

Universidade de São Paulo

LEANDRO DE LIMA COUTINHO

**Efeitos da associação do sulforafano à terapia convencional no tratamento de
câncer de mama triplo-negativo**

São Paulo, 2022

LEANDRO DE LIMA COUTINHO

**Efeitos da associação do sulforafano à terapia convencional no tratamento de
câncer de mama triplo-negativo**

Versão Original

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação
em Oncologia da Faculdade de Medicina da USP para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Programa de Pós-graduação em
Oncologia

Orientadora: Maria Cristina R. Rangel

Co-orientador: Tharcísio Citrangulo

São Paulo, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Leandro de Lima

Efeitos da associação do sulforafano à terapia convencional no tratamento de câncer de mama triplo-negativo / Leandro de Lima Coutinho. -- São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Cristina Rodrigues Rangel.

Coorientador: Tharcísio Citrangulo Tortelli Junior.

Descritores: 1.Resistência a medicamentos
2.Neoplasias de mama triplo negativas 3.Células-tronco neoplásicas 4.Tratamento convencional

USP/FM/DBD-438/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: COUTINHO, Leandro de Lima

Título: Efeitos da associação do sulforafano à terapia convencional no tratamento de câncer de mama triplo-negativo

Dissertação apresentada à pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da USP para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª Drª: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profª Drª: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profª Drª: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina R. Rangel, assim como meu co-orientador Dr. Tharcísio Citrangulo Tortelli Júnior por me conduzirem durante o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também à Nathália Leal e Darshak Bahtt por me auxiliarem sempre que necessário. Ao Prof. Dr. Roger Chammas, minha gratidão por ceder a infraestrutura do laboratório de Oncologia Experimental situado no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) para o desenvolvimento do presente estudo. À Fundação de Fomento à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) meus agradecimentos por fomentar este projeto.

Ao meu núcleo familiar, em especial minha mãe Ana Maria, minha gratidão por ter o apoio de vocês nas minhas decisões. Também agradeço enormemente aos meus amigos Sara Mendes, David Douglas e Luciana Costa, bem como minhas tias Rosa Ferreira e Maria José e a minha prima Brenda Araújo por todo o suporte durante minha estada em São Paulo e por me proporcionarem momentos incríveis. Ao meu tio Risoaldo Ferreira, minha imensa gratidão por ser um amigo e incentivador.

A Prof^ª. Dr^ª. Jaciana Aguiar e todos os integrantes do grupo Oncologia Experimental, minha imensa gratidão por ter contribuído de forma direta na minha carreira científica, sempre me orientando com sabedoria e humildade. A Prof^ª. Dr^ª. Jéssica Barbosa e seu esposo Prof. Dr. Marllon Santana por me guiarem durante meus projetos de iniciação científica sendo, além de tutores, amigos.

Aos amigos que me auxiliaram durante esses três anos de mestrado, tornando-os agradáveis, agradeço profundamente. Dentre eles, Nathália Leal, Darshak Bahtt, Ana Luiza Lomba e Valécia Costa os quais partilharam dos bons e maus momentos, sendo um dos motivos da minha permanência e perseverança ao decorrer desses anos.

RESUMO

Coutinho LL. Efeitos da associação do sulforafano à terapia convencional no tratamento de câncer de mama triplo-negativo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2022.

*Os tumores são compostos por células funcionalmente heterogêneas e, dentro do volume tumoral, apenas uma subpopulação limitada, mas altamente dinâmica, de células conhecidas como células-tronco tumorais (CSCs) pode se autorrenovar e iniciar tumores em alta frequência. O subtipo de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) apresenta um número significativamente maior de CSCs quando comparado aos tumores não-TNBC. Essa característica contribui para o fenótipo agressivo exibido pelos tumores TNBC e impacta no tratamento de pacientes portadores desse subtipo molecular, uma vez que as CSCs estão envolvidas na aquisição de resistência às terapias antineoplásicas convencionais. A via de sinalização embrionária Cripto-1 (CR-1)/NODAL é conhecida por estar aumentada em TNBC, principalmente na população de CSCs contribuindo para a manutenção de seu fenótipo de stemness. Além disso, estudos têm demonstrado que as moléculas 'REDOX' Óxido Nítrico (NO) e uma das enzimas envolvidas em sua síntese, Óxido Nítrico Sintase 2 (NOS2), são capazes de induzir a carcinogênese através de diferentes processos, incluindo a promoção de propriedades de CSCs em TNBC. Neste projeto, buscamos sensibilizar células TNBC à quimioterapia convencional modulando negativamente CR-1 e NOS2/NO usando sulforafano (SFN), um agente nutracêutico conhecido por atingir especialmente a população de CSCs. Curiosamente, este composto natural encontrado em vegetais crucíferos, por exemplo, brócolis e couve-flor, também demonstrou interferir na atividade de CR-1 e NO em condições patológicas, como TNBC e infecção por *H. pylori*, respectivamente. Para testar nossa hipótese de que SFN seria capaz de sensibilizar células à quimioterapia, utilizamos neste estudo quatro linhagens celulares representando os subtipos de TNBC relatados na literatura. Inicialmente testamos a resposta de todas as linhagens à doxorrubicina (DOX) e cisplatina (CIS). Observamos que todas as células estudadas, MDA-MB-468, HCC70, MDA-MB-453 e MDA-MB-231 foram sensíveis à DOX, exibindo redução significativa na viabilidade celular em doses baixas. Por outro lado, apenas as células MDA-MB-468 e HCC70 do subtipo basal-like responderam à CIS em baixas doses. As células representantes do subtipo receptor de andrógeno luminal, MDA-MB-453, e mesenquimal, MDA-MB-231, mostraram resistência ao tratamento com CIS, com diminuição sutil da viabilidade celular apenas em doses mais altas. No entanto, quando SFN foi associado ao tratamento com CIS, ambas as linhagens exibiram redução significativa na viabilidade celular, acompanhada de morte celular caracterizada posteriormente por ativação de apoptose inicial. Além disso, observamos que as células MDA-MB-231 tratadas com CIS exibiram expressão aumentada dos genes de pluripotência CR-1 e Oct-4, e do marcador de transição epitélio-mesenquima N-caderina, porém a terapia combinada SFN-CIS foi capaz de reverter esse efeito. Finalmente, nossos resultados revelaram que o tratamento com SFN foi capaz de inibir a superexpressão de CR-1, NOS2 e COX2 induzida por citocinas em células MDA-MB-231 e diminuir a estabilização de HIF-1 α induzida por DETANO(NO-doador). Dessa forma, o SFN apresenta-se como um potencial candidato para terapia combinada com a CIS ou como coadjuvante em pacientes que superexpressam de NOS2/COX2.*

Palavras-chave: Resistência a medicamentos. Neoplasias de mama triplo-negativas. Células-tronco neoplásicas. Tratamento convencional.

ABSTRACT

Coutinho LL. Effects of sulforaphane association to standard therapy for treating triple-negative breast cancer [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2022.

Most tumors are comprised of functionally heterogeneous cells, and within the tumor bulk only a limited, but highly dynamic subpopulation of cells known as cancer stem cells (CSCs) can self-renew and initiate tumors at a high frequency. The triple-negative breast cancer (TNBC) subtype shows a significantly higher number of CSCs when compared to non-TNBC tumors. This characteristic contributes to the aggressive phenotype exhibited by TNBC and impacts the treatment of patients harboring these tumors since CSCs participate in the acquisition of resistance to conventional antineoplastic therapies. The embryonic signaling pathway Cripto-1(CR-1)/NODAL is known to be increased in TNBC, especially in the CSCs population contributing to the maintenance of their stemness phenotype. Also, studies have shown that the 'REDOX' molecules Nitric Oxide (NO) and one of the enzymes involved on its synthesis, Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2), are able to induce carcinogenesis through different processes, including the promotion of stem-like properties in TNBC cells. In this project, we sought to sensitize TNBC cells to conventional chemotherapy by negatively modulating CR-1 and NOS2/NO using sulforaphane (SFN), a nutraceutical known to especially target the CSCs population. Interestingly, this natural isothiocyanate compound found in cruciferous vegetables, e.g., broccoli and cauliflower, has also been shown to interfere in both CR-1 and NO activity in pathological conditions, such as TNBC and H. pylori infection, respectively. To address our hypothesis that SFN would sensitize cells to chemotherapy, we used in this study four cell lines representing the TNBC subtypes reported in the literature. Initially, we tested the response of all cell lines to doxorubicin (DOX) and cisplatin (CIS). We found that all of them, MDA-MB-468, HCC70, MDA-MB-453, and MDA-MB-231 were sensitive to DOX, displaying significant reduction in cell viability at low doses. On the other hand, only the basal-like subtype MDA-MB-468 and HCC70 cells responded to CIS at low doses. The luminal androgen receptor MDA-MB-453 and mesenchymal subtype MDA-MB-231 cells exhibited resistance to CIS treatment, with slight decrease on cell viability only at higher doses. However, when SFN was associated with CIS treatment, both cell lines exhibited significant reduction on cell viability accompanied by cell death, further characterized by early apoptosis activation. Additionally, we observed that MDA-MB-231 cells treated with CIS exhibited increased expression of the pluripotency genes CR-1 and Oct-4, and the epithelial-to-mesenchymal transition marker N-cadherin, however the combination therapy CIS-SFN was able to revert this effect. Finally, our results revealed that SFN treatment alone was able to impair cytokine-induced CR-1, NOS2, and COX2 overexpression in MDA-MB-231 cells and decrease DETANO(NO-donor)-induced HIF-1 α stabilization in the same cells. Therefore, SFN is a potential candidate for combined therapy with CIS or as a coadjuvant agent in patients who overexpress NOS2/COX2.

Key words: Drug resistance. Triple-negative breast neoplasms. Neoplastic stem cells. Standard therapy.

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Revisão Bibliográfica	10
2.1. Desenvolvimento da glândula mamária	10
2.2. Epidemiologia do câncer de mama.....	12
2.3. Classificação do câncer de mama.....	15
2.3.1. Câncer de mama triplo-negativo.....	17
2.4. Células-tronco tumorais (CSCs) e câncer.....	21
2.5. Célula-tronco tumoral e resistência terapêutica no câncer de mama.....	26
2.6. Correlação entre a expressão de iNOS/COX2, HIF-1 α e células-tronco tumorais	27
2.7. Abordagens terapêuticas.....	29
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. Materiais e Métodos	31
4.1. Cultura de Células	31
4.2. Agentes Terapêuticos	32
4.3. Ensaio de MTT	32
4.4. Ensaio de Atividade de Caspases	32
4.5. Ensaio de Exclusão de Trypan Blue.....	32
4.6. Ensaio Clonogênico.....	33
4.7. Ensaio de Indução de COX2 e NOS2.....	33
4.8. Análise de Expressão Gênica por Transcrição Reversa-Quantitativa (RT-qPCR)	33
4.9. Análise de Proteínas por Eletroforese em Nano-Capilares (Wes).....	34
4.10. Estatística.....	35
5. Resultados e Discussão.....	35
5.1. As linhagens TNBC testadas são intrinsecamente sensíveis à Doxorubicina.....	35

5.2.	As linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-453 são resistentes à Cisplatina	37
5.3.	Sulforafano é capaz de sensibilizar as células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 ao tratamento com Cisplatina	38
5.4.	Os regimes terapêuticos modulam a expressão de genes relacionados a CSC e EMT em células MDA-MB-231	42
5.5.	Sulforafano é capaz de reverter a superexpressão de <i>NOS2</i> e <i>COX2 (PTGS2)</i> mediada por citocinas e inibir a estabilização proteica de HIF-1 α em células MDA-MB-231	45
5.6.	Células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 pré-tratadas com Cisplatina apresentam maior tumorigenicidade quando tratadas apenas com Sulforafano, mas mantém sensibilidade ao tratamento combinado	48
6.	Conclusão	49
7.	Referências	8

1. Introdução

O câncer de mama é o tipo tumoral mais incidente entre as mulheres a nível global, representando 24,5% dos novos casos estimados de câncer e 15,5% de mortes relacionadas ao câncer na população feminina em 2020 [1]. A incidência de câncer de mama vem crescendo exponencialmente ao passar dos últimos anos. Alguns fatores tais como obesidade, sedentarismo, alcoolismo, bem como o crescimento e envelhecimento da população têm contribuído para esse crescimento exponencial dos casos de câncer de mama observado na população feminina. Atrelada a esses fatores, a carência de desenvolvimento de programas de rastreamento resulta na detecção tardia de tumores malignos da mama, o que pode acarretar em uma redução considerável na taxa de cura de pacientes oncológicas [2].

O câncer de mama corresponde a um conjunto altamente heterogêneo de malignidades que acometem tanto os elementos epiteliais quanto os estromais da glândula mamária [3]. Dessa forma, faz-se necessário estratificar esses tumores malignos da mama, no intuito de facilitar o manejo clínico das pacientes. Por essa razão, as neoplasias da mama foram subdivididas em subgrupos intrínsecos, os quais exibem características biológicas e clínicas distintas [4]. Os tumores luminais (A e B), com positividade para os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) são os mais incidentes, seguidos pelos tumores que superexpressam o receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER-2) e os triplo-negativos (TNBC), caracterizados pela ausência de expressão dos três receptores. Este último corresponde a cerca de 15-20% dos tumores da mama, sendo altamente heterogêneo e, portanto, dividido em subtipos moleculares distintos que variam em termos de sensibilidade/resistência às opções de tratamento disponíveis na clínica [5], [6].

Embora alguns pacientes com TNBC sejam notoriamente beneficiados com quimioterapia, como por exemplo antraciclinas, ex., Doxorrubicina (DOX), e agentes alquilantes, ex., Cisplatina (CIS), tanto no esquema neoadjuvante, adjuvante ou metastático, há uma parcela de pacientes que não são responsivos a esses agentes antineoplásicos. Além disso, inicialmente, a maioria dos TNBCs são quimio e radiosensíveis, no entanto, esses tumores desenvolvem uma alta taxa de resistência no decorrer do tratamento [6], [7].

A presença de uma subpopulação de células tumorais que exhibe características tronco têm sido associadas com a heterogeneidade intrínseca ao câncer de mama. Essas células são denominadas de Célula-tronco Tumorais (CSCs) e o subtipo TNBC apresenta uma subpopulação consideravelmente alta de CSCs quando comparado aos demais subtipos

moleculares [8]. As CSCs exibem características de autorrenovação, crescem independentemente de ancoragem e possuem a capacidade de iniciar e recapitular a heterogeneidade do tumor primário. Embora a quimio e radioterapia sejam capazes de eliminar a maior parte das células tumorais em divisão, as CSCs frequentemente não são afetadas por esses agentes antineoplásicos, pois encontram-se geralmente na fase quiescente do ciclo celular (G_0) sendo, portanto, uma das principais causas do desenvolvimento de resistência ao tratamento, metástases e recidiva tumoral [9].

Sulforafano (SFN) é um composto natural presente de forma abundante em vegetais crucíferos, tais como brócolis e couve flor [10]. Inúmeros estudos têm demonstrado os efeitos antitumorais do SFN em diferentes tumores sólidos, incluindo o câncer de mama [11]. Além disso, SFN tem sido reportado como um agente anti-CSCs, considerando que este composto natural é capaz de inibir as características tronco dessas células em diferentes tipos de tumor, incluindo glioblastoma, câncer de pele, pâncreas, e mama [12]–[15]. Notavelmente, Castro e colaboradores [16] reportaram que SFN é capaz de inibir a capacidade de autorrenovação de células MDA-MB-231-Luc-D3H1, ao reduzir consideravelmente a formação de esferas secundárias e o desenvolvimento de tumores *in vivo* [16].

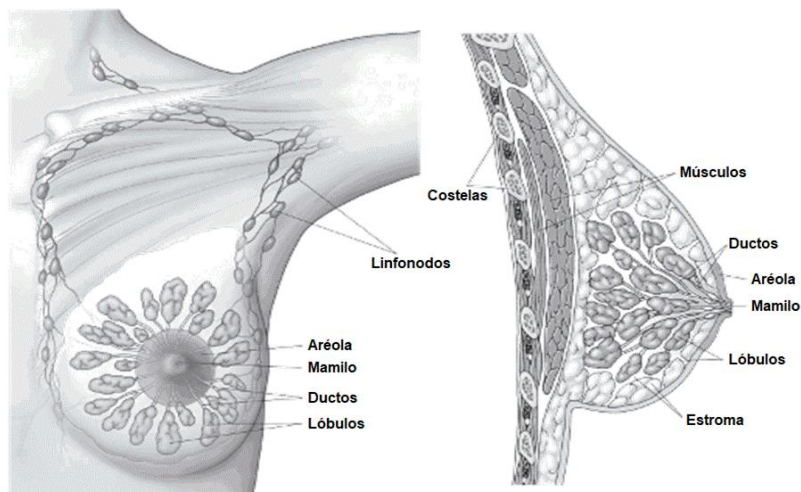
Considerando que as CSCs são capazes de promover resistência à terapias convencionais e que o SFN tem sido reportado como um composto natural que apresenta propriedades anti-CSCs, o objetivo deste projeto de mestrado foi estudar os efeitos da associação de drogas convencionais, como a CIS e DOX, com o SFN no tratamento de células TNBC. Hipotetizamos que, ao associar SFN à CIS e DOX, tanto células diferenciadas e com alta taxa mitótica, quanto células menos diferenciadas que apresentam baixa taxa de divisão celular, ex. CSCs, seriam atingidas concomitantemente, o que potencialmente resultaria em uma melhor resposta terapêutica.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Desenvolvimento da glândula mamária

A mama consiste em um órgão bilateral que, nas mulheres, é submetido a drásticas mudanças em sua forma, tamanho e função durante a puberdade, gravidez, lactação e menopausa. O desenvolvimento da glândula mamária se inicia durante a embriogênese sendo este processo interrompido no início da infância e retomado na puberdade por meio dos estímulos hormonais que promovem uma rede complexa de interações recíprocas entre o epitélio e o mesênquima culminando na diferenciação da estrutura rudimentar, iniciada ainda no período pré-natal, formando uma glândula mamária mais madura. No entanto, o desenvolvimento e diferenciação completa da glândula mamária só são atingidos no final da primeira gravidez a termo [17], [18].

Figural: Anatomia da glândula mamária humana



Fonte: Modificado de [19]

A glândula mamária desenvolvida é constituída por três principais componentes, sendo eles: pele, tecido subcutâneo e tecido mamário, os quais são compostos por elementos epiteliais e estromais. Os componentes epiteliais constituem os ductos e os lóbulos mamários, sendo os ductos responsáveis por interligar as unidades estruturais e funcionais da mama (lóbulos) ao mamilo. Em relação aos elementos estromais, ex. fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e imunológicas, estes constituem a maior parte do volume mamário durante o período não-lactante proporcionando um ambiente propício para a sustentação e desenvolvimento do

parênquima. Além disso, a mama apresenta uma pele delgada contendo folículos pilosos, glândulas sudoríparas exócrinas e glândulas sebáceas. Há inúmeras terminações nervosas sensoriais no mamilo, assim como glândulas sudoríparas sebáceas apócrinas. A aréola da mama apresenta um formato circular, sendo esta pigmentada e medindo cerca de 15 a 60 mm de diâmetro (Figura 1) [20].

Uma das principais vias de sinalização envolvidas no processo de formação e desenvolvimento da glândula mamária é a via embrionária Cripto-1(CR-1)/Nodal. Esta via é capaz de regular o processo de transição epitélio-mesenquima (EMT) e, por conseguinte, as capacidades de invasão e migração celular. Esses processos são cruciais para a morfogênese e ramificação da glândula mamária, o que corrobora a importância de CR-1 no processo de desenvolvimento da glândula mamária durante a embriogênese, puberdade e vida adulta [21]. Após o nascimento, CR-1 é expresso em baixas quantidades em células epiteliais do ducto mamário de camundongos fêmeas virgens, e observa-se um aumento de sua expressão durante a gravidez, momento no qual a glândula mamária passa pelo processo de ramificação ductal e desenvolvimento alveolar. Altos níveis de CR-1 também são detectados durante a lactação desses animais, estando CR-1 também presente no leite [21].

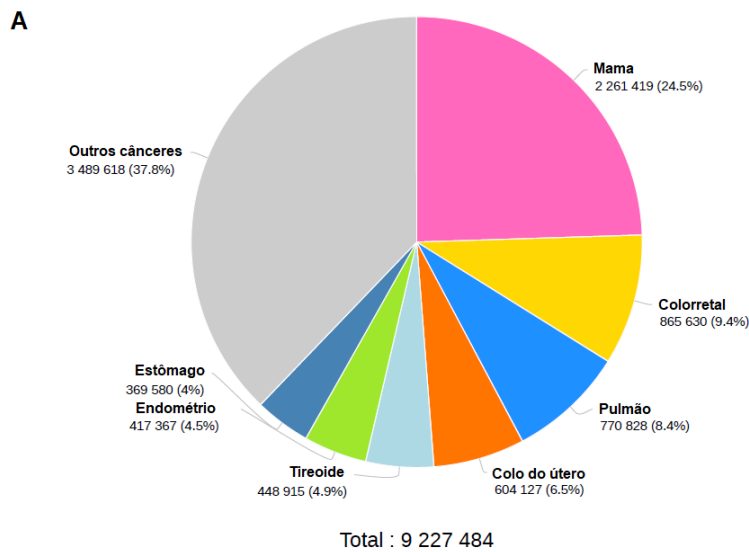
O papel de CR-1 no desenvolvimento mamário tem sido corroborado em modelos *in vitro* e *in vivo*. Klauzinska et al. [22] demonstraram que a ausência de CR-1 está associada a uma má formação alveolar e ramificação deficiente da glândula mamária murina durante a gravidez. Por outro lado, sua superexpressão culmina em aumento da proliferação, resistência a anoikis e transformação maligna de células epiteliais mamárias. Em animais MMTV/CR-1, o aumento da expressão de CR-1 foi associado à formação de regiões hiperplásicas e ao desenvolvimento de tumores mamários [23]. Bianco e colaboradores [24] relataram, por meio de ensaios *in vitro*, que a expressão de CR-1 está associada ao aumento na capacidade de invasão e migração de células mamárias murinas, sendo este efeito inibido pelo supressor tumoral Caveolina-1. Ainda, foi observada uma diminuição dramática de Caveolina-1 em tumores mamários induzidos pela superexpressão de CR-1, MMTV/CR-1 [24]. Portanto, a regulação da expressão de CR-1 é crucial durante a morfogênese e maturação da glândula mamária, estando a desregulação de sua expressão associada ao desenvolvimento do câncer de mama.

2.2. Epidemiologia do câncer de mama

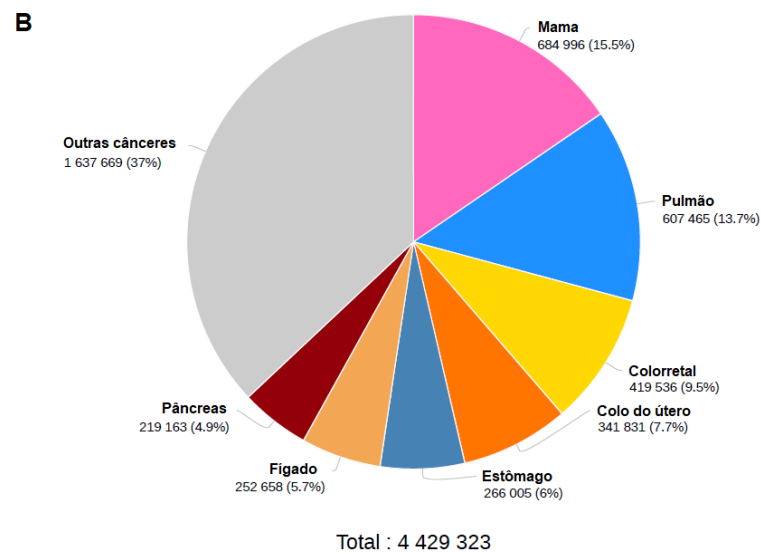
Com exceção dos tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o principal tipo de câncer diagnosticado em mulheres em 159 países ao redor do globo, seguido pelo câncer cervical. No público feminino, o câncer de mama corresponde a 1 em cada 4 novos casos e 1 em cada 6 mortes relacionadas a câncer [1]. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), em 2020 o câncer de mama (11,7%) superou o câncer de pulmão (11,4%) na taxa de incidência, passando a ser o tipo de tumor mais incidente na população a nível global [25]. Quando apenas o público feminino foi analisado, a incidência de tumores malignos da mama elevou-se para 24,5% (Figura 2A) mantendo-se como o tipo de câncer mais incidente neste público, seguido por câncer colorretal (9,4%) e de pulmão (8,4%). No que se refere à taxa de mortalidade, o câncer de mama é a principal causa de morte relacionada a malignidades entre as mulheres em 113 países, sendo responsável por cerca de 15,5% (Figura 2B) das mortes relacionadas a câncer (Figura 2B) [1].

Figura 2: Epidemiologia do câncer de mama - MUNDO

Número estimado de novos casos em 2020, global, mulheres, todas as idades



Número estimado de mortes em 2020, global, mulheres, todas as idades



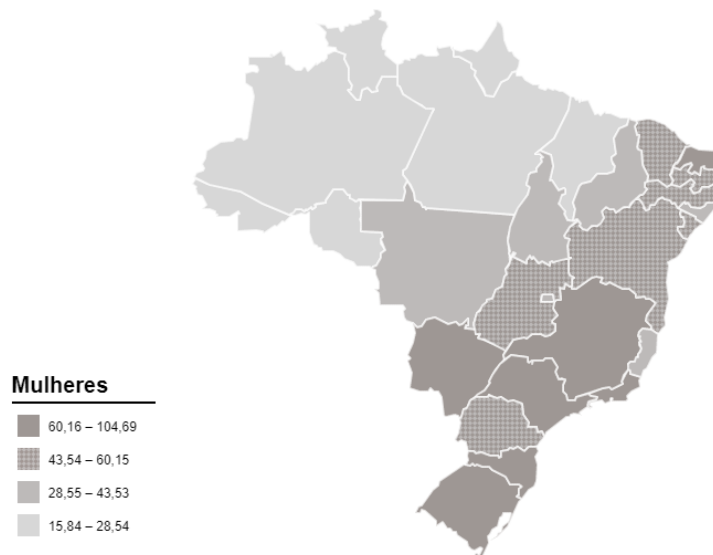
Fonte: Modificado de [1]

Comparando-se a incidência do câncer de mama nos países que compõem a América do Sul com as taxas dos países da Europa, observa-se que os países europeus apresentam, em média, o dobro da taxa de incidência dos países sul-americanos (em torno de 44 casos por 100.000 mulheres latinas *versus* 84 casos por 100.000 mulheres no norte da Europa). No entanto, apesar desta considerável diferença no número de casos, a taxa de mortalidade entre os países dos dois continentes são semelhantes, o que reforça o fato de que os países em

desenvolvimento, como o Brasil, apresentam sérios problemas de acesso aos serviços de saúde, dificultando a realização do diagnóstico precoce, que poderia mudar o curso da doença [26].

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou para cada ano do triênio 2020-2022 cerca de 66,280 mil novos casos de câncer de mama, o que equivale a um risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres. No que diz respeito à distribuição das incidências dos diferentes tipos de câncer entre as diferentes regiões do Brasil, o câncer de mama feminino representa o tipo de tumor mais frequente em todas as regiões brasileiras com um risco estimado de 81,06 novos casos por 100 mil mulheres na Região Sudeste; 71,16 por 100 mil mulheres na Região Sul, 45,24 por 100 mil mulheres na Região Centro-Oeste; 44,29 por 100 mil mulheres na Região Nordeste e 21,34 por 100 mil mulheres na Região Norte (Figura 3). Além disso, em 2019 foi estimado que o câncer de mama seria responsável pela morte de 18.068 mil mulheres em todo o território nacional, o que corresponderia a uma taxa de mortalidade de 16,4% [27].

Figura 3: Epidemiologia do câncer de mama - BRASIL



Fonte: [27]

Segundo o INCA, para o ano de 2020 foram estimados cerca de 18,280 casos de câncer de mama em mulheres do Estado de São Paulo, o que representa uma taxa estimada de 55,39 casos a cada 100 mil mulheres. Desses casos, 5.350 estão estimados para a população da capital do estado, representando uma taxa estimada de 65,42 casos por 100 mil mulheres[27].

Dessa forma, apesar dos esforços feitos nas últimas décadas para melhorar o diagnóstico e tratamento, o câncer de mama ainda se configura como um dos principais desafios para a

saúde brasileira, se mantendo como o tipo de câncer mais incidente e relacionado à morte por câncer entre as mulheres, o que evidencia a necessidade de novas abordagens no intuito de reverter esse cenário epidemiológico.

2.3. Classificação do câncer de mama

O câncer de mama consiste em um conjunto de malignidades altamente heterogêneas que afetam tanto a porção epitelial, quanto estromal da glândula mamária [28]. As drásticas mudanças sofridas pela glândula mamária em sua forma e tamanho durante a puberdade, gravidez, lactação e menopausa, podem contribuir diretamente no desenvolvimento de câncer de mama [20]. Além disso, fatores ambientais, tais como alcoolismo, obesidade, sedentarismo, nuliparidade e maior tempo de exposição aos hormônios estrógeno e progesterona estão relacionados a um aumento no risco de desenvolver o câncer de mama. Estudos epidemiológicos mostram que mulheres que apresentaram menarca precoce (antes dos 12 anos de idade) e menopausa tardia (após os 55 anos) apresentaram maior risco de desenvolver tumores malignos da mama [29].

O processo de transformação maligna pode ocorrer em qualquer parte da glândula mamária. No entanto, as principais estruturas afetadas são os ductos mamários. A classificação dos tumores malignos da mama baseia-se no tipo de célula afetada. Tumores que se desenvolvem a partir dos elementos epiteliais da glândula mamária são classificados como carcinomas mamários, representando o tipo mais comum de câncer de mama, ao passo que os que acometem os elementos estromais, como miofibroblastos e células endoteliais, são denominados como sarcomas. Estes representam uma porção ínfima, menos de 1%, dos tumores de mama primários [30].

O diagnóstico e estratificação do câncer de mama são realizados de forma multidisciplinar baseando-se em informações clínicas (ex. idade, histórico familiar, exames físico e de imagem, etc.), histopatológicas (ex. perfil de expressão de receptores hormonais, HER-2, Ki-67, tipo histológico e grau de diferenciação) e molecular (análise de expressão gênica por meio de painéis - PAM50). A avaliação conjunta dos dados obtidos pelas diferentes abordagens clínicas e laboratoriais permite classificar os tumores da mama em grupos ou entidades facilitando o manejo clínico, bem como oferecendo informações prognósticas e de predição de resposta a terapia, além de permitir uma melhor seleção de pacientes para ensaios clínicos [31].

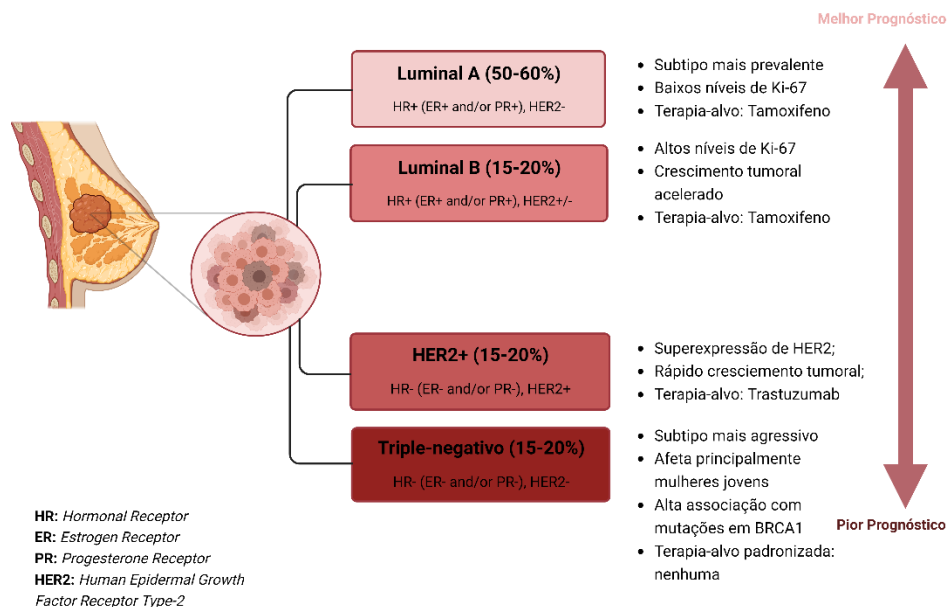
Histologicamente, o câncer de mama invasivo é classificado em dois principais tipos: carcinoma ductal invasivo (CDI) ou carcinoma lobular invasivo (CLI). Os CDIs são o tipo mais

comum de câncer de mama, representando 50-80% dos casos, sendo demais casos atribuídos ao CLI. CDIs podem ser divididos em “não especial”, quando não há características morfológicas suficientes para ser classificado como um tipo histológico característico, ou como “especial”, quando o tumor apresenta propriedades peculiares e comportamento celular e molecular característicos capazes de classificá-lo em um tipo histológico específico [32].

Em nível molecular, o câncer de mama é subdividido em quatro principais tipos de acordo com características imuno-histoquímicas: luminal A, luminal B, HER-2+ e triplo-negativo. Cada subtipo apresenta características e comportamentos clínicos distintos. Os tumores classificados como luminal A são os mais recorrentes, representando cerca de 50-60% dos casos de câncer de mama, sendo caracterizados pela alta expressão de RE e RP, baixa expressão do marcador de proliferação Ki-67 (<20%) e ausência ou baixa positividade para HER-2. Esses tumores também são marcados pela presença das citoqueratinas luminais 8 e 18, além de apresentarem baixo grau histológico, pleomorfismo nuclear discreto, e baixa atividade mitótica, exibindo, desta forma, o melhor prognóstico dentre os demais subtipos moleculares. Os tumores luminais B correspondem a 15-20% dos tumores malignos da mama e são caracterizados pela expressão de RE e/ou RP, apresentando alta expressão de Ki-67, podendo ou não expressar HER-2. Esses tumores apresentam um fenótipo mais agressivo quando comparados aos luminais A, bem como um pior prognóstico (Figura 4) [31], [33], [34].

Os tumores que apresentam amplificação do gene *EGFR-2* e/ou altos níveis da proteína HER-2 representam de 15-20% dos casos de câncer de mama (Figura 4). Quando ativada, a proteína HER-2 promove eventos celulares cruciais para a progressão tumoral como proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, angiogênese, invasão e metástase. Dessa forma, os tumores pertencentes a essa subclasse apresentam comportamentos biológicos e clínicos mais agressivos quando comparados aos luminais (YERSAL et al., 2014). No entanto, com o progresso feito no campo da terapia alvo-dirigida, além de fator prognóstico, a proteína HER-2 passou a figurar como um fator de predição de resposta à terapia com anticorpos monoclonais anti-HER-2 (ex. trastuzumabe) [31].

Figura 4: Subtipos intrínsecos do câncer de mama e suas características



Fonte: [35]

Por fim, os tumores caracterizados pela ausência de receptores hormonais (RE e RP) e HER-2 são classificados como triplo-negativos e correspondem a 15-20% dos casos de câncer de mama (Figura 4). Esses tumores são geralmente mais agressivos quando comparados aos demais, e apresentam prognóstico reservado, pois atualmente não há terapia alvo-dirigida padronizada na clínica [36]. Dessa forma, o desenvolvimento de estudos que objetivem o desenvolvimento, melhoria e/ou personalização de abordagens terapêuticas para esse subtipo de câncer de mama se faz necessário.

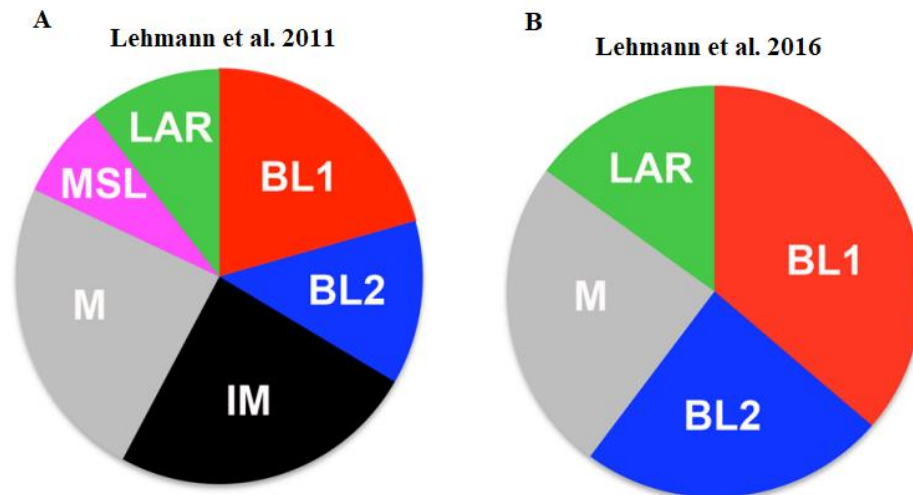
2.3.1. Câncer de mama triplo-negativo

Câncer de mama triplo-negativo (TNBC) constitui um conjunto de tumores altamente heterogêneos entre si afetando principalmente mulheres jovens (<40 anos). Esses tumores são altamente agressivos quando comparados aos demais subtipos moleculares de câncer de mama [37]. Estudos epidemiológicos mostram que TNBC se expressa de forma mais agressiva em mulheres de descendência afro-americana quando comparadas às de origem europeia. Porém, a razão para esta disparidade racial ainda não está consolidada. Há estudos que evidenciam diferenças moleculares entre mulheres de origens distintas, assim como há aqueles que mostram os impactos de fatores não biológicos como condições socioeconômicas, acesso a serviços de saúde, medidas contraceptivas e comorbidades como principais causas para essa diferença de comportamento do TNBC entre as diferentes etnias [38].

Por apresentar um fenótipo bastante agressivo, sendo este caracterizado por alto grau histológico, elevada capacidade de invasão e metástase e altas taxas de recidiva, os tumores triplo-negativos apresentam um prognóstico menos favorável em relação aos demais subtipos moleculares de câncer de mama [39]. Gonçalves et al. [40] analisaram uma coorte composta por 447 mulheres brasileiras diagnosticadas com câncer de mama com o objetivo de identificar potenciais fatores prognósticos. O estudo revelou que as mulheres com TNBC apresentaram uma redução de 19% na taxa de sobrevida em 5 anos, além de uma redução de 18% na taxa de sobrevida livre de doença em relação às pacientes não-TNBC. Além disso, estima-se que aproximadamente 46% das pacientes com TNBC desenvolverá metástase, principalmente nos primeiros 3 anos após o diagnóstico. Os tumores metastáticos geralmente acometem os pulmões (31%), cérebro (17,1%), ossos (9%) e fígado (6,2%). A taxa de recidiva estimada após a cirurgia para essas pacientes é de 20% e a taxa de mortalidade é de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico [36], [41].

Uma vez que TNBC é altamente heterogêneo, a necessidade de estratificação e classificação desses tumores é crucial para a criação de terapias-alvo e manejo clínico. Dessa forma, Lehmann et al. [42] analisaram perfis de expressão gênica de 587 casos de TNBC e reportaram 6 diferentes subtipos desses tumores, sendo eles: *basal-like 1* (BL-1), *basal-like 2* (BL-2), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M), mesenquimal *stem-like* (MSL) e receptor de andrógeno luminal (LAR) (Figura 5A). No entanto, em 2016 os mesmos autores revisitaram o estudo de 2011 e identificaram contaminação de transcritos nos subtipos IM e MSL, sendo esses transcritos derivados de células imunológicas presentes no infiltrado inflamatório, e de células do estroma tumoral, respectivamente. Portanto, TNBC passou a ser subclassificado em 4 principais grupos: BL-1, BL-2, M e LAR (Figura 5B) [43].

Figura 5: Subclassificação dos tumores de mama triple-negativos segundo Lehmann et al.



BL1 – Basal-like 1; BL2 – Basal-like 2; IM- Immunomodulatory; M- Mesenchymal; MSL - Mesenchymal Stem-like; LAR – Luminal Androgen Receptor.

Fonte: [43]

Os tumores BL-1 são caracterizados por alta expressão gênica de elementos do ciclo celular e resposta a danos no DNA, ao passo que os BL-2 são ricos em vias de sinalização de crescimento e marcadores mioepiteliais. O subtipo M apresenta alta expressão de genes envolvidos no processo de EMT e vias de sinalização de crescimento. Já tumores LAR são caracterizados pela expressão de componentes luminais e são estimulados pelo receptor de andrógeno (AR). Cada subtipo apresenta ontologia genética e resposta terapêutica distintas, bem como evolução e desfecho clínico peculiares. Os tumores BL-1 apresentam o melhor prognóstico com maior probabilidade de sobrevida global (OS) quando comparado aos demais subtipos. Além disso, este subtipo tende a responder a tratamento com agentes alquilantes como a CIS [43].

É importante ressaltar que, embora comumente utilizados como sinônimos, TNBC e basal-like (BL) são entidades diferentes. Tumores de mama do tipo BL são caracterizados pela expressão das citoqueratinas 5, 6, 14 e 17 e podem ou não ser triplo-negativos. Assim, BL é um dos subtipos de TNBC, porém nem todo TNBC é um BL. Em estudos ontológicos, aproximadamente 56% dos tumores TNBC e BL se sobrepõem podendo essa taxa atingir 90% de sobreposição, o que contrasta com 11,5% entre tumores não-TNBC e BL [36].

Portanto, mesmo compartilhando algumas características moleculares como ausência de RP e RE, e amplificação e/ou superexpressão de HER-2, tumores TNBC e BL são entidades distintas. A exemplo, tumores BL podem expressar RP e/ou RE distinguindo-os, desta forma,

dos tumores TNBC. No entanto, TNBC e tumores BL não são excludentes. É importante ressaltar que, em nível histológico, a maioria dos tumores triplo-negativos são classificados como basais (70-80%), contrastando com uma pequena porcentagem de não-basais (20-30%) (Figura 6). Esta ambiguidade suscita diferentes grupos de pesquisa a procurar por um conceito mais preciso para tumores basais, uma vez que não há uma definição universal para esses tumores [44], [45].

Cerca de 10-20% dos pacientes com tumores TNBC apresentam mutações germinativas em BRCA1/2. Tumores com essas mutações são comumente classificados como basais (BL-1 e BL-2). Estes apresentam fenótipos distintos caracterizados por uma alta capacidade de proliferação, pouco diferenciados e comumente classificados como TNBC [44]. Um estudo realizado por Foulkes et al. [46] analisou uma coorte de 1131 mulheres diagnosticadas com câncer de mama das quais 208 apresentavam mutações em BRCA1 e 88 em BRCA2. Os autores reportaram que apenas 3,9% dos tumores com BRCA1 mutado era ER-positivo. Ademais, os tumores estadiados como grau 3 apresentaram 4,8 vezes mais chances de ser ER-negativo.

Os impactos das mutações nesses genes no prognóstico de pacientes TNBC ainda não são bem compreendidos [47], [48]. Pogoda et al. [47] avaliaram uma coorte de 502 pacientes diagnosticados com TNBC com o objetivo de avaliar os impactos de mutações em BRCA1/2 no desfecho clínico. Dentre as pacientes, 30 apresentavam mutações nos genes referidos. Ao fim do estudo, os autores relataram nenhuma diferença significativa na sobrevida global e risco de morte entre pacientes com e sem mutações germinativas nos genes estudados. Por outro lado, Talhouet et al. [49] estudaram retrospectivamente uma coorte de 925 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, das quais 266 apresentavam mutações nos genes BRCA. Os autores concluíram que as pacientes classificadas como TNBC e BRCA mutado apresentaram aumento na sobrevida livre de doença (DFS) e uma tendência a um aumento na sobrevida doença-específica (DSS). Esses resultados não foram encontrados nas pacientes não-TNBC.

Embora cerca de 20% dos pacientes TNBC respondam ao tratamento convencional (cirurgia oncológica, quimio e radioterapia), 70% das pacientes geralmente desenvolvem metástase. No entanto, estudos recentes têm evidenciado que pacientes com mutações nos genes BRCA podem se beneficiar do tratamento com inibidores farmacológicos da enzima Poli Adenosina difosfato Ribose| Polimerase (iPARP) e regimes contendo sais de platina (ex. CIS e Carboplatina) aumentando, por conseguinte, as opções terapêuticas para esse grupo. Contudo, há relatos da emergência de clones resistentes a esses medicamentos, sendo este um dos principais problemas terapêuticos [48].

O desenvolvimento de resistência à terapia dá-se, ao menos em parte, a uma subpopulação de células tumorais com características tronco, tais como capacidades de autorrenovação e diferenciação. Os tumores de mama triplo negativos apresentam uma quantidade considerável dessas células quando comparados a outros subtipos moleculares de câncer de mama o que, somado a falta de terapia-alvo, acentua a dificuldade de manejo clínico das pacientes diagnosticadas com esse subtipo molecular de câncer de mama [50].

Portanto, o desenvolvimento de novos estudos com o objetivo de desenvolver ou aprimorar esquemas terapêuticos para pacientes *TNBC* e/ou entender as características moleculares e biológicas desses tumores é de extrema importância, uma vez que não há terapia alvo-dirigida aprovada e padronizada para estes pacientes e ainda há uma grande disparidade de resposta a terapia mesmo em pacientes do mesmo subtipo de *TNBC*.

2.4. Células-tronco tumorais (CSCs) e câncer

Célula-tronco tumorais (*Cancer Stem Cells* - CSCs) ou Células Iniciadoras de Tumor (*Tumor Initiating Cells* - TICs) constituem uma subpopulação de células presente na massa tumoral caracterizadas por apresentar características semelhantes a células-tronco normais, como por exemplo, capacidade de autorrenovação, aquiescência e diferenciação celular. Dessa forma, as CSCs apresentam papel crucial na heterogeneidade tumoral e desenvolvimento de resistência às terapias, visto que essas células são capazes de se diferenciar em tipos celulares distintos e apresentam mecanismos de detoxificação de drogas [51].

Há várias teorias no que diz respeito à origem das CSCs. Estas células podem se originar a partir da fusão de células tumorais resultando na formação de híbridos altamente aneuplóides; ou as CSCs seriam originadas a partir da transferência gênica horizontal, onde fragmentos de genes derivados de células doadoras seriam endocitados por células recipientes (célula somática ou tumoral) originando com fenótipos mais agressivos. Essas células também poderiam resultar de mutações em células-tronco adultas promovidas por agentes exógenos como radiação e exposição a certas toxinas. Essas alterações genéticas podem resultar na ativação aberrante de vias de sinalização embrionárias resultando em CSCs [52].

Dentre as diferentes vias de sinalização embrionárias que podem ser ativadas de forma anormal em CSCs está a via de sinalização Cripto-1/NODAL. Cripto-1 (CR-1) atua como co-receptor para os ligantes da família TGF- β , incluindo NODAL e os fatores de crescimento e diferenciação 1 e 3 durante o processo de embriogênese, exercendo um papel crucial para a formação do eixo esquerdo-direito e no desenvolvimento da glândula mamária, como citado

anteriormente [21]. Durante a fase adulta, a via CR-1/NODAL encontra-se ativada apenas em alguns compartimentos que possuem células-tronco, tais como medula óssea, cólon e glândula mamária. No entanto, durante o processo de carcinogênese, esta via pode ser ativada reativada em células-tronco presentes na glândula mamária, dando origem às células-tronco tumorais da mama (*Breast Cancer Stem Cells* - BCSCs), culminando no desenvolvimento de câncer de mama. Além disso, esta via é capaz de interagir com outras vias de sinalização envolvidas na manutenção da população de BCSCs, incluindo Notch e Wnt/ β -catenina [21], [53].

Os primeiros conceitos sobre CSCs datam do início do século XIX a partir de um debate entre o médico patologista Rudolf Virchow e seu aluno Julius Cohnheim onde eles supõem que o desenvolvimento do câncer estaria ligado à presença de células indiferenciadas. Com base nas observações de Virchow e nos diferentes estudos que evidenciaram uma alta heterogeneidade morfológica em tumores, no início daquele século foi proposta a teoria das células-tronco tumorais a qual prega que o processo de carcinogênese ocorre de forma hierarquizada. Segundo este modelo, as CSCs ocupam o topo da hierarquia sustentando e promovendo o crescimento e progressão tumoral por meio de divisão simétrica/assimétrica. O *pool* de CSCs seria mantido por meio de divisão simétrica, a qual dá origem a duas células-filhas com o mesmo destino. Por outro lado, a divisão assimétrica produziria células-filhas com destinos distintos originando uma célula-tronco e uma transiente comprometida com diferenciação terminal originando, dessa forma, células tumorais mais diferenciadas as quais compõem a massa tumoral de forma majoritária (Figura 6A) [54], [55].

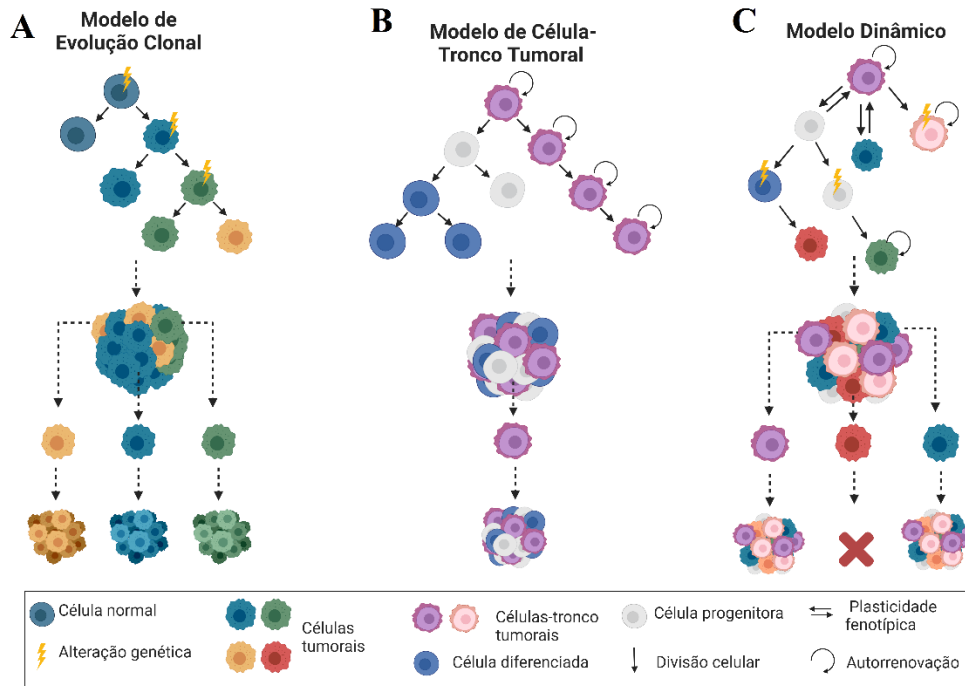
Em contrapartida, o modelo de evolução clonal conceitua que o processo de carcinogênese acontece por meio de acúmulo de mutações somáticas em genes reguladores tais como genes supressores de tumor e proto-oncogenes. Essas mutações seriam transmitidas de forma hereditária para as células-filhas as quais seriam expostas a diferentes condições de estresse originando, por conseguinte, diferentes clones com características distintas. Por meio de pressão seletiva, os clones mais adaptados às condições do microambiente tumoral seriam selecionados e, por meio de expansão clonal, promoveriam a heterogeneidade intratumoral e manutenção do tumor (Figura 6B). De acordo com esse modelo, qualquer célula tumoral tem a capacidade de iniciar o processo de transformação maligna, o que diverge do modelo de CSCs, no qual apenas as CSCs detêm essa propriedade de iniciação [56].

Embora os modelos de células-tronco tumorais e expansão clonal pareçam ser excludentes, torna-se cada vez mais evidente que células tumorais, por meio de pressões seletivas impostas pelo microambiente, possam transitar entre os dois fenótipos (tronco e diferenciado). De acordo com a hipótese clássica de CSC, o processo de diferenciação celular

é unidirecional e estático, estabelecendo que não-CSCs não são capazes de originar CSCs. No entanto, diferentes estudos têm destacado o alto potencial de plasticidade celular das CSCs as quais, por meio de alterações epi(genéticas) são capazes de transitar entre os fenótipos de CSCs e célula tumoral diferenciada. Além disso, estudos evidenciam que a subpopulação de CSCs é, por si só, amplamente heterogênea, composta por clones com diferente potencial de resistência, proliferativo, angiogênico e metastático. A partir dessas observações, foi proposto o modelo dinâmico (Figura 6C), onde os conceitos da hipótese de evolução clonal e hierárquico se complementam [57], [58].

Esse processo de transição celular é mediado por fatores intrínsecos (ex. epigenéticos) e extrínsecos (ex. microambiente). Em um estudo realizado por Chaffer e colaboradores [59] em células de câncer de mama *basal-like*, foi relatado, a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, que não-CSCs assumiram, de forma espontânea, um fenótipo de stemness. Os autores identificaram que o fator de transcrição ZEB-1 (regulador de EMT) seria o principal mediador desse processo de transição fenotípica. Além disso, Carette et al. [60] reprogramaram células KBM7 (derivadas de células leucêmicas em estágio blástico) em CSCs utilizando um vetor viral contendo os fatores de pluripotência (Oct3/4, Sox2, KLF4 e c-MYC). Os autores relataram que os clones KBM7-iPS1/2 expressavam marcadores de CSCs (*REX1*, *FGF4*, *Cripto-1*, *NANOG*, *GDF3*, *LIN28* e *ZIC3*).

Figura 6: Modelos de carcinogênese



Fonte: [61]

No que se refere à identificação de CSCs, assim como ocorre com células-tronco normais, este processo é baseado na identificação de marcadores de superfície celular. No entanto, mesmo dentro de um único tumor, a combinação de marcadores resulta na identificação de diferentes subpopulações de CSCs as quais são fenotipicamente distintas e podem variar de paciente para paciente a depender do perfil genético predominante do tumor [58]. Dessa forma, a falta de padronização desses marcadores dificulta os estudos das CSCs. A **tabela 1** resume os diferentes tipos de marcadores e suas combinações para identificação de CSCs em diversos tipos de câncer.

Tabela 1: Marcadores de superfície utilizados para a identificação de célula-tronco tumoral

Marcador	Câncer	Imunofenótipo
CD44	Mama	CD49f/CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /ALDH1 ⁺ /EpCAM ⁺
	Cólon	CD44 ⁺ /CD133 ⁺

	Pâncreas	CD24 ⁺ /CD44 ⁺ /EpCAM ⁺ /CD133 ⁺
CD24	Ovário	CD24 ⁺
	Colon	CD24 ⁺
	Pâncreas	CD24 ⁺ /CD44 ⁺ /ESA
CD49f	Mama	CD49f ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ⁻
CD133	Glioblastoma	CD133 ⁺ /CD44 ⁺
	Colorretal	CD133 ⁺
	Fígado	CD133 ⁺ /CD44 ⁺
	Próstata	CD133 ⁺ /CD44 ⁺
CD34	Hematológicos	CD34 ⁺ /CD38 ⁻

Fonte: [61]

Um dos primeiros relatos de CSCs foi feito por Lapidot et al. [62] ao avaliarem células de leucemia mieloide aguda (AML). Células derivadas de pacientes diagnosticadas com AML foram injetadas em camundongos SCID. Uma vez na circulação desses animais, parte das células migraram para a medula óssea passando a se proliferar extensivamente sob estímulo de tratamento com citocinas, resultando em um comportamento tumoral semelhante aquele observado nos pacientes.

Três anos depois, Bonnet e Dick [63] reportaram resultados semelhantes. Os autores identificaram uma subpopulação de células expressando o imunofenótipo CD34⁺/CD38⁻ em células de AML. Estas células representavam cerca de 0,1-1% da população de células tumorais e, quando inoculadas em animais imunocomprometidos (NOD/SCID), eram capazes de recapitular a heterogeneidade do tumor primário. Este processo se dá por meio de alterações (epi)genéticas e está ligada a capacidade de células tumorais em sobreviver e invadir tecidos vizinhos ou órgãos distantes [64].

As CSCs têm sido cada vez mais estudadas devido a sua relevância clínica, visto que essa subpopulação de células tumorais está relacionada a aspectos clínicos importantes como resistência terapêutica, recidiva e metástase, o que confere às CSCs um valor prognóstico [65].

2.5. Célula-tronco tumoral e resistência terapêutica no câncer de mama

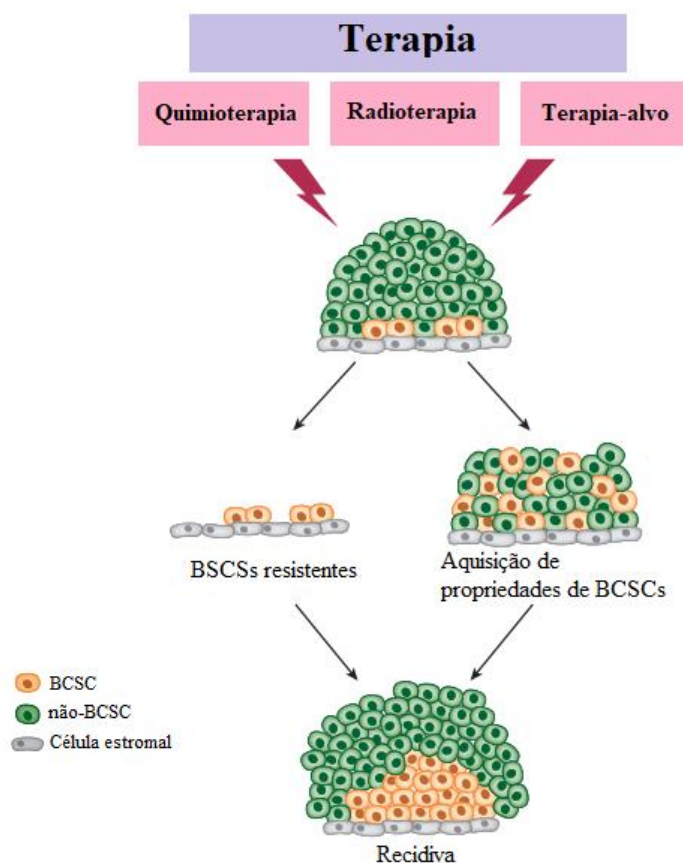
O primeiro relato da existência de CSCs em tumores sólidos foi feito a partir de estudos em câncer de mama. Al-Hajj e colaboradores [66] identificaram a presença de uma subpopulação de BCSCs, expressando o imunofenótipo CD44⁺/CD24⁻, capaz de recapitular a heterogeneidade do tumor primário quando injetadas em camundongos NOD/SCID. Os autores relataram que apenas 100 células expressando o imunofenótipo CD44⁺/CD24⁻ foram necessárias para formação de tumor, ao passo que milhares de células expressando imunofenótipos alternativos não capazes de formar tumores. Outros marcadores de superfície para o isolamento de BCSCs foram identificados e estão resumidos na tabela 1.

Diferentes estudos têm sido desenvolvidos durante as últimas décadas com o intuito de identificar e explorar os mecanismos que sustentam essa subpopulação de BCSC [16], [67], [68]. A identificação e conhecimento da biologia dessas células é de extrema importância, pois permite o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas no câncer de mama [69].

Atualmente há diferentes abordagens terapêuticas convencionais para o tratamento de pacientes com câncer de mama, como por exemplo: cirurgia oncológica, quimio e radioterapia, hormonioterapia, terapia alvo-dirigida, etc. No entanto, vários pacientes ainda apresentam baixa taxa de resposta à terapia ou desenvolvem resistência, sendo esse cenário mais acentuado em pacientes com TNBC, dado a escassez de opções terapêuticas para o tratamento desse subtipo molecular, como citado anteriormente [70].

As BCSCs apresentam um papel importante no desenvolvimento de resistência à terapia e recidiva do tumor. Quando tumores da mama são expostos a agentes antineoplásicos, há uma pressão seletiva no microambiente tumoral, o que pode induzir células tumorais diferenciadas a desenvolverem mecanismos de defesa e evasão terapêutica. Um desses mecanismos é o processo de dediferenciação, pelo qual células tumorais diferenciadas adquirem características de BCSCs tornando-se menos responsivas às terapias convencionais [71]. Estas células geralmente estão na fase G₀ do ciclo celular, em um estado de aquiescência, caracterizado por baixa atividade mitótica [72]. Visto que a maioria dos agentes antineoplásicos atinge majoritariamente células com alta atividade mitótica, as BCSCs são capazes de permanecer no leito tumoral após a terapia convencional e, quando o microambiente tumoral se torna propício, essas células são capazes de se replicar e recapitular a heterogeneidade do tumor primário [71] (Figura 7).

Figura 7: Desenvolvimento de resistência terapêutica mediado por BCSCs.



Fonte: Modificado de [71]

Dessa forma, novas abordagens terapêuticas que considerem a existência das BCSCs devem ser investigadas no intuito de evitar o desenvolvimento de resistência às terapias convencionais e, em último caso, a recidiva do tumor.

2.6. Correlação entre a expressão de iNOS/COX2, HIF-1 α e células-tronco tumorais

A manutenção e promoção da subpopulação de BCSC dependem de uma complexa rede de vias de sinalização que promovem o fenótipo de *stemness* caracterizado pelas capacidades de autorrenovação e diferenciação. Dentre essas vias, a interligação entre as vias iNOS (Óxido Nítrico Sintase Induzida) e COX2 (Ciclooxigenase 2) tem sido evidenciada nas últimas décadas por ser capaz de induzir a população de BCSCs. O produto de iNOS, óxido nítrico (NO), é capaz de ativar COX2, ao passo que o produto desta enzima, PGE2 (prostaglandina E2), induz iNOS por meio de uma retroalimentação positiva [73].

Células TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-468 tratadas por 24 h com o doador de NO, DETA/NO, ou PGE2 apresentaram aumento na síntese de IL-6, ao passo que a síntese de IL-8

só foi induzida apenas nas células MDA-MB-231. Ambas citocinas, IL-6 e IL-8, são capazes de promover a subpopulação de BCSC. Ao passo que a IL-8 configura-se como um potente promotor de sobrevivência celular e angiogênese, a IL-6 é capaz de ativar importantes vias de sinalização, tais como MAPK, PI3K e STAT3, associadas com a promoção de BCSC e prognóstico reservado em pacientes com câncer de mama [73]–[75].

Ademais, Switzer e colaboradores [76] avaliaram os efeitos do NO em células TNBC MDA-MB-468. Seus resultados mostraram que, quando expostas a altas concentrações de DETA/NO (500 μ M), houve a ativação de vias relacionadas a BCSCs, tais como a via p-EGFR, c-Myc, Scr, CD44 e β -catenina, além de induzir a expressão de COX2, a qual é capaz de promover BCSCs por meio da ativação do eixo EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT [77]. Além disso, o tratamento com DETA/NO está associado com o desenvolvimento de resistência à terapia com DOX e paclitaxel em células MDA-MB-231 [78].

Outrossim, a co-expressão de NOS2/COX2 foi avaliada em uma coorte de 209 pacientes com câncer de mama provindas de diferentes hospitais do estado de Maryland, EUA. As pacientes com tumores que não expressavam o receptor para estrógeno (ER-), mas que superexpressavam NOS2 e COX2 (*PGT2*) estavam associadas com pior prognóstico, apresentando uma redução significativa na curva de sobrevivência quando comparadas às demais pacientes com ER-, mas que superexpressam apenas NOS2 ou COX2, ou que não expressavam nenhum desses marcadores [73].

Esses estudos mostram que a ativação de NOS2 e COX2 está associada a eventos pró-tumorais que induzem a população de BCSCs impactando, de forma negativa, no prognóstico das pacientes com TNBC. Portanto, NOS2 e COX2 são potenciais candidatos para o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas para o tratamento de pacientes TNBC.

Outro marcador relacionado às CSCs é fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), o qual é induzido em nichos hipóxicos [79], estando este fator elevado em células TNBC quando comparado a células não transformadas [80]. HIF-1 α é capaz de ativar vias de sinalização que estão envolvidas na manutenção de CSCs, tais como Notch e Wnt/ β -catenina, além de induzir marcadores de pluripotência em BCSCs como NANOG, OCT4 e SOX2 [79].

Os fatores induzíveis por hipóxia (ex. HIF-1 α) são necessários para o desenvolvimento do perfil de resistência de BCSCs à quimioterapia em linhagens de TNBC (MDA-MB-231, SUM-149, SUM-159). Esses fatores são capazes de promover a subpopulação de BCSCs ao ativar as vias de IL-6 e IL-8, estando a sua superexpressão associada a uma redução na curva de sobrevivência de pacientes TNBC. O uso de inibidores de HIF associado a agentes quimioterápicos está associado a uma melhora na resposta terapêutica [81].

2.7. Abordagens terapêuticas

Embora diferentes esforços tenham sido feitos nas últimas décadas objetivando avanços no campo da oncologia, principalmente no que se refere ao tratamento de pacientes com câncer de mama, o desenvolvimento de resistência às terapias convencionais ainda é um fator preocupante no âmbito clínico [82]. Esse cenário é particularmente mais crítico quando se refere àquelas pacientes acometidas por tumores TNBC, visto que nesses casos as terapias convencionais, tais como quimio e radioterapia, são os tratamentos de primeira linha [83], sendo a quimioterapia a única opção terapêutica para pacientes com tumores TNBC avançados [84].

Dessa forma, estudos com o objetivo de aprimorar e/ou desenvolver novas intervenções terapêuticas é de extrema importância. A associação de drogas antitumorais tem sido amplamente aplicada na clínica no intuito de evitar o desenvolvimento de resistência às terapias. Drogas antitumorais com mecanismos de ação diferentes têm sido associadas com a intenção de ‘atacar’ as células tumorais por diferentes vias, reduzindo, por conseguinte, as chances dessas células resistir ao tratamento [85]. Por exemplo, a combinação de agentes alquilantes (ex., ciclofosfamida) e antimetabólitos (ex., metotrexato) é geralmente utilizada na clínica para tratar pacientes com câncer de mama visando diminuir as chances de recidiva tumoral [86].

A abordagem de tratamento combinado também é utilizada em pacientes com tumores TNBC. Em geral, o esquema AC-T (Antraciclinas, Ciclofosfamida e Taxanos) é aplicado na quimioterapia neoadjuvante (QTNA). No entanto, novos esquemas contendo drogas derivadas da platina (ex., CIS e carboplatina) tem mostrado mais eficácia em atingir resposta patológica completa (pCR) nos pacientes TNBC, quando comparado àqueles esquemas que não contém essas drogas, como é o caso do esquema AC-T [87]. No entanto, o número de pacientes que apresentam doença residual (DR) após a QTNA ainda é preocupante [88]. As células residuais são representadas, ao menos em parte, por BCSCs as quais são intrinsecamente resistentes às terapias convencionais, sendo capazes de permanecer no leito tumoral e potencialmente resultar em recidiva e metástase [89]. Essa evidência é sustentada pelo fato de que pacientes com DR apresentam maiores chances de desenvolver metástases [90]. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novos agentes com capacidade de eliminar BCSCs e que possam atuar como coadjuvante das drogas convencionais já utilizadas na prática clínica, resultando na possível erradicação total do tumor e, por consequência, reduzir drasticamente as chances de recidiva.

Sulforafano (SFN), composto natural abundante em vegetais crucíferos, tais como brócolis e couve flor, tem sido amplamente estudado nas últimas décadas devido a sua vasta atividade biológica (Jabbarzadeh Kaboli et al., 2020). Bianco e colaboradores [16] reportaram

que o SFN é capaz de atingir as BCSCs ao estudar os efeitos desse composto natural em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os autores mostraram que o tratamento com 7,5 uM de SFN foi capaz de reduzir 78% do potencial de células TNBC MDA-MB-231-Luc-D3H1 em formar mamoesferas secundárias, o que evidencia a capacidade desse composto natural em regular negativamente a capacidade de autorrenovação das BCSCs. Além disso, ainda no mesmo estudo, foi relatado, por meio de análises feitas em um modelo xenográfico de TNBC, que o tratamento com SFN resultou na diminuição de 24% na formação de tumores, quando administrado duas semanas antes da inoculação das células tumorais.

Portanto, por apresentar capacidade anti-CSCs, estudos de combinação de drogas têm utilizado o SFN como um dos agentes de intervenção no intuito de melhorar a resposta terapêutica de diferentes linhagens de câncer de mama [92]–[94]. O tratamento combinado de SFN com nano-metformina resultou na diminuição de marcadores de BCSCs, CD44, Wnt1 e B-catenina, em duas diferentes linhagens de câncer de mama: MCF-7 e BT474. Além disso, a combinação de ambos compostos aumentou significativamente a apoptose nas linhagens supracitadas, estando este aumento de morte celular associado a elevação na expressão do gene pró-apoptótico, Bax [93].

Outrossim, Sinha e colaboradores [94] estudaram os efeitos da associação do SFN com a CIS em linhagens TNBC, MDA-MB-231 e MDA-MB-468. Seus estudos mostraram que a terapia combinada SFN-CIS reduziu a proliferação celular das linhagens estudadas, além de induzir morte celular. No mesmo estudo, os autores reportaram que a combinação dos dois compostos foi capaz de reduzir a expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquima, tais como ZEB1, N-caderina, Snail e Slug, além de reprimir a resistência ao tratamento com CIS por meio da ativação da via das sirtrulinas.

Portanto, considerando os estudos supracitados e que agentes quimioterápicos, tais como DOX e CIS, são as principais opções disponíveis para pacientes TNBC em estado avançado, tivemos como objetivo principal estudar os efeitos da associação do SFN com esses agentes antitumorais e investigar se essas combinações são capazes de atingir a população de BCSC e, conseqüentemente, melhorar a resposta terapêutica das diferentes linhagens TNBC estudadas neste projeto de mestrado.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Sensibilizar TNBC aos efeitos de tratamentos quimioterápicos convencionais pela inibição da população de CSCs.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a ação do SFN e terapias convencionais (DOX e CIS) na viabilidade de linhagens celulares de câncer de mama humano TNBC dos subtipos BL1 (MDA-MB-468), BL2 (HCC70), M (MDA-MB-231) e LAR (MDA-MB-453);

Avaliar a citotoxicidade do SFN de forma individual ou combinada com DOX e CIS nas diferentes linhagens TNBC;

Analisar os efeitos da terapia solo ou combinada na função celular: viabilidade, clonogenicidade, morte celular;

Investigar se há inibição de CSCs através de alteração na expressão de marcadores de pluripotência, tais como *CR-1* e *OCT4*;

Avaliar os efeitos da terapia com SFN isoladamente na expressão de *NOS2* e *COX2* e estabilização de HIF-1 α .

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultura de Células

As linhagens MDA-MB-468 (HTB-132TM), HCC70 (CRL-2315TM), MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) e MDA-MB-453 (HTB-131TM) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C.

4.2. Agentes Terapêuticos

D,L-Sulforafano (SFN) (Cat# S4441) e Cisplatina (CIS) (Cat# BP809) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). SFN foi diluído em DMSO a uma concentração estoque de 10 mM, e CIS foi reconstituída em água ultrapura a uma concentração estoque de 1,65 mM. Doxorubicina (DOX) foi gentilmente cedida pela Farmácia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP e alíquotas de 5 mg/mL foram feitas e mantidas sob -20°C .

4.3. Ensaio de MTT

As células TNBC (5×10^3 células por poço) foram semeadas em placa de 96 poços por 24 h, depois tratadas com diferentes concentrações de DOX (0,5; 1; 2,5; 5; 8 e 10 μM) por 48 h, e CIS (1; 2,5; 5; 10; 15 e 20 μM) ou SFN (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 μM) isoladamente, por 72 h. Posteriormente, as células foram semeadas na mesma densidade (5×10^3 células por poço) e pré-tratadas com 5 ou 10 μM de SFN por 1h. Após o período de pré-tratamento, as células foram tratadas com 5 ou 10 μM de SFN de forma individual ou em combinação com 10 μM de CIS por 72 h. Em seguida, a viabilidade celular foi medida usando o ensaio MTT de acordo com as instruções do kit (Cat# M5655-1G; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.4. Ensaio de Atividade de Caspases

As células (3×10^4 células por poço) foram semeadas em placas de 12 poços por 24h, depois pré-tratadas com 5 ou 10 μM de SFN por 1h. Após o período de pré-tratamento, as células foram tratadas com 5 ou 10 μM de SFN de forma individual ou em combinação com 10 μM de CIS por 72 h. Em seguida, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em RPMI suplementado com 10% BFS contendo o *Kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Assay Assay* (Cat#: C10427; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) seguindo as instruções do fabricante. A fluorescência celular foi medida usando o citômetro de fluxo Attune (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e analisada usando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA).

4.5. Ensaio de Exclusão de Trypan Blue

As células (3×10^4 células por poço) foram semeadas em placas de 12 poços por 24h, depois pré-tratadas com 5 ou 10 μM de SFN. Após o período de pré-tratamento, as células foram tratadas com 5 ou 10 μM de SFN de forma individual ou em combinação com 10 μM de

CIS por 72 h. Ao final do tratamento, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 100 μL de PBS. Em seguida, 10 μL da suspensão celular foram corados com 10 μL de azul de tripano a 0,2% à temperatura ambiente e imediatamente avaliados em microscópio de luz invertida. As células com núcleos marcados em azul foram consideradas células mortas.

4.6. Ensaio Clonogênico

As células de câncer de mama foram semeadas (3×10^4 células por poço) em placas de 12 poços durante 24 h e posteriormente pré-tratadas com 5 ou 10 μM de SFN. Após o período de pré-tratamento, as células foram tratadas com 5 ou 10 μM de SFN de forma individual ou em combinação com 10 μM de CIS por 72 h. Após a remoção do meio contendo o fármaco, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e semeadas em placas de 6 poços em baixa densidade (500 células/poço). As células foram cultivadas por 10 ou 12 dias e o meio foi renovado a cada dois dias. As colônias foram coradas com 0,1% de cristal violeta. O número de colônias em uma determinada área foi contado para cada condição.

4.7. Ensaio de Indução de COX2 e NOS2

As células foram semeadas a 1×10^6 em placas de 100 mm e cultivadas por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com uma mistura de citocinas (CM) composta por 100 U/mL de IFN- γ (Cat# 285-IF-100/CF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 10 ng/mL de TNF- α (Cat# 210-TA-100/CF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e 10 ng/mL de IL-1 β (R&D Systems, Catalog# 201-LB-025/CF) sozinho ou em combinação com 5 μM ou 10 μM de SFN por 48 h. O RNA total foi coletado no final do tratamento para análise da expressão gênica.

4.8. Análise de Expressão Gênica por Transcrição Reversa-Quantitativa (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído das células tratadas com CIS (10 μM) e SFN (5 ou 10 μM) isoladamente ou em combinação usando o reagente Tryzol (Cat# 15596018; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de RNA foi determinada usando um espectrofotômetro NanoDrop 1.000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O RNA total (2 μg) foi transcrito em cDNA usando o kit RNA-to-cDNA de alta capacidade (Cat# 4387406; Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) de acordo com o protocolo dos fabricantes. O cDNA foi então submetido à análise de expressão gênica por meio de RT-qPCR utilizando os primers para TDGF1 (CR-1, F-CACGATGTGCGCAAAGAGAA, R-TGACCGTGCCAGCATTTACA), POU5F1 (OCT-4,

F-TCTCCCCATGCATTCAAACCTGAG, R-CCTTTGTGTGTTCCCAATTCCTTC), CDH2 (N-caderina, F- TGACACTGTGGACCCTGATG, R-GCCGCTTTAAGGCCCTCAT). A RT-qPCR foi realizada em MicroAmpR Fast 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems, Ref 4346906, EUA) usando PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Ref 4367659, Reino Unido) e uma máquina de PCR em tempo real ABI StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. As condições de reação foram as seguintes: 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Cada amostra foi processada em duplicatas. Para os genes *NOS2* (R-CGATGCACAGCTGAGTGAAT; F - ATGCTCAGCTCATCCGCTAT) e *PTGS2* (*COX2*, R - AAAATTCCGGTGTGAGCAG; F - TGAGTGTGGGATTTGACCAG) o RNA total foi extraído das células de câncer de mama após o tratamento com CM sozinho ou em combinação com 5 ou 10 µM de SFN usando o reagente TRIzol (Ambion, Ref, 15596018, Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de RNA foi determinada usando um espectrofotômetro NanoDrop 1.000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). O RNA total (3 µg) foi transcrito em cDNA usando o RNA to cDNA EcoDry™ Premix (Takara, Cat.# 63954) de acordo com o protocolo dos fabricantes. A reação foi realizada em placa de PCR de 96 poços (Applied Biosystems, Cat.# 4316813 Life Technologies) usando o kit SensiFAST SYBR Hi-ROX (Meridian Bioscience, Cat.# BIO-92005) e a máquina QuantStudio 3 PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de reação foram as seguintes: 2 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 5 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C. Cada amostra foi processada em triplicatas. GAPDH foi usado como gene housekeeping para normalização dos dados. A expressão gênica relativa foi representada pelo *fold change* o qual foi calculado com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [95].

4.9. Análise de Proteínas por Eletroforese em Nano-Capilares (Wes)

As células foram homogeneizadas em *M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific, Cat.# 78501) de acordo com as instruções do fabricante e os westerns foram realizados usando o sistema de Western blotting automatizado Wes (ProteinSimple, San Jose, CA) de acordo com os protocolos do fabricante. Lisados contendo 4 ng/µl de proteína total foram separados por eletroforese em cassetes nano-capilares (Cat# SM-W002; ProteinSimple, Inc., San Jose, CA, USA). Anticorpos primários contra HIF-1α (Cat# 610959; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; 1:100) foram usados. A quantificação das

áreas de pico e a reconstrução da imagem do gel foram realizadas usando o software Compass (ProteinSimple, San Jose, CA). Os padrões fluorescentes que indicam três pesos moleculares diferentes foram executados em cada capilar e GAPDH (Cat# sc47724; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; 1:4000) foi usado como controle endógeno.

4.10. Estatística

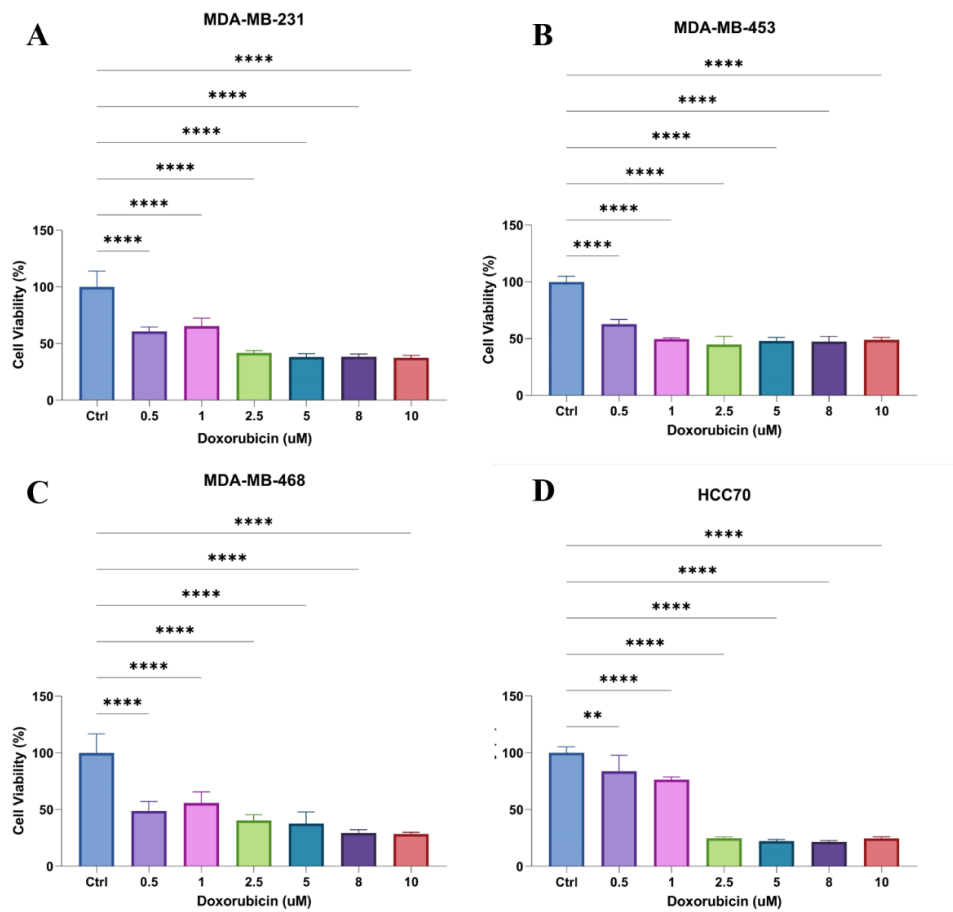
Os dados foram representados como a média±DP ou SEM. As diferenças entre os grupos foram examinadas usando o teste paramétrico ANOVA. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5. Resultados e Discussão

5.1. As linhagens TNBC testadas são intrinsecamente sensíveis à Doxorrubicina

Antraciclinas (ex., DOX) juntamente com taxanos (ex. paclitaxel) e drogas à base de platina (ex., CIS) são atualmente usadas em regimes de tratamento neoadjuvante em pacientes com TNBC [96]. Neste estudo, avaliamos a resposta de células TNBC cultivadas em monocamadas bidimensionais (2D) ao tratamento com DOX. Os resultados revelaram que DOX foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular pelo ensaio de MTT de todas as linhagens TNBC testadas após 48 h de tratamento (Figura 8 A-D). Notavelmente, doses baixas ($\leq 2,5 \mu\text{M}$) de DOX foram capazes de impactar consideravelmente a viabilidade das células TNBC, as quais atingiram uma fase de platô quando expostas a concentrações maiores que $2,5$ e menores que $10 \mu\text{M}$.

Figura 8: Efeitos da DOX na viabilidade de células TNBC (A-D)



Os dados representam dois experimentos independentes realizados em quadruplicata (n=2). $P < 0.05$ - *; $P < 0.005$ - **; $P < 0.0001$ - ****. ONE-WAY ANOVA.

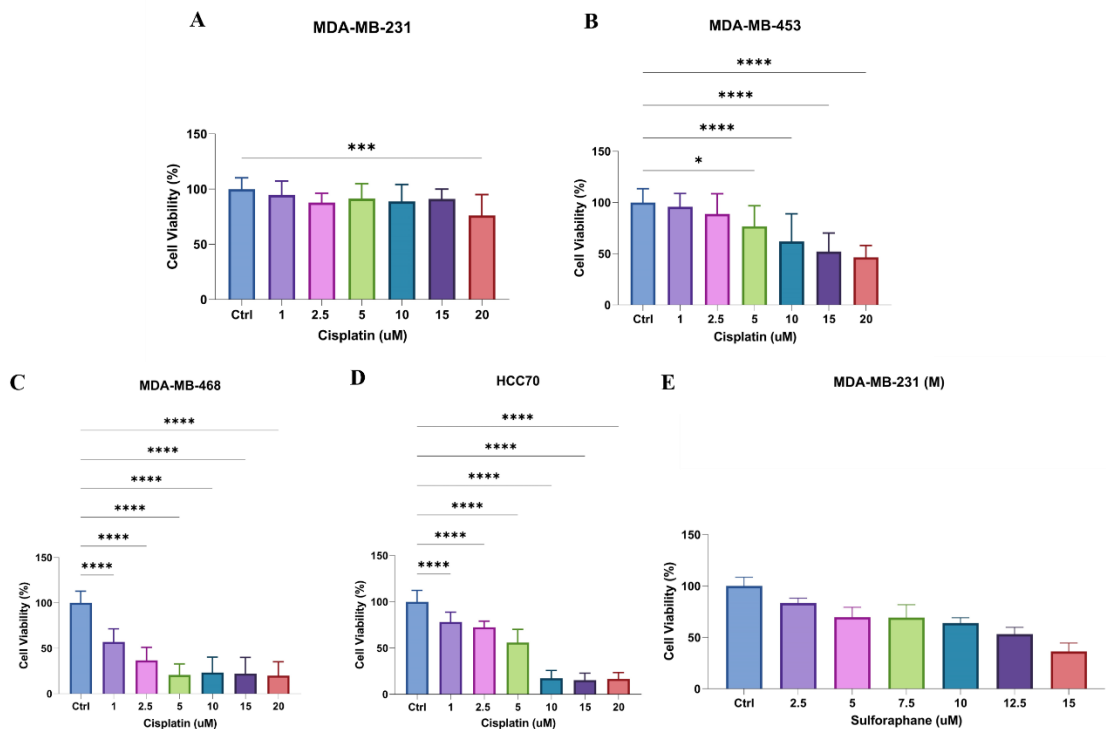
Embora os pacientes com TNBC sejam altamente responsivos à poliquimioterapia neoadjuvante, os efeitos de cada droga isoladamente são desconhecidos. Martin e colaboradores [96] avaliaram os efeitos de docetaxel, carboplatina, DOX e a combinação de docetaxel mais carboplatina em modelos de xenoinxertos derivados de pacientes (PDXs) TNBC que não foram previamente expostos à quimioterapia. Interessantemente, eles relataram que apenas um dos nove modelos PDX (11,1%) mostrou sensibilidade à DOX, enquanto oito dos nove modelos PDX (88,9%) mostraram sensibilidade ao docetaxel e carboplatina como agentes únicos. Além disso, Lovitt e colaboradores [97] relataram que células MDA-MB-231 cultivadas em 2D ou em culturas tridimensionais (3D) exibiram sensibilidade diferente à terapia com DOX. Enquanto a cultura em 2D foi sensível à DOX e sua capacidade de proliferação celular foi bastante impactada com o tratamento, a cultura 3D mostrou-se mais resistente e exibiu menores taxas de inibição de proliferação. Além disso, culturas 3D de células MDA-MB-231 apresentaram regulação positiva da expressão de alguns componentes da matriz extracelular

(ECM), incluindo β 1-integrina. Os autores sugeriram que a interação célula-ECM desempenhou um papel fundamental na resistência à DOX, especialmente por induzir a expressão de β 1-integrina. Esses achados destacam a importância da interação entre ECM e células tumorais na resistência à terapia. Portanto, embora todas as linhagens celulares TNBC investigadas no presente estudo tenham sido amplamente responsivas à DOX, uma investigação mais aprofundada se faz necessária, preferencialmente realizada em modelos 3D, os quais mimetizam de forma mais fidedigna o microambiente tumoral, quando comparados a modelos 2D.

5.2. As linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-453 são resistentes à Cisplatina

Após avaliar a responsividade das linhagens celulares à DOX, também avaliamos a sensibilidade das mesmas células ao tratamento com CIS por 72 h, por meio do ensaio MTT (Figura 9 A-D). Conforme mostrado na Figura 9 A-B, as linhagens MDA-MB-231 (M) e MDA-MB-453 (LAR) apresentaram alto e moderado perfil de resistência à CIS, respectivamente. Por outro lado, ambas as células do tipo basal MDA-MB-468 (BL-1) e HCC70 (BL-2) foram amplamente responsivas à terapia com CIS (Figura 9 C-D).

Figura 9: Efeitos de CIS nas linhagens de TNBC após 72 h de tratamento (A-D).



Os dados representam três experimentos independentes realizados em quadruplicata (n=3), exceto os dados referentes ao tratamento com Sulforafano (n=1). P < 0.05 - *; P < 0.005 - **; P < 0.0001 - ****. ONE-WAY ANOVA.

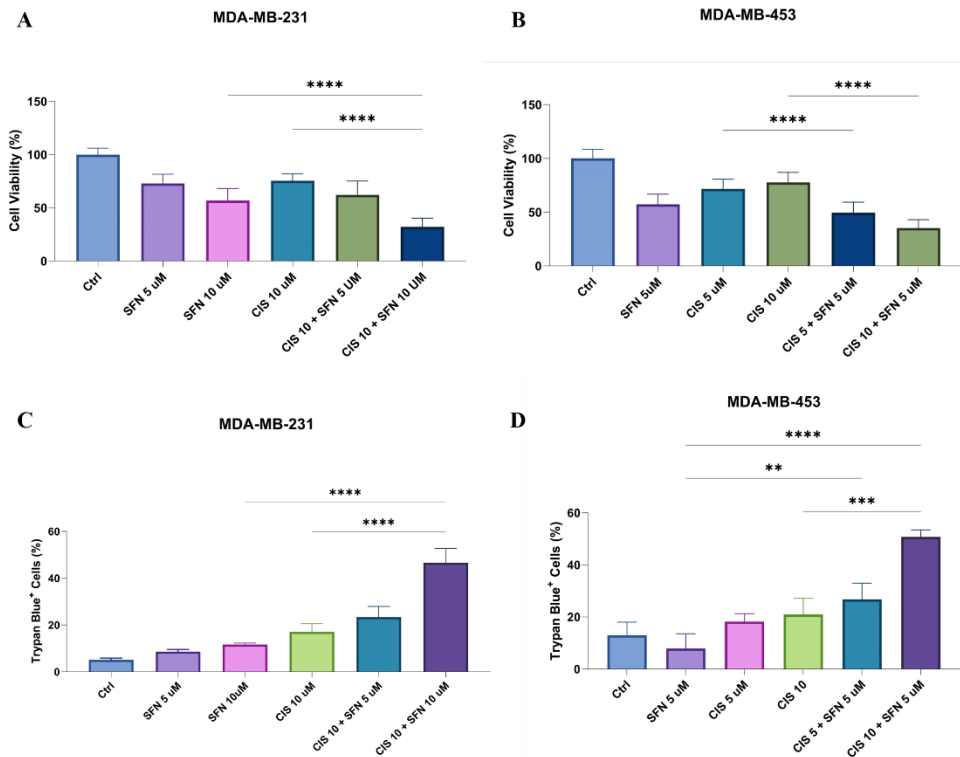
Esses resultados estão de acordo com os relatos de Lehmann e colaboradores [42] os quais mostram que as células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 são mais resistentes à CIS quando comparadas às células basais. Eles também relataram que doses superiores a 10 μ M de CIS foram necessárias para atingir a concentração inibitória média (IC50) para MDA-MB-231 e MDA-MB-453, enquanto doses inferiores a 10 μ M foram necessárias para determinar os valores de IC50 para as linhagens basais (MDA-MB-468 e HCC70), destacando assim o fenótipo de resistência dos subtipos M e LAR. Por esse motivo, selecionamos as linhas celulares MDA-MB-231 e MDA-MB-453 para serem utilizadas nos experimentos a seguir no intuito de avaliar se SFN seria capaz de reverter o perfil de resistência dessas células a CIS.

Avaliamos também o perfil de resposta das células MDA-MB-231 ao tratamento com concentrações crescentes de SFN por 72 h e, como evidenciado na Figura 9E, essas células foram sensíveis ao tratamento com esse nutracêutico de forma dose-dependente, em congruência com os dados obtidos por Pledgie-Tracy et al. [98].

5.3. Sulforafano é capaz de sensibilizar as células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 ao tratamento com Cisplatina

Com base nos resultados anteriores, determinamos as doses de SFN potencialmente capazes de reverter o perfil de resistência das células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 à CIS. O ensaio MTT foi usado para avaliar se o tratamento com SFN isoladamente ou em combinação com CIS seria capaz de diminuir a viabilidade das células TNBC. Conforme mostrado na Figura 10, a combinação de SFN e CIS reduziu significativamente a viabilidade celular quando comparada a cada composto usado individualmente. A maior inibição foi encontrada no grupo tratado com a combinação SFN 10 μ M + CIS 10 μ M (67,9% de inibição nas células MDA-MB-231 e 64,74% nas células MDA-MB-453) (Figura 10 A-B). Em seguida, avaliamos a integridade de membrana celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripano e observamos que a combinação SFN 10 μ M + CIS 10 μ M aumentou significativamente a porcentagem de células azul de tripano positivas (46,6% nas células MDA-MB-231 e 50,7 % nas células MDA-MB-453) (Figura 10 C-D).

Figura 10: Efeitos do tratamento com SFN de forma individual ou em combinação com CIS na viabilidade de células M e LAR (A-B) e integridade de membrana (C-D) após 72 h de tratamento.



Os dados do ensaio de MTT representam três experimentos independentes realizados em quadruplicata (n=3). E os dados referentes ao azul de tripan representam três ensaios independentes para a linhagem MDA-MB-231 (n=3) e um ensaio para a linhagem MDA-MB-453 (n=1), todos realizados em triplicatas. P < 0.05 - *; P < 0.005 - **; P < 0.0001 - ****. ONE-WAY ANOVA.

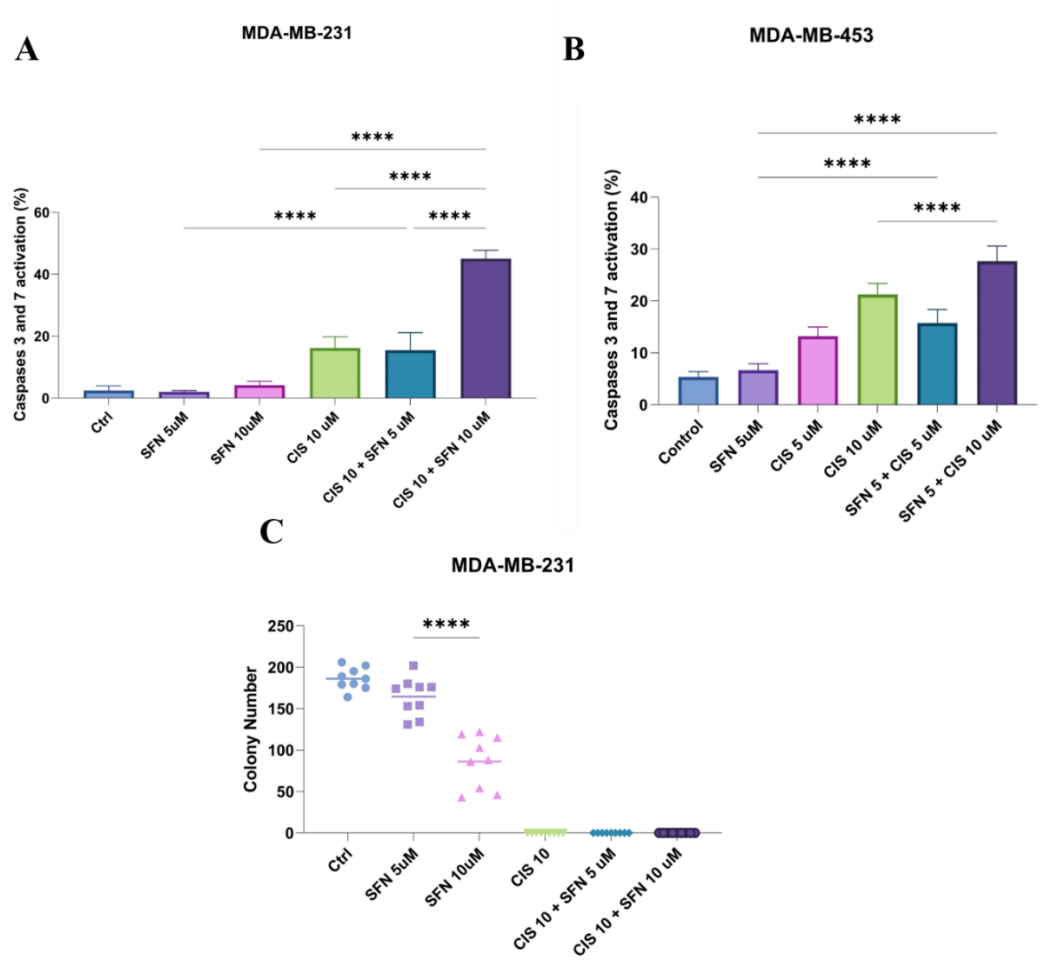
Em seguida, analisamos possíveis mecanismos associados à diminuição da viabilidade celular. Observamos que a combinação SFN-CIS foi capaz de aumentar a ativação de apoptose inicial após 72 h de tratamento. Células MDA-MB-231 tratadas com a combinação de SFN 10 μ M + CIS 10 μ M apresentaram ativação significativa das caspases 3 e 7 (45% de ativação), semelhante às células MDA-MB-453 tratadas com SFN 5 μ M + CIS 10 μ M (27,65% de ativação) (Figura 11 A-B). Resultados semelhantes foram encontrados por Sinha e colaboradores [94], em que a combinação SFN 5 μ M + CIS 10 μ M e SFN 10 μ M + CIS 10 μ M

inibiu sinergicamente a proliferação de células TNBC após 48 h de tratamento, além de induzir significativamente apoptose em células MDA-MB-231 e MDA-MB-468.

Esses resultados evidenciam a capacidade do SFN em reverter o perfil de resistência das células TNBC ao tratamento com CIS ao potencializar a ação desta droga nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e MDA-MB-453. Esse feito pode estar relacionado às diferentes propriedades antitumorais do SFN, como indução de estresse oxidativo e aumento da ativação de apoptose [16], [99], [100]. Além disso, a melhora da quimiossensibilidade à CIS pode estar relacionada à capacidade do SFN em consumir a glutathiona (GSH) durante seu processo de detoxificação, originando o complexo GSH-SFN o qual é eliminado pelas células. A GSH também está envolvida no processo de detoxificação de CIS [101]. Dessa forma, ao consumir GSH, SFN provavelmente inibe a detoxificação de CIS aumentando a sua biodisponibilidade e, por conseguinte, sua ação citotóxica.

Adicionalmente, Sinha et al. [94] estudaram a capacidade de formação de colônias das células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 por meio do método 3D agar/agarose. A combinação CIS μM 10 + SFN 10 μM foi capaz de diminuir, de forma considerável, o potencial de formação de colônias das células, ao passo que as células tratadas apenas com SFN formaram colônias significativamente maiores quando comparadas às células tratadas com a terapia combinada. No presente projeto, utilizamos um método 2D para avaliar a capacidade de formação de colônias, em que as células foram pré-tratadas com os compostos isoladamente ou em combinação por 72 h, e as células que resistiram ao tratamento foram re-plaqueadas em baixa densidade e observadas por um período de 10-12 dias. SFN foi capaz de reduzir o potencial clonogênico das células MDA-MB-231, de forma dose-dependente. Por outro lado, nenhuma colônia foi observada nas células tratadas com CIS de forma individual ou em combinação com SFN (Figura 11 C). Da mesma forma, Sinha et al. [94] relataram que as células tratadas apenas com SFN mantiveram seu potencial clonogênico.

Figura 11: Efeitos do tratamento combinado SFN-CIS na ativação das caspases 3 e 7 (A-B) e no potenciais clonogênico das células TNBC (C).



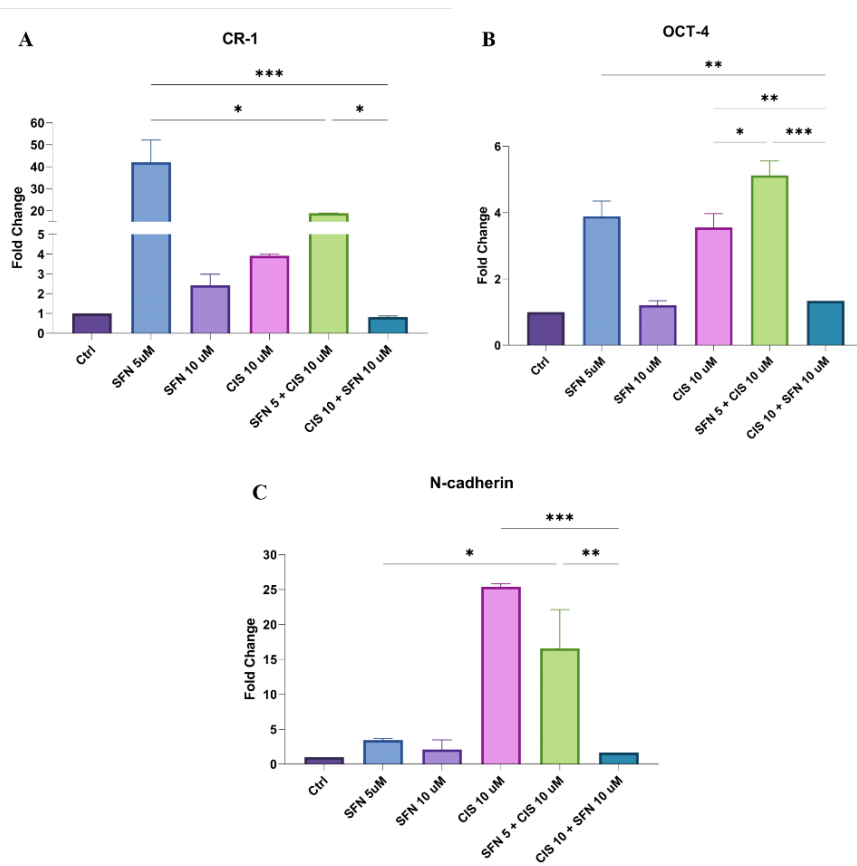
Os dados representam três experimentos independentes realizados em triplicatas (n=3). $P < 0.05$ - *; $P < 0.005$ - **; $P < 0.0001$ - ****. ONE-WAY ANOVA.

No entanto, mais estudos são necessários para investigar o perfil das células que sobrevivem aos tratamentos com CIS. Essa abordagem será crucial, uma vez que CSCs remanescentes após o tratamento poderão recapitular a heterogeneidade do tumor a longo prazo. Além de conhecer a população das células sobreviventes ao tratamento com CIS, precisamos estender o tempo de cultivo das células resistentes após a remoção da droga, oferecendo condições ideais para a sua recuperação. A importância desta investigação é reforçada pelos resultados de Koh et al.[102] os quais mostraram que a linhagem MDA-MB-231 enriquecida para CSC é mais resistente ao tratamento com CIS do que sua linhagem celular parental, indicando que as CSCs devem ter permanecido nos grupos tratados apenas com CIS, mesmo não sendo observada a formação de clones resistentes.

5.4. Os regimes terapêuticos modulam a expressão de genes relacionados a CSC e EMT em células MDA-MB-231

A fim de investigar se o tratamento com SFN de forma individual ou em combinação com CIS poderia impactar o perfil de expressão de alguns genes associados a pluripotência e EMT, realizamos uma análise de expressão gênica por RT-qPCR. Curiosamente, as células MDA-MB-231 tratadas com 5 μ M de SFN exibiram um aumento considerável na expressão do gene embrionário *CR-1*, um marcador de pluripotência. Além disso, as células tratadas com 10 μ M de SFN ou 10 μ M de CIS individualmente também exibiram um aumento na expressão de *CR-1* quando comparado a seus respectivos controles. No entanto, quando SFN 10 μ M + CIS 10 μ M foram usados em combinação como abordagem terapêutica, a expressão relativa do gene *CR-1* foi drasticamente reduzida, atingindo valores semelhantes ao grupo controle (Figura 12 A). Ademais, a expressão gênica de *OCT-4*, *downstream* a *CR-1*, também foi avaliada e, da mesma forma que *CR-1*, este marcador de pluripotência teve sua expressão significativamente aumentada quando as células foram tratadas com 5 μ M de SFN e 10 μ M de CIS isoladamente, enquanto o tratamento combinado SFN 10 μ M + CIS 10 μ M regulou negativamente a sua expressão (Figura 12 B). A expressão gênica do marcador de EMT, *N-caderina*, também foi avaliada e observamos que SFN impediu a superexpressão deste gene induzida por CIS (Figura 12 C).

Figura 12: Efeitos das terapias individuais e combinadas na expressão de marcadores de pluripotência e EMT (A-C) após 72 h de tratamento.



Os dados representam um experimento realizado em duplicata (n=1). $P < 0.05$ - *; $P < 0.005$ - **; $P < 0.0001$ - ****. ONE-WAY ANOVA.

Um dos fatores envolvidos nos processos regulatórios da expressão de *CR-1* e *OCT4* é o fator nuclear de célula germinativa (GCNF). Este fator de transcrição é capaz de se associar à região promotora dos genes e recrutar DNA metiltransferases (DNMTs) promovendo, dessa forma, hipermetilação da região promotora e culminando no silenciamento da expressão do gene alvo. GCNF é capaz de se ligar à região DR0 no promotor de *CR-1* inibindo-o, sendo também necessário para inibir a expressão gênica de *OCT-4* [103], possivelmente por meio de metilação da região promotora desses genes. Além disso, GCNF está elevado em células MDA-MB-231 [103], o que pode estar associado aos baixos níveis de *CR-1* e *OCT-4* no grupo não tratado. O aumento na expressão de *CR-1* em células tratadas com baixas doses de SFN pode estar associado aos efeitos epigenéticos desse nutracêutico. Estudos mostram que o SFN é capaz de induzir expressão gênica ao inibir a ação de desacetilases de histonas (HDAs) e DNMTs [104], [105]. Dessa forma, o considerável aumento na expressão de *CR-1* e *OCT-4* nas células

tratadas com 5 μM de SFN pode estar associado à inibição da metilação da região promotora desses marcadores de pluripotência.

O aumento da resposta terapêutica das células MDA-MB-231 tratadas com a combinação SFN 10 μM + CIS 10 μM (Figura 10 A e C; Figura 11 A e C) pode estar relacionado à diminuição da expressão gênica dos marcadores de pluripotência e EMT (Figura 12), inibindo o fenótipo tronco dessas células e tornando-as mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos da CIS.

A literatura evidencia o caráter dicotômico de SFN em relação à sua associação com agentes antineoplásicos. Zanichelli e colaboradores [106] relataram que doses baixas de SFN (0,25, 1 e 5 μM) não foram capazes de interferir no fenótipo de *stemness* de células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea de doadores. Eles observaram que não houve inibição do potencial clonogênico dessas células, o que resultou na expansão das MSCs culminando no aumento da formação de clones. Por outro lado, 20 μM de SFN foi capaz de reduzir, de forma significativa, a formação de clones, o que pode estar relacionado à capacidade de SFN, em altas doses, de atingir as propriedades *stemness* das MSCs. Esses resultados podem estar em consonância com os resultados de expressão gênica do presente estudo (Figura 10 A-C), os quais mostram que 10 μM de SFN foi capaz de reduzir a expressão de marcadores de CSCs e EMT, quando comparado ao tratamento com 5 μM desse nutracêutico.

Assim, o caráter dicotômico de SFN torna-se um desafio, considerando que, em uma massa tumoral, há diferentes gradientes de concentração de um determinado composto. Visto que, quando em doses baixas, SFN possivelmente exerce efeitos pró-CSCs, uma forma de aumentar a biodisponibilidade deste agente natural e manter suas concentrações antitumorais ideais no centro da massa tumoral, seria utilizar ferramentas de encapsulamento para tornar sua entrega mais eficaz. Por exemplo, o encapsulamento de SFN em micelas e nanopartículas seria uma alternativa interessante para aumentar a permeabilidade deste nutracêutico no tecido tumoral. Uma das abordagens já descritas na literatura e que poderia ser utilizada como forma de reduzir os diferentes gradientes de concentração do SFN na massa tumoral, seria o seu encapsulamento juntamente com CIS em nanopartículas poliméricas, como descrito por Xu e colaboradores [101].

É importante informar que os resultados de expressão gênica aqui apresentados serão validados, uma vez que apenas um experimento foi realizado até o momento. Além disso, pretendemos realizar uma investigação mais aprofundada para entender melhor os efeitos dicotômicos do SFN isoladamente ou em combinação com CIS na regulação de características tronco tumorais. Desse modo, pretendemos realizar uma análise mais ampla da expressão

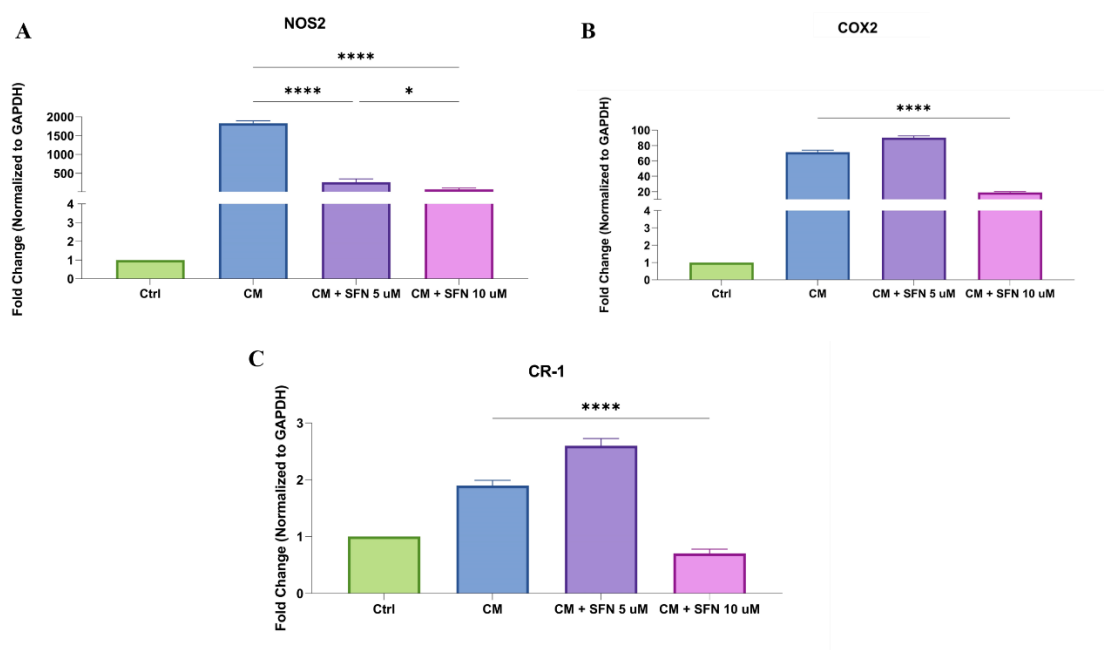
gênica (*Fluidigm Assay*) e proteica (Western Blotting) utilizando alvos relacionados a CSCs, EMT e resistência a tratamento.

5.5. Sulforafano é capaz de reverter a superexpressão de *NOS2* e *COX2* (*PTGS2*) mediada por citocinas e inibir a estabilização proteica de *HIF-1 α* em células MDA-MB-231

Tumores de mama RE negativo exibindo elevada expressão gênica de *NOS2* e *COX2* estão associados a um prognóstico desfavorável com uma diminuição significativa na taxa de sobrevida em comparação com aqueles tumores de mama que apenas superexpressam um desses genes ou não os superexpressam [73]. Assim, a inibição direcionada de *NOS2/COX2* pode ser terapeuticamente benéfica. Além disso, NO e PGE2 desempenham papéis importantes na manutenção das CSCs, que também estão associadas à resistência terapêutica e um pior prognóstico no câncer de mama [107], [108]. López-Sánchez e colegas [109] relataram que a terapia direcionada a *NOS2* foi capaz de diminuir a expressão proteica de marcadores de CSC, incluindo Notch1 e CD44, e aumentar a resposta à terapia em um modelo ortotópico de câncer de mama RE positivo. Com base nisso, buscamos avaliar se SFN exerce efeitos na expressão gênica de *NOS2* e *COX2* nas células triplo-negativas MDA-MB-231.

Visto que as linhagens de TNBC não expressam *NOS2* e *COX2* de forma constitutiva, sua expressão deve ser induzida por meio de citocinas [73], [110]. Neste estudo, células MDA-MB-231 foram tratadas com uma mistura de citocinas (CM) de forma individual ou em combinação com diferentes doses de SFN (5 e 10 μ M). Foi observado que SFN foi capaz de reverter a expressão gênica de *NOS2* induzida por CM de forma dose-dependente (Figura 13 A). No entanto, apenas 10 μ M de SFN foi capaz de prevenir a superexpressão de *COX2* induzida por CM (Figura 13 B) da mesma forma, a indução de *CR-1* (Figura 13 C).

Figura 13: Efeitos de SFN na indução de marcadores relacionados ao fenótipo de *stemness* em células MDA-MB-231 após 48 h de tratamento.



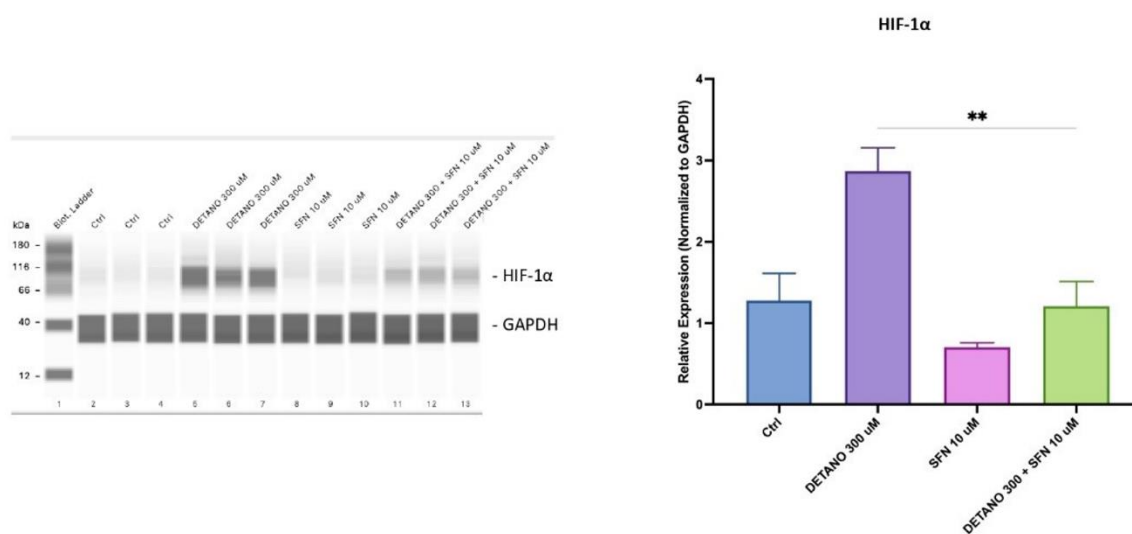
Os dados representam um experimento realizado em triplicata (n=3). P < 0.05 - *; P < 0.005 - **; P < 0.0001 - ****. ONE-WAY ANOVA.

Esses resultados corroboram a dicotomia de SFN a depender da dose. Ao passo que 5 μ M de SFN induziu a expressão de *COX2* e *CR-1*, 10 μ M reduziu a expressão desses marcadores, que são associados a um pior prognóstico em TNBC (Figura 13 A e C). Esses resultados atrelados aos mostrados nas Figuras 12 e 16 evidenciam a importância da cautela do uso desse nutracêutico em pacientes oncológicos, visto que sua ação antitumoral é dose-dependente.

Também foi avaliado o efeito do tratamento com SFN (10 μ M) na estabilização mediada por NO da proteína HIF-1 α , o qual é um marcador associado a BCSCs. Foi observada uma redução dos níveis proteicos de HIF-1 α nas células MDA-MB-231 tratadas com a combinação de 300 μ M de DETA/NO com 10 μ M de SFN, quando comparadas àquelas células tratadas apenas com 300 μ M DETA/NO (Figura 14). Estudos relatam o efeito inibitório do SFN em HIF-1 α em diferentes tipos de neoplasias, como por exemplo, câncer de cólon [111] e

hepatocarcinoma [112]. No entanto, não foram encontrados estudos na literatura mostrando o efeito inibitório de SFN em HIF-1 α em células TNBC até o depósito desta dissertação.

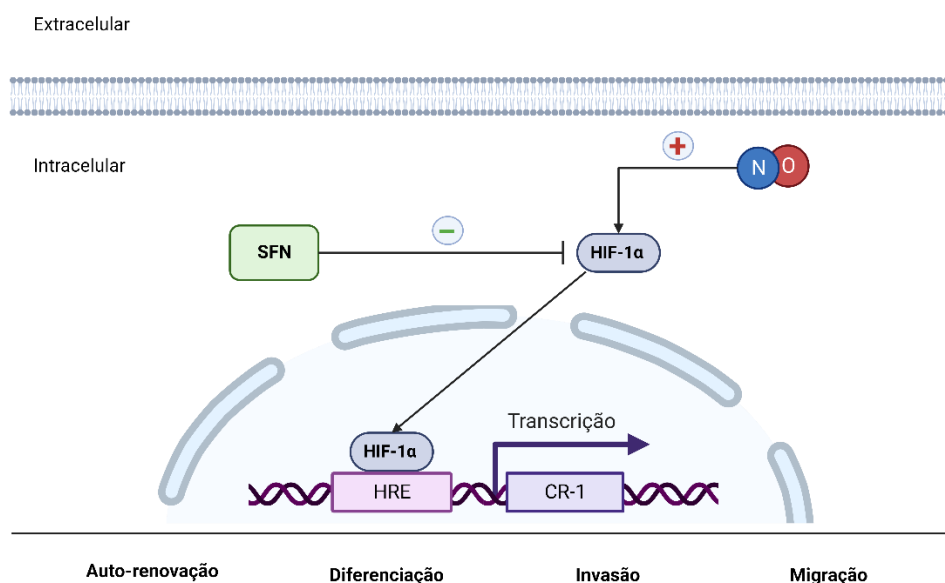
Figura 14: Efeitos do SFN na estabilização proteica de HIF-1 α mediada por NO.



Os dados representam três experimentos independentes (n=3). P < 0.05 - *; P < 0.005 - **; P < 0.0001 - ****. ONE-WAY ANOVA.

Esse resultado pode estar associado à diminuição da expressão gênica de *CR-1* (Figura 13C), visto que a região promotora deste gene possui dois elementos responsivos à HIF-1 α , o qual regula *CR-1* diretamente (Bianco et al., 2009). Mecanicamente, é possível hipotetizar que, ao reduzir a estabilização de HIF-1 α , SFN deve inibir a promoção de BCSCs ao reduzir a disponibilidade deste fator e, por conseguinte, sua ligação ao promotor de *CR-1* impactando a manutenção do fenótipo de *stemness* das BCSCs (Figura 15).

Figura 15: Efeitos do tratamento com SFN na estabilização de HIF-1 α mediada por NO.



SFN foi capaz de interferir na estabilização proteica de HIF-1 α induzida por NO, o que possivelmente comprometeu a translocação desse fator de transcrição para o núcleo evitando, por conseguinte, a sua ligação à elementos responsivos à hipóxia (HRE) na região promotora de *CR-1*, inibindo a expressão deste marcador de pluripotência e, conseqüentemente, a promoção de propriedades associadas ao fenótipo de *stemness* tais como auto-renovação, diferenciação, invasão e migração.

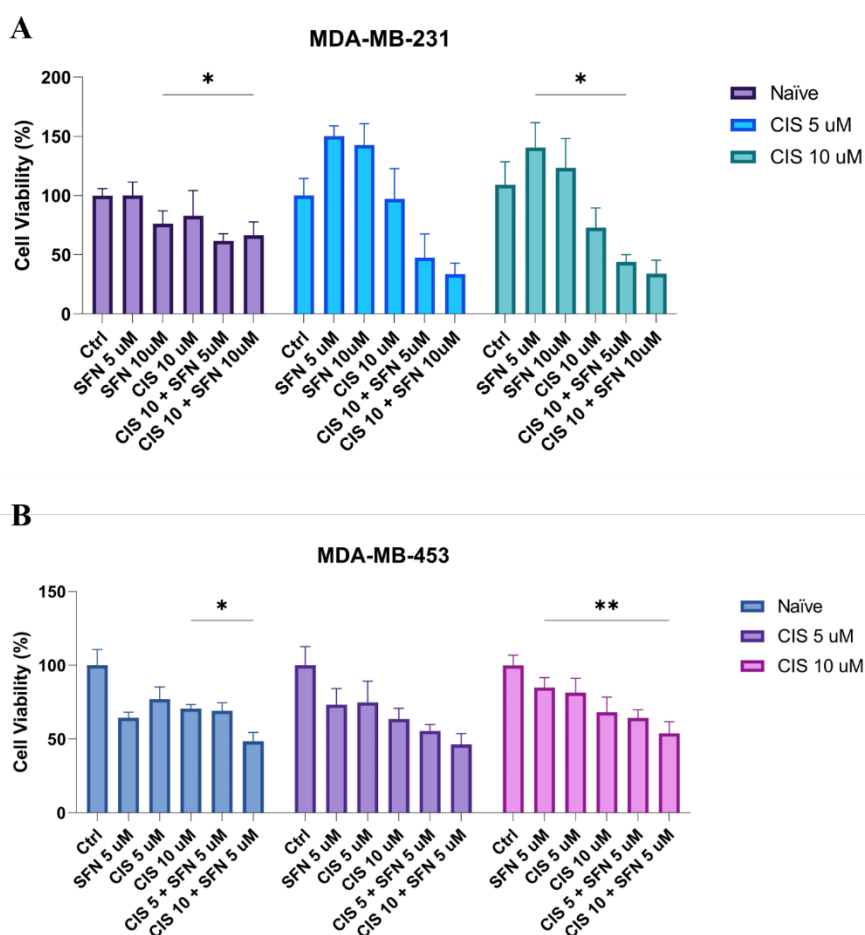
Fonte: [113]

5.6. Células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 pré-tratadas com Cisplatina apresentam maior tumorigenicidade quando tratadas apenas com Sulforafano, mas mantém sensibilidade ao tratamento combinado

Como o desenvolvimento de resistência à CIS ainda é um grande problema clínico, e com as propriedades anti-BCSCs de SFN observadas no presente estudo e na literatura, procuramos investigar se SFN seria capaz de exercer efeitos antitumorais em células MDA-MB-231 e MDA-MB-453 pré-expostas à CIS. Assim, com base nos resultados dos ensaios de viabilidade celular, pré-tratamos as células com 5 ou 10 μ M de CIS por 72 h. Ao final do pré-tratamento, as células foram lavadas para remoção total da CIS e deixadas em recuperação por 48 h [114]. Em seguida, as células foram tratadas com SFN e CIS isoladamente ou em combinação por mais 72 h. Curiosamente, as células MDA-MB-231 pré-expostas à CIS exibiram taxas de proliferação mais altas quando tratadas com 5 ou 10 μ M de SFN isolado. Por outro lado, uma redução na viabilidade celular foi observada quando 5 ou 10 μ M de SFN foi

usado em combinação com 10 μ M CIS, corroborando os resultados anteriores e evidenciando o potencial de SFN em reverter a resistência ao tratamento com CIS (Figura 16 A). Já nas células MDA-MB-453 não foi observado esse mesmo perfil de aumento da viabilidade nos grupos tratados apenas com SFN (Figura 16 B). Esses resultados sugerem que a administração individual de SFN em pacientes TNBC pré-expostas à CIS deve ser cautelosamente avaliada.

Figura 16: Efeitos dos tratamentos solo ou em combinação em células TNBC pré-expostas a 5 ou 10 μ M de CIS (A-B) após 72 h de tratamento.



Os dados representam um experimento realizado em quadruplicata (n=1). P < 0.05 - *; P < 0.005 - **; P < 0.0001 - ****. ONE-WAY ANOVA.

6. Conclusão

Atualmente não há terapia-alvo padronizada para o tratamento de pacientes com TNBC, e a resistência terapêutica ainda permanece um desafio para o manejo clínico desses pacientes. Assim, melhorar a resposta à agentes antineoplásicos citotóxicos já utilizados na clínica pode ser uma alternativa eficiente e de baixo custo. Com base nos resultados obtidos neste estudo,

SFN apresenta-se como um potencial candidato para reverter a resistência à CIS nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-453, visto que a combinação de CIS com este agente natural resultou em uma redução significativa na viabilidade celular e aumento na morte celular por apoptose. Além disso, o tratamento combinado SFN-CIS foi capaz de reverter o aumento na expressão gênica de marcadores relacionados à CSCs e EMT, os quais são induzidos pela monoterapia com CIS.

7. Referências

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA Cancer J Clin*, vol. 71, n° 3, p. 209–249, maio 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] P. Ji, Y. Gong, M. L. Jin, X. Hu, G. H. Di, e Z. M. Shao, “The Burden and Trends of Breast Cancer From 1990 to 2017 at the Global, Regional, and National Levels: Results From the Global Burden of Disease Study 2017”, *Front Oncol*, vol. 10, maio 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00650.
- [3] Y. Feng *et al.*, “Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis”, *Genes and Diseases*, vol. 5, n° 2. Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo, p. 77–106, jun. 01, 2018. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001.
- [4] M. Cortet *et al.*, “Trends in molecular subtypes of breast cancer: Description of incidence rates between 2007 and 2012 from three French registries”, *BMC Cancer*, vol. 18, n° 1, fev. 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4080-8.
- [5] S. M. Fragomeni, A. Sciallis, e J. S. Jeruss, “Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer”, *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 27, n° 1. W.B. Saunders, p. 95–120, jan. 01, 2018. doi: 10.1016/j.soc.2017.08.005.
- [6] Y. Yue, K. Astvatsaturyan, X. Cui, X. Zhang, B. Fraa, e S. Bose, “Stratification of prognosis of triple-negative breast cancer patients using combinatorial biomarkers”, *PLoS One*, vol. 11, n° 3, mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0149661.
- [7] N. U. Lin *et al.*, “Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network”, *Cancer*, vol. 118, n° 22, p. 5463–5472, nov. 2012, doi: 10.1002/cncr.27581.
- [8] M. Nedeljković e A. Damjanović, “Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge”, *Cells*, vol. 8, n° 9. NLM (Medline), ago. 22, 2019. doi: 10.3390/cells8090957.
- [9] S. Y. Park, J. H. Choi, e J. S. Nam, “Targeting cancer stem cells in triple-negative breast cancer”, *Cancers*, vol. 11, n° 7. MDPI AG, jul. 01, 2019. doi: 10.3390/cancers11070965.
- [10] P. Jabbarzadeh Kaboli *et al.*, “Targets and mechanisms of sulforaphane derivatives obtained from cruciferous plants with special focus on breast cancer – contradictory

- effects and future perspectives”, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 121. Elsevier Masson SAS, jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109635.
- [11] J. Y. Tsai, S. H. Tsai, e C. C. Wu, “The chemopreventive isothiocyanate sulforaphane reduces anoikis resistance and anchorage-independent growth in non-small cell human lung cancer cells”, *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 362, p. 116–124, jan. 2019, doi: 10.1016/j.taap.2018.10.020.
- [12] C. Kerr, G. Adhikary, D. Grun, N. George, e R. L. Eckert, “Combination cisplatin and sulforaphane treatment reduces proliferation, invasion, and tumor formation in epidermal squamous cell carcinoma”, *Mol Carcinog*, vol. 57, n° 1, p. 3–11, jan. 2018, doi: 10.1002/mc.22714.
- [13] J. P. Burnett *et al.*, “Sulforaphane enhances the anticancer activity of taxanes against triple negative breast cancer by killing cancer stem cells”, *Cancer Lett*, vol. 394, p. 52–64, maio 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2017.02.023.
- [14] Y. Li e T. Zhang, “Targeting cancer stem cells with sulforaphane, a dietary component from broccoli and broccoli sprouts”, *Future Oncology*, vol. 9, n° 8, p. 1097–1103, ago. 2013, doi: 10.2217/fon.13.108.
- [15] K. Bijangi-Vishehsaraei *et al.*, “Sulforaphane suppresses the growth of glioblastoma cells, glioblastoma stem cell-like spheroids, and tumor xenografts through multiple cell signaling pathways”, em *Journal of Neurosurgery*, dez. 2017, vol. 127, n° 6, p. 1219–1230. doi: 10.3171/2016.8.JNS161197.
- [16] N. P. Castro *et al.*, “Sulforaphane suppresses the growth of triplenegative breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo”, *Cancer Prevention Research*, vol. 12, n° 3, p. 147–158, mar. 2019, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0241.
- [17] A. Javed e A. Lteif, “Development of the human breast”, *Semin Plast Surg*, vol. 27, n° 1, p. 5–12, 2013, doi: 10.1055/s-0033-1343989.
- [18] J. Russo e I. H. Russo, “Development of the human breast”, em *Maturitas*, set. 2004, vol. 49, n° 1, p. 2–15. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.04.011.
- [19] American Cancer Society, “What is Breast Cancer?”, 2021. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html> (acessado ago. 25, 2021).
- [20] J. Russo, “Breast development and morphology”, 2014.
- [21] M. C. Rangel, H. Karasawa, N. P. Castro, T. Nagaoka, D. S. Salomon, e C. Bianco, “Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer”,

- American Journal of Pathology*, vol. 180, n° 6. p. 2188–2200, jun. 2012. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.031.
- [22] M. Klauzinska *et al.*, “Cripto-1 ablation disrupts alveolar development in the mouse mammary gland through a progesterone receptor-mediated pathway”, *American Journal of Pathology*, vol. 185, n° 11, p. 2907–2922, nov. 2015, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.023.
- [23] C. Wechselberger *et al.*, “Human Cripto-1 overexpression in the mouse mammary gland results in the development of hyperplasia and adenocarcinoma”, *Oncogene*, vol. 24, n° 25, p. 4094–4105, jun. 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208417.
- [24] C. Bianco *et al.*, “Regulation of Cripto-1 signaling and biological activity by caveolin-1 in mammary epithelial cells”, *American Journal of Pathology*, vol. 172, n° 2, p. 345–357, 2008, doi: 10.2353/ajpath.2008.070696.
- [25] Iarc, “Breast cancer overtakes lung cancer in terms of number of new cancer cases worldwide.”, 2021. [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/today>,
- [26] A. P. Cecilio *et al.*, “Breast cancer in Brazil: Epidemiology and treatment challenges”, *Breast Cancer: Targets and Therapy*, vol. 7, p. 43–49, jan. 2015, doi: 10.2147/BCTT.S50361.
- [27] INCA, “Estimativa 2020: incidencia de câncer no Brasil”, *Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva*, 2019.
- [28] G. Turashvili e E. Brogi, “Tumor heterogeneity in breast cancer”, *Front Med (Lausanne)*, vol. 4, n° DEC, 2017, doi: 10.3389/fmed.2017.00227.
- [29] G. V. Dall e K. L. Britt, “Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk”, *Frontiers in Oncology*, vol. 7, n° MAY. Frontiers Media S.A., maio 26, 2017. doi: 10.3389/fonc.2017.00110.
- [30] M. A. Duncan e M. A. Lautner, “Sarcomas of the Breast”, *Surgical Clinics of North America*, vol. 98, n° 4, p. 869–876, ago. 2018, doi: 10.1016/j.suc.2018.03.013.
- [31] H. G. Russnes, O. C. Lingjærde, A. L. Børresen-Dale, e C. Caldas, “Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters”, *American Journal of Pathology*, vol. 187, n° 10, p. 2152–2162, out. 2017, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.022.
- [32] R. G. do Nascimento e K. M. Otoni, “Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?”, *Mastology*, vol. 30, 2020, doi: 10.29289/25945394202020200024.

- [33] O. Yersal e S. Barutca, “Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications”, *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 5, n° 3. Baishideng Publishing Group Co., Limited, p. 412–424, ago. 10, 2014. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412.
- [34] M. G. Davey, S. O. Hynes, M. J. Kerin, N. Miller, e A. J. Lowery, “Ki-67 as a prognostic biomarker in invasive breast cancer”, *Cancers*, vol. 13, n° 17. MDPI, set. 01, 2021. doi: 10.3390/cancers13174455.
- [35] L. Coutinho, “Subtipos Intrínseco do Câncer de Mama”. 2022.
- [36] L. Yin, J. J. Duan, X. W. Bian, e S. C. Yu, “Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress”, *Breast Cancer Research*, vol. 22, n° 1. BioMed Central Ltd, jun. 09, 2020. doi: 10.1186/s13058-020-01296-5.
- [37] L. C. Scott, L. R. Mobley, T. M. Kuo, e D. Il’yasova, “Update on triple-negative breast cancer disparities for the United States: A population-based study from the United States Cancer Statistics database, 2010 through 2014”, *Cancer*, vol. 125, n° 19, p. 3412–3417, out. 2019, doi: 10.1002/cncr.32207.
- [38] O. Prakash, F. Hossain, D. Danos, A. Lassak, R. Scribner, e L. Miele, “Racial Disparities in Triple Negative Breast Cancer: A Review of the Role of Biologic and Non-biologic Factors”, *Frontiers in Public Health*, vol. 8. Frontiers Media S.A., dez. 22, 2020. doi: 10.3389/fpubh.2020.576964.
- [39] G. M. Reddy, P. K. Suresh, e R. R. Pai, “Clinicopathological Features of Triple Negative Breast Carcinoma”, *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, vol. 11, n° 1, 2017, doi: 10.7860/jcdr/2017/21452.9187.
- [40] H. Gonçalves, M. R. Guerra, J. R. Duarte Cintra, V. A. Fayer, I. V. Brum, e M. T. Bustamante Teixeira, “Survival Study of Triple-Negative and Non–Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort”, *Clin Med Insights Oncol*, vol. 12, jul. 2018, doi: 10.1177/1179554918790563.
- [41] Z. Morante *et al.*, “Post-recurrence survival in triple negative breast cancer.”, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 36, n° 15, p. 13120–13120, maio 2018, doi: 10.1200/jco.2018.36.15_suppl.e13120.
- [42] B. D. Lehmann *et al.*, “Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies”, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, n° 7, p. 2750–2767, jul. 2011, doi: 10.1172/JCI45014.

- [43] B. D. Lehmann *et al.*, “Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for neoadjuvant chemotherapy selection”, *PLoS One*, vol. 11, n° 6, jun. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0157368.
- [44] M. D. Seal e S. K. Chia, “What Is the Difference Between Triple-Negative and Basal Breast Cancers?”, *The Cancer Journal*, vol. 16, n° 1, 2010, [Online]. Available: www.journalppo.com
- [45] A. Prat, B. Adamo, M. C. U. Cheang, C. K. Anders, L. A. Carey, e C. M. Perou, “Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer”, *Oncologist*, vol. 18, n° 2, p. 123–133, fev. 2013, doi: 10.1634/theoncologist.2012-0397.
- [46] W. D. Foulkes *et al.*, “Estrogen Receptor Status in BRCA1-and BRCA2-Related Breast Cancer: The Influence of Age, Grade, and Histological Type”, *Clinical Cancer Research*, vol. 10, p. 2029–2034, 2004.
- [47] K. Pogoda *et al.*, “Effects of BRCA Germline Mutations on Triple-Negative Breast Cancer Prognosis”, *J Oncol*, vol. 2020, p. 1–10, 2020, doi: 10.1155/2020/8545643.
- [48] D. Y. Wang, Z. Jiang, Y. Ben-David, J. R. Woodgett, e E. Zacksenhaus, “Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes”, *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, dez. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55710-w.
- [49] S. de Talhouet *et al.*, “Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes”, *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, dez. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63759-1.
- [50] M. Nedeljković e A. Damjanović, “Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge”, *Cell*, vol. 957, n° 8, p. 1–32, 2019.
- [51] A. Kuşoğlu e Ç. Biray Avcı, “Cancer stem cells: A brief review of the current status”, *Gene*, vol. 681, p. 80–85, jan. 2019, doi: 10.1016/j.gene.2018.09.052.
- [52] R. K. Nimmakayala, S. K. Batra, e M. P. Ponnusamy, “Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis”, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1871, n° 1. Elsevier B.V., p. 50–63, jan. 01, 2019. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.10.006.
- [53] C. Bianco *et al.*, “Role of Cripto-1 in stem cell maintenance and malignant progression”, *American Journal of Pathology*, vol. 177, n° 2, p. 532–540, 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.100102.

- [54] K. F. Hung, T. Yang, e S. Y. Kao, “Cancer stem cell theory: Are we moving past the mist?”, *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 82, n° 11. Wolters Kluwer Health, p. 814–818, 2019. doi: 10.1097/JCMA.000000000000186.
- [55] S. Majumdar e S.-T. Liu, “Cell division symmetry control and cancer stem cells”, *AIMS Mol Sci*, vol. 7, n° 2, p. 82–101, 2020, doi: 10.3934/molsci.2020006.
- [56] J. Carvalho, “Cell Reversal From a Differentiated to a Stem-Like State at Cancer Initiation”, *Front Oncol*, vol. 10, abr. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00541.
- [57] C. Peitzsch, A. Tyutyunnykova, K. Pantel, e A. Dubrovskaya, “Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases”, *Seminars in Cancer Biology*, vol. 44. Academic Press, p. 10–24, jun. 01, 2017. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.02.011.
- [58] A. P. Thankamony, K. Saxena, R. Murali, M. K. Jolly, e R. Nair, “Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal”, *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7. Frontiers Media S.A., abr. 30, 2020. doi: 10.3389/fmolb.2020.00079.
- [59] C. L. Chaffer *et al.*, “XPoised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity”, *Cell*, vol. 154, n° 1, p. 61, jul. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.005.
- [60] J. E. Carette *et al.*, “Generation of iPSCs from cultured human malignant cells”, *Blood*, vol. 115, n° 20, p. 4039–4042, maio 2010, doi: 10.1182/blood-2009-07-231845.
- [61] L. Coutinho, I. C. S. Souza, M. T. Ferreira, e M. C. R. Rangel, “Células-tronco Tumerais”, em *Oncologia: da molécula à clínica*, vol. 1ª impressão, L. Coutinho, I. C. Souza, M. T. Ferreira, e M. C. R. Rangel, Orgs. São Paulo: Editora dos Editores, 2022, p. 1–659.
- [62] T. Lapidot *et al.*, “A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice”, *Letters to Nature*, vol. 367, p. 31–39, 1994.
- [63] D. Bonnet e E. Dick, “Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell”, *Nature*, vol. 381, n° 7, p. 730–737, 1997, [Online]. Available: <http://www.nature.com/naturemedicine>
- [64] J. Seoane, “Division hierarchy leads to cell heterogeneity”, *Nature*, vol. 549, n° 14, p. 164–166, 2017.
- [65] J. C. Chang, “Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance”, *Medicine (United States)*, vol. 95, n° 1. Lippincott Williams and Wilkins, p. S20–S25, 2016. doi: 10.1097/MD.0000000000004766.

- [66] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, e M. F. Clarke, “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells”, 2003. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0530291100
- [67] A. Turdo *et al.*, “Effective targeting of breast cancer stem cells by combined inhibition of Sam68 and Rad51”, *Oncogene*, vol. 41, n° 15, p. 2196–2209, abr. 2022, doi: 10.1038/s41388-022-02239-4.
- [68] I. Rabinovich *et al.*, “HER2-expressing breast tumors are associated with breast cancer stem-cell phenotype CD44 + /CD24 -”, *J Bras Patol Med Lab*, vol. 54, n° 5, p. 310–318, set. 2018, doi: 10.5935/1676-2444.20180052.
- [69] X. Zhang, K. Powell, e L. Li, “Breast cancer stem cells: Biomarkers, identification and isolation methods, regulating mechanisms, cellular origin, and beyond”, *Cancers (Basel)*, vol. 12, n° 12, p. 1–28, dez. 2020, doi: 10.3390/cancers12123765.
- [70] H. A. Wahba e H. A. El-Hadaad, “Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer”, *Cancer Biology and Medicine*, vol. 12, n° 2. Cancer Biology and Medicine, p. 106–116, jun. 01, 2015. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030.
- [71] D. Nassar e C. Blanpain, “Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications”, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 11, p. 47–76, maio 2016, doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
- [72] J. Wang *et al.*, “A novel method to limit breast cancer stem cells in states of quiescence, proliferation or differentiation: Use of gel stress in combination with stem cell growth factors”, *Oncol Lett*, vol. 12, n° 2, p. 1355–1360, ago. 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4757.
- [73] D. Basudhar *et al.*, “Coexpression of NOS2 and COX2 accelerates tumor growth and reduces survival in estrogen receptor-negative breast cancer”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, n° 49, p. 13030–13035, dez. 2017, doi: 10.1073/pnas.1709119114.
- [74] M. Esquivel-Velázquez, P. Ostoa-Saloma, M. I. Palacios-Arreola, K. E. Nava-Castro, J. I. Castro, e J. Morales-Montor, “The role of cytokines in breast cancer development and progression”, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 35, n° 1. Mary Ann Liebert Inc., p. 1–16, jan. 01, 2015. doi: 10.1089/jir.2014.0026.
- [75] S. Y. Kim *et al.*, “Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells”, *Cell Signal*, vol. 25, n° 4, p. 961–969, abr. 2013, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.01.007.
- [76] C. H. Switzer *et al.*, “S-nitrosation mediates multiple pathways, that lead to tumor progression in estrogen receptor - Negative breast cancer”, em *Forum on*

- Immunopathological Diseases and Therapeutics*, 2012, vol. 3, n° 2, p. 117–124. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2012006108.
- [77] M. Majumder *et al.*, “COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis”, *Stem Cells*, vol. 34, n° 9, p. 2290–2305, set. 2016, doi: 10.1002/stem.2426.
- [78] C. H. Switzer *et al.*, “S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer”, *Molecular Cancer Research*, vol. 10, n° 9, p. 1203–1215, set. 2012, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0124.
- [79] Q. Zhang, Z. Han, Y. Zhu, J. Chen, e W. Li, “Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells (Review)”, *Mol Med Rep*, vol. 23, n° 1, jan. 2021, doi: 10.3892/mmr.2020.11655.
- [80] D. L. Cecil *et al.*, “Immunization against HIF-1 α inhibits the growth of basal mammary tumors and targets mammary stem cells in vivo”, *Clinical Cancer Research*, vol. 23, n° 13, p. 3396–3404, jul. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1678.
- [81] D. Samanta, D. M. Gilkesa, P. Chaturvedia, L. Xiang, e G. L. Semenza, “Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, n° 50, p. E5429–E5438, dez. 2014, doi: 10.1073/pnas.1421438111.
- [82] S. Kaur *et al.*, “Drug-Resistant Breast Cancer: Dwelling the Hippo Pathway to Manage the Treatment”, *Breast Cancer: Targets and Therapy*, vol. 13. Dove Medical Press Ltd, p. 691–700, 2021. doi: 10.2147/BCTT.S343329.
- [83] G. Cosentino, I. Plantamura, E. Tagliabue, M. v. Iorio, e A. Cataldo, “Breast cancer drug resistance: overcoming the challenge by capitalizing on microRNA and tumor microenvironment interplay”, *Cancers*, vol. 13, n° 15. MDPI AG, ago. 01, 2021. doi: 10.3390/cancers13153691.
- [84] M. Rediti *et al.*, “Clinical management of first-line advanced triple-negative breast cancer patients”, *BJMO Practice Guidelines*, vol. 14, p. 333–338, 2020.
- [85] A. S. Correia, F. Gärtner, e N. Vale, “Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer”, *Heliyon*, vol. 7, n° 1. Elsevier Ltd, jan. 01, 2021. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e05948.
- [86] F. A. Fisusi e E. O. Akala, “Drug Combinations in Breast Cancer Therapy”, *Pharm Nanotechnol*, vol. 7, n° 1, p. 3–23, jan. 2019, doi: 10.2174/2211738507666190122111224.

- [87] J. S. Lee, S. E. Yost, e Y. Yuan, “Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: Recent progresses and challenges”, *Cancers*, vol. 12, n° 6. MDPI AG, jun. 01, 2020. doi: 10.3390/cancers12061404.
- [88] N. Bianco *et al.*, “Adjuvant treatment for triple negative breast cancer with residual tumor after neo-adjuvant chemotherapy. A single institutional retrospective analysis”, *Breast*, vol. 59, p. 351–357, out. 2021, doi: 10.1016/j.breast.2021.08.004.
- [89] T. Saha e K. E. Lukong, “Breast Cancer Stem-Like Cells in Drug Resistance: A Review of Mechanisms and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance”, *Frontiers in Oncology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., mar. 21, 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.856974.
- [90] M. Hattori *et al.*, “Genomic profiling of residual tumor after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer.”, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 37, n° 15_suppl, p. e12106–e12106, maio 2019, doi: 10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e12106.
- [91] P. Jabbarzadeh Kaboli *et al.*, “Targets and mechanisms of sulforaphane derivatives obtained from cruciferous plants with special focus on breast cancer – contradictory effects and future perspectives”, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 121. Elsevier Masson SAS, jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109635.
- [92] Y. Rong *et al.*, “Co-administration of sulforaphane and doxorubicin attenuates breast cancer growth by preventing the accumulation of myeloid-derived suppressor cells”, *Cancer Lett*, vol. 28, n° 493, p. 189–196, 2020.
- [93] A. Keshandehghan, S. Nikkhah, H. Tahermansouri, S. Heidari-Keshel, e M. Gardaneh, “Co-Treatment with Sulforaphane and Nano-Metformin Molecules Accelerates Apoptosis in HER2+ Breast Cancer Cells by Inhibiting Key Molecules”, *Nutr Cancer*, vol. 72, n° 5, p. 835–848, jul. 2020, doi: 10.1080/01635581.2019.1655073.
- [94] S. Sinha, S. Sharma, A. Sharma, J. Vora, e N. Shrivastava, “Sulforaphane-cisplatin combination inhibits the stemness and metastatic potential of TNBCs via down regulation of sirtuins-mediated EMT signaling axis”, *Phytomedicine*, vol. 84, abr. 2021, doi: 10.1016/j.phymed.2021.153492.
- [95] K. J. Livak e T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method”, *Methods*, vol. 25, n° 4, p. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

- [96] M. Martin *et al.*, “Activity of docetaxel, carboplatin, and doxorubicin in patient-derived triple-negative breast cancer xenografts”, *Sci Rep*, vol. 11, n° 1, dez. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-85962-4.
- [97] C. J. Lovitt, T. B. Shelper, e V. M. Avery, “Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins”, *BMC Cancer*, vol. 18, n° 1, 2018, doi: 10.1186/s12885-017-3953-6.
- [98] A. Pledgie-Tracy, M. D. Sobolewski, e N. E. Davidson, “Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines”, *Mol Cancer Ther*, vol. 6, n° 3, p. 1013–1021, mar. 2007, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0494.
- [99] Y. Wang *et al.*, “Sulforaphane induces S-phase arrest and apoptosis via p53-dependent manner in gastric cancer cells”, *Sci Rep*, vol. 11, n° 1, dez. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-81815-2.
- [100] K. C. Liu *et al.*, “Sulforaphane Induces Cell Death Through G2/M Phase Arrest and Triggers Apoptosis in HCT 116 Human Colon Cancer Cells”, *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 44, n° 6, p. 1289–1310, set. 2016, doi: 10.1142/S0192415X16500725.
- [101] Y. Xu *et al.*, “Sulforaphane Mediates Glutathione Depletion via Polymeric Nanoparticles to Restore Cisplatin Chemosensitivity”, *ACS Nano*, 2019, doi: 10.1021/acsnano.9b07032.
- [102] M. Z. Koh, W. Y. Ho, S. K. Yeap, N. M. Ali, L. Boo, e N. B. Alitheen, “Regulation of cellular and cancer stem cell-related putative gene expression of parental and cd44+ cd24– sorted mda-mb-231 cells by cisplatin”, *Pharmaceuticals*, vol. 14, n° 5, maio 2021, doi: 10.3390/ph14050391.
- [103] C. Bianco *et al.*, “Regulation of human Cripto-1 expression by nuclear receptors and DNA promoter methylation in human embryonal and breast cancer cells”, *J Cell Physiol*, vol. 228, n° 6, p. 1174–1188, jun. 2013, doi: 10.1002/jcp.24271.
- [104] A. Hsu, C. P. Wong, Z. Yu, D. E. Williams, R. H. Dashwood, e E. Ho, “Promoter demethylation of cyclin D2 by sulforaphane in prostate cancer cells”, *Clin Epigenetics*, vol. 3, n° 1, dez. 2011, doi: 10.1186/1868-7083-3-3.
- [105] S. L. Martin, R. Kala, e T. O. Tollefsbol, “Mechanisms for the Inhibition of Colon Cancer Cells by Sulforaphane through Epigenetic Modulation of MicroRNA-21 and Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Down-regulation”, *Curr Cancer Drug*

- Targets*, vol. 18, n° 1, p. 97–106, dez. 2018, doi: 10.2174/1568009617666170206104032.
- [106] F. Zanichelli *et al.*, “Low concentrations of isothiocyanates protect mesenchymal stem cells from oxidative injuries, while high concentrations exacerbate DNA damage”, *Apoptosis*, vol. 17, n° 9, p. 964–974, set. 2012, doi: 10.1007/s10495-012-0740-3.
- [107] L. Zhou *et al.*, “The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: A meta-analysis of published literatures”, *Breast Cancer Res Treat*, vol. 122, n° 3, p. 795–801, ago. 2010, doi: 10.1007/s10549-010-0999-4.
- [108] J. Tian *et al.*, “Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer”, *Sci Rep*, vol. 7, jan. 2017, doi: 10.1038/srep40258.
- [109] L. M. López-Sánchez *et al.*, “Nitric oxide-targeted therapy inhibits stemness and increases the efficacy of tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer cells”, *Laboratory Investigation*, vol. 101, n° 3, p. 292–303, mar. 2021, doi: 10.1038/s41374-020-00507-z.
- [110] J. L. Heinecke *et al.*, “Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, n° 17, p. 6323–6328, abr. 2014, doi: 10.1073/pnas.1401799111.
- [111] D. H. Kim *et al.*, “Sulforaphane inhibits hypoxia-induced HIF-1 α and VEGF expression and migration of human colon cancer cells”, *Int J Oncol*, vol. 47, n° 6, p. 2226–2232, dez. 2015, doi: 10.3892/ijo.2015.3200.
- [112] P. Liu *et al.*, “Sulforaphane exerts anti-angiogenesis effects against hepatocellular carcinoma through inhibition of STAT3/HIF-1 α /VEGF signalling”, *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, dez. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12855-w.
- [113] L. Coutinho, “Efeitos do tratamento com SFN na estabilização de HIF-1 α mediada pelo óxido nítrico”. 2022.
- [114] L. Brame, V. Ganapathy, I. Ramachandran, e L. Queimado, “A Novel Assay to Predict Cancer Resistance to Cisplatin”.