of oncology*. 2018;52(4):1057-70.
163. Nami B, Donmez H, Koçak N. Autophagy reduces subpopulation of CD44+/CD24-/low phenotype cancer stem cells in MCF7 and Hep-2 cells culture. *Stem Cell Research*. 2015;2015:e:1002.
164. Masri S, Phung S, Wang X, Chen S. Molecular characterization of aromatase inhibitor-resistant, tamoxifen-resistant and LTEDaro cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;118(4-5):277-82.
165. Selli C, Turnbull AK, Pearce DA, Li A, Fernando A, Wills J, et al. Molecular changes during extended neoadjuvant letrozole treatment of breast cancer: distinguishing acquired resistance from dormant tumours. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):2.
166. Amaral C, Toloí MRT, Vasconcelos LD, Fonseca MJV, Correia-da-Silva G, Teixeira N. The role of soybean extracts and isoflavones in hormone-dependent breast cancer: aromatase activity and biological effects. *Food Funct*. 2017;8(9):3064-74.
167. Ju YH, Doerge DR, Woodling KA, Hartman JA, Kwak J, Helferich WG. Dietary genistein negates the inhibitory effect of letrozole on the growth of aromatase-expressing estrogen-dependent human breast cancer cells (MCF-7Ca) in vivo. *Carcinogenesis*. 2008;29(11):2162-8.
168. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*. 2005;24(17):2776-86.
169. Lee SY, Ju MK, Jeon HM, Jeong EK, Lee YJ, Kim CH, et al. Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:3537471.
170. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*. 2010;8:31-.
171. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2(4):291-9.
172. Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*. 2008;269(2):226-42.
173. Rechoum Y, Rovito D, Iacopetta D, Barone I, Andò S, Weigel NL, et al. AR collaborates with ER α in aromatase inhibitor-resistant breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147(3):473-85.