

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Laura Lacerda Coelho

Utilização de esferoides tumorais mamários para
o estudo *in vitro* do potencial metastático e de resposta
terapêutica

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dra. Luciana Ribeiro Garzoni
Dr. Fernando Regla Vargas

RIO DE JANEIRO

2020

i

Lacerda Coelho, Laura .

Utilização de esferoides tumorais mamários para o estudo *in vitro* do potencial metastático e de resposta terapêutica / Laura Lacerda Coelho. - Rio de janeiro, 2020.

98 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

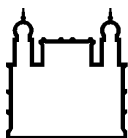
Orientadora: Luciana Ribeiro Garzoni.

Co-orientadora: Fernando Regla Vargas.

Bibliografia: f. 72-98

1. Câncer de mama. 2. Cultivo tridimensional. 3. Esferoides. 4. Metástase. 5. Transição epitelial-mesenquimal. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Laura Lacerda Coelho

Utilização de esferoides tumorais mamários para
o estudo *in vitro* do potencial metastático e de resposta
terapêutica

ORIENTADOR (ES): Dra. Luciana Ribeiro Garzoni
Dr. Fernando Regla Vargas

Aprovada em: 06/02/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Daniel Pedra Adesse – IOC/Fiocruz (**Presidente**)
Prof. Dr. Tatiana Martins Tilli – CDTS/Fiocruz (**Membro e Revisora**)
Prof. Dr. Cibele Rodrigues Bonvicino – INCA/RJ (**Membro**)
Prof. Dr. Fernanda de Mello e Souza Valente Gubert – UFRJ/RJ (**Suplente**)
Prof. Dr. Mariana Caldas Waghbi – IOC/Fiocruz (**Suplente**)

Rio de Janeiro, 6 de fevereiro de 2020

Dedico não só este trabalho, mas toda a minha vida, tudo o que eu conquistei até aqui – e o que ainda pretendo alcançar, a você, MÃE (*in memoriam*).

Pois, literalmente, sem você não existiria.

Apesar de, sem você, eu ter tido que aprender a viver.

Sigo aprendendo, sigo lutando, sigo vivendo.

Sigo dizendo: espero ter um terço da força, leveza e bondade que tu tiveste em vida.

Me esforço a cada dia para ser motivo de orgulho para ti.

Que mais esta etapa que se conclui possa te arrancar sorrisos.

Possa te deixar mais tranquila. Estou conseguindo, mãe!

Estou sendo forte!

Agradecimentos

Difícilmente um projeto científico é fruto de esforços e realizações de um único indivíduo. É digno reconhecer que se não fosse por outras pessoas - sejam elas presentes fisicamente ou não - pelo menos seria mais árduo e talvez o resultado seria diferente ou o caminho menos prazeroso.

Portanto, aqui eu agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização de mais esta etapa da minha vida. Àqueles que mesmo de longe, torceram e vibraram. Desejaram o bem. Àqueles que me incentivaram e me deram forças para continuar, mesmo nos momentos de mais instabilidade.

Primeiramente, agradeço a Deus. Mesmo não sendo mais tão devota, ainda acredito na Sua existência. Ainda tenho fé. No mundo em que se vive, é importante ter um apoio e acreditar que mesmo quando tudo parece perdido, “há uma luz no fim do túnel”.

À minha querida mãe, Geysa Maria (*in memoriam*), por toda sua fortaleza e bondade; por ter sido pai e mãe; por ter me ensinado a simplicidade e a lutar pelos meus objetivos; por me mostrar o verdadeiro amor. Por ainda me amar incondicionalmente.

Ao meu marido, Leonardo, pois se não fosse pelo seu incentivo e por acreditar – e me fazer acreditar - no meu potencial, eu não teria feito a seleção naquele momento. Obrigada por ser meu *porto*. Por estar sempre me desafiando a ser uma pessoa melhor. Por todo amor e cumplicidade. Pela paciência. Pelo cuidado. Por ter dado cor e significado a minha vida há quase 10 anos.

À minha família, em especial à minha irmã, Barbara, por ser alegria em pessoa. Por ser pedra rara. Pela sua espontaneidade. Por me dar amor sincero e infinito. Aos meus padrinhos, Ana e Ênio, por cuidarem de mim, estarem sempre ao meu lado e torcerem pelo meu sucesso. Por tornarem minha vida um pouco menos complicada. Por serem *família*.

Aos amigos da vida, em especial a Camila e Carol, que tem me apoiado desde os primeiros passos na vida acadêmica. Obrigada pelas conversas, que apesar de serem cada vez menos frequentes pelas urgências da vida, são essenciais e trazem leveza. Pelas trocas: de sorrisos, experiência, sabedoria, amor. Pelo apoio nos

momentos difíceis. Não poderia esquecer de agradecer as minhas amigas do Colégio Pedro II, por serem presentes até hoje, e carregarem todo sentido que a palavra “presente” possa ter. Pelos encontros e momentos descontraídos e felizes. Pelo cuidado umas com as outras. Por se importarem. Por quererem o bem. Por transmitirem luz.

Aos amigos que fiz na Fiocruz, aos amigos do laboratório, em especial às minhas *irmãs científicas* LÍndice e Bia, por estarem ao meu lado independente do momento. Pela cumplicidade. Pelo ombro amigo. Por terem tornado o trabalho e o dia-a-dia menos difíceis. Por fazerem parte da minha vida além dos muros da Fiocruz.

Aos meus alunos ou *filhos científicos*, Matheus e Debora, por terem proporcionado minha primeira experiência como docente e, mais que isso, por ter me feito enxergar que posso contribuir nessa área também. Pelo ensinamento recíproco. Pelos momentos de descobertas científicas e olhinhos brilhando de comoção. Pelos dias de desânimo seguidos por “vai dar tudo certo”. Por confiarem em mim. Pela parceria.

À minha orientadora, Luciana Garzoni, por toda sabedoria compartilhada ao longo desses 10 anos...uma caminhada e tanto! Pelo acolhimento. Por embarcar nas minhas ideias. Pela confiança depositada em mim. Por ter contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal. Pela sua humanidade, pelo carinho e cuidado.

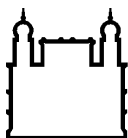
Ao meu orientador, Fernando Vargas, por ter aceitado o convite de me orientar com a Luciana. Por ter me acolhido e acreditado no meu potencial, mesmo sem me conhecer anteriormente.

A todos os membros da banca, por terem aceitado o convite de participar de um dia tão memorável para mim. Por todas as contribuições que sei que serão suscitadas.

À Fiocruz, ao IOC, à PGBCM, ao CNPq e à FAPERJ, por terem proporcionado espaço, infraestrutura e condições financeiras para a realização desse projeto. Pelo ensino gratuito e de qualidade.

Muito obrigada a todos!

“Nenhum obstáculo será grande demais, se a sua vontade de vencer for maior”.
Autor desconhecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

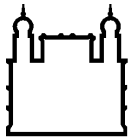
Utilização de esferoides tumorais mamários para o estudo *in vitro* do potencial metastático e de resposta terapêutica

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Laura Lacerda Coelho

O câncer de mama é o mais prevalente entre as mulheres no mundo e no Brasil. Ainda é um desafio a busca por estratégias terapêuticas que atuem no controle tumoral e metástase. Nesse contexto, o desenvolvimento de modelos *in vitro* que mimetizem tumores *in vivo*, pode ajudar nessa busca. Os sistemas tridimensionais (3D) do tipo esferoide mimetizam mais fidedignamente as características moleculares, morfológicas e funcionais de tumores *in vivo* do que as tradicionais culturas em monocamada (2D). Com base na experiência do nosso grupo com esferoides de múltiplos tipos celulares, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo de esferoide tumoral mamário para investigar *in vitro* o potencial metastático e de resposta terapêutica das células tumorais. Os esferoides tumorais mamários (ETM) produzidos a partir da linhagem celular MCF-7 mimetizaram características dos tumores avasculares, como centro necrótico e células proliferativas na periferia. Além disso, os ETM exibiram proteínas de junção aderente e foram capazes de produzir sua própria matriz extracelular. Também demonstramos que o modelo de esferoide suporta o cultivo em 3D de células isoladas a partir de tumores mamários de camundongos, produzidos a partir das linhagens 4T1 e 67NR. Através de ensaio de migração celular, demonstramos pela primeira vez que este modelo reproduz o processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), característico como uma das etapas da formação de metástase, verificado pela perda da proteína E-caderina e aumento da expressão de vimentina, à medida que as células se distanciam do “tumor” *in vitro*. Observamos ainda a migração coletiva de células, outra característica do processo metastático. Validamos ainda, o modelo para estudos de resposta terapêutica *in vitro*, utilizando a doxorrubicina (dox) e observamos que foi possível avaliar parâmetros distintos de citotoxicidade. A dox induziu morte celular, reduziu o diâmetro dos esferoides e inibiu a metástase *in vitro*, sugerindo uma nova aplicação para essa droga no tratamento anti-câncer. Também avaliamos pela primeira vez em cultura 3D, o efeito antitumoral da β -lapachona (β -lap), um composto natural que foi capaz de induzir morte celular e inibir a metástase *in vitro*, reduzindo a migração coletiva e inibindo o processo de TEM. Nossos resultados demonstram que o cultivo 3D reproduziu características de tumores mamários observadas *in vivo*, incluindo o processo metastático, sendo sensível ao tratamento com dox e β -lap, sugerindo que os esferoides tumorais mamários podem ser considerados uma ferramenta poderosa para o estudo de novas abordagens terapêuticas *in vitro* contra o câncer de mama.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Use of mammary tumor spheroids for *in vitro* study of the metastatic potential and therapeutic response

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Laura Lacerda Coelho

Breast cancer is the most prevalent among women in the world and in Brazil. The search for therapeutic strategies that act on tumor control and metastasis is still a challenge. In this context, the development of *in vitro* models that mimic tumors *in vivo* may help in this search. Three-dimensional (3D) spheroid-type systems more accurately mimic the molecular, morphological and functional characteristics of tumors *in vivo* than traditional monolayer (2D) cultures. Based on our group's experience with multiple cell type spheroids, the aim of this study was to establish a mammary tumor spheroid model to investigate *in vitro* the metastatic potential and therapeutic response of tumor cells. Mammary tumor spheroids (MTS) produced from the MCF-7 cell line mimicked avascular tumor characteristics, such as necrotic center and peripheral proliferative cells. In addition, MTS exhibited adherent junction proteins and were able to produce their own extracellular matrix. We also demonstrate that the spheroid model supports the 3D culturing of cells isolated from mouse mammary tumors produced from 4T1 and 67NR cell lines. Through the cell migration assay, we demonstrated for the first time that this model reproduces the epithelial-mesenchymal transition process (EMT), characteristic as one of the steps of metastasis formation and verified by the loss of E-cadherin protein and increased vimentin expression, as cells move away from "tumor" *in vitro*. We also observed collective cell migration, another feature of the metastatic process, and validated the model for *in vitro* therapeutic response studies using doxorubicin (dox). We observed that it was possible to evaluate distinct cytotoxicity parameters. Dox induced cell death, reduced spheroid diameter and inhibited metastasis *in vitro*, suggesting a new application for this drug in anti-cancer treatment. We also evaluated for the first time in 3D culture, the antitumor effect of β -lapachona (β -lap), a natural compound that was able to induce cell death and inhibit metastasis *in vitro*, reducing collective migration and inhibiting the EMT process. Our results demonstrate that 3D cultivation reproduced characteristics of breast tumors observed *in vivo*, including the metastatic process sensitive to dox and β -lap treatment, suggesting that mammary tumor spheroids may be considered a powerful *in vitro* tool for the study of new therapeutic approaches against breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1- Incidência dos tipos de câncer mais prevalentes estimados para o ano de 2018, exceto câncer de pele não melanoma.....	1
Figura 1.2 - Taxa de mortalidade das localizações primárias mais frequentes, no Brasil, em mulheres, no ano de 2017	2
Figura 1.3 - Origem dos tipos de câncer de mama mais prevalentes.....	3
Figura 1.4 - Subtipos moleculares do câncer de mama.....	4
Figura 1.5 - Sinais e sintomas do câncer de mama.....	6
Figura 1.6 - Cascata de invasão-metástase e diferentes tipos de migração.....	15
Figura 1.7 - Tipos de cultivo 3D	19

RESULTADOS

Figura 4.1 - Estabelecimento de esferoides com a linhagem celular MCF-7	38
Figura 4.2 - Os esferoides tumorais mamários mimetizam as características dos tumores avasculares	39
Figura 4.3 - Os esferoides tumorais mamários expressam marcador epitelial e produzem sua própria matriz extracelular.....	40
Figura 4.4 - Produção de esferoides a partir de tumores mamários murinos. ..	42
Figura 4.5 - Ensaio de migração com esferoides reproduz características da metástase <i>in vivo</i>	44
Figura 4.6 - Doxorrubicina reduz o tamanho do esferoide	47
Figura 4.7 - Doxorrubicina induz citotoxicidade nos esferoides	48
Figura 4.8 - Doxorrubicina inibe a migração celular	50
Figura 4.9 - Doxorrubicina inibe o processo de TEM.....	51
Figura 4.10 - β -lapachona reduz o tamanho do esferoide	53
Figura 4.11 - β -lapachona induz citotoxicidade nos esferoides.....	54
Figura 4.12 - β -lapachona inibe a migração celular.....	56
Figura 4.13 - β -lapachona inibe a TEM.....	57

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3.1: Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência.....33

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blotting*.....35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
7-AAD	7-aminoactinomicina D
°C	Grau Celsius
ADH-1	Álcool desidrogenase-1
Akt	Proteína quinase B
β-lap	β-lapachona
BCA	Ácido bicinconínico
BRCA1	Do inglês, <i>breast cancer 1</i>
BRCA2	Do inglês, <i>breast cancer 2</i>
BSA	Albumina de soro bovino
BSS-CMF	Solução salina balanceada sem cálcio e magnésio
CAT	Transição coletiva-amebóide
CD11b	Do inglês, <i>cluster of differentiation molecule 11b</i>
CD163	Do inglês, <i>cluster of Differentiation 163</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CXCL12	Ligante de quimiocina 12
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
DAPI	1-4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dox	Doxorrubicina
E-cad	E-caderina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FN	Fibronectina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
g	Aceleração da gravidade
h	Hora

HER2	receptor de fator de crescimento epidermal tipo 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IgG	Imunoglobulina G
IP	Iodeto de propídeo
kDa	Quilodalton
kHz	Quilohertz
L	Litro
LN	Laminina
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MAT	Transição mesenquimal-amebóide
MCF-7	Do inglês, <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MEC	Matriz extracelular
ETM	Esferoides tumorais mamários
MDA-MB-231	<i>M.D. Anderson Metastasis Breast cancer</i>
MDR-1	Resistência múltipla a drogas
MET	Transição mesenquimal-epitelial
Mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
MLC	Cadeia leve de miosina
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MMPs	Metaloproteinases de matriz extracelular
MMT	Do inglês, <i>mouse mammary tumor</i>
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NaCl	Cloreto de sódio
N-cad	N-caderina
nm	Nanômetro
NQO1	NAD(P)H Desidrogenase (Quinona1)
OMS	Esferoides multicelulares organotípicos
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS	Tampão fosfato-salino
PD-L1	Ligante de morte programada 1
PDX	Xenoinxertos derivados de paciente
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PFA	Paraformaldeído
Ras	Vírus do sarcoma de rato
RE	Receptor de estrogênio
RhoA	Membro A da família homólogo Ras
RP	Receptor de progesterona
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute1640
RIPA	Ensaio de radioimunoprecipitação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfado de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Tampão Tris-salino
TBST	Tampão Tris-salino com Tween 20
TDTs	Esferoides tumorais derivados de tecido
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris – HCl	Tris-hidroxi-metil-amino-metano cloridrato
TrKB	Receptor de tirosina quinase neurotrófica B
Twist	Proteína relacionada a Twist
UICC	União Internacional Contra o Câncer
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
VIM	Vimentina
W	Watt
WB	<i>Western Blotting</i>
ZO-1	Zona ocludente 1

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1 Câncer de mama	1
	1.1.1 Epidemiologia	1
	1.1.2 Classificação do câncer de mama.....	3
	1.1.3 Sinais e Sintomas.....	5
	1.1.4 Tratamento.....	6
	❖ Doxorubicina.....	8
	❖ β -lapachona.....	8
	1.2 Metástase	9
	1.2.1 Da origem ao estabelecimento do processo metastático.....	9
	1.2.2 Transição epitelial-mesenquimal e outros tipos de migração.....	12
	1.2.3 A metástase como alvo terapêutico.....	15
	1.3 Sistema de cultivo celular tridimensional	17
	1.3.1 Tipos de cultivo 3D.....	18
	1.3.1.1 Esferoides tumorais.....	20
	1.3.2 Contribuições do modelo de esferoide para o entendimento do câncer de mama	23
	1.3.3 Outras aplicações.....	26

2	OBJETIVOS	28
	2.1 Objetivo Geral	28
	2.2 Objetivos Específicos.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
	3.1 Linhagem celular e tumores provenientes de camundongo.....	29
	3.2 Cultura primária de células tumorais mamárias murinas	29
	3.3 Propagação das células em monocamada (2D) e cultura tridimensional (3D).....	30
	3.4 Tratamento, análise do tamanho do esferoide e ensaio de migração celular.....	30
	3.5 Análise do centro necrótico.....	31
	3.6 Análise de morte celular	31
	3.7 Análise de viabilidade celular.....	32
	3.8 Microscopia confocal e de fluorescência	32
	3.9 <i>Western Blotting</i>	34
	3.10 Análises estatísticas	35
4	RESULTADOS	36
	4.1 Estabelecimento do modelo 3D do tipo esferoide	36
	4.2 Produção de esferoides a partir de tumores mamários murinos.....	41
	4.3 Caracterização do ensaio de migração para avaliação do potencial metastático <i>in vitro</i>	43
	4.4 Validação do modelo de ETM para teste de resposta terapêutica.....	45
	4.4.1 Doxorrubicina induz citotoxicidade nos ETM	45

4.4.2	Doxorrubicina inibe potencial metastático <i>in vitro</i>	49
4.4.3	β -lapachona induz citotoxicidade nos ETM	52
4.4.3	β -lapachona inibe potencial metastático <i>in vitro</i>	55
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÕES	69
7	FRUTOS DO PROJETO	70
8	PERSPECTIVAS	71
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

Nesse tópico inicial dissertaremos sobre os aspectos epidemiológicos da doença, classificação dos tumores de mama, principais sintomatologias e tipos de tratamento, finalizando discorrendo um pouco mais sobre dois agentes anticâncer que foram utilizados nesse estudo.

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo todo, afetando cerca de 2,1 milhões de mulheres a cada ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2019). No Brasil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, também é o mais comum entre as mulheres. A única região do país em que o câncer de mama não é o mais prevalente, é a região Norte, onde o câncer de colo de útero é o tipo mais frequente. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o biênio 2018-2019, foram estimados 59.700 novos casos para cada ano (Figura 1.1). Nos homens a incidência é de apenas 1% (INCA, 2018).

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Colon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.1: Incidência dos tipos de câncer mais prevalentes estimados para o ano de 2018, exceto câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA, 2018.

Em relação às taxas de mortalidade, para o ano de 2017 foi estimado um total de 16.927 óbitos, compreendendo 16.724 mulheres e 203 homens, segundo dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade, do Ministério da Saúde e do INCA,

sendo o câncer de mama a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (Figura 1.2) (SIM/MS & INCA, 2017).

Vale ressaltar que a incidência e mortalidade aumentam com a idade, crescendo progressivamente a partir dos 40 anos, sendo um dos maiores fatores de risco. De modo importante, o câncer de mama também pode apresentar componente hereditário, por exemplo, entre 10% a 15% dos casos, ocorre mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* (FERNANDES *et al.*, 2016).

Localização Primária	Óbitos	%
Mama	16.724	16,1
Traqueia, Brônquios e Pulmões	11.792	11,4
Cólon e Reto	9.660	9,3
Colo do útero	6.385	6,2
Pâncreas	5.438	5,2
Estômago	5.107	4,9
Localização primária desconhecida	4.714	4,6
Fígado e Vias biliares intra-hepáticas	4.292	4,1
Sistema Nervoso Central	4.401	4,1
Ovário	3.879	3,7
Todas neoplasias	103,583	100,0

Figura 1.2: Taxa de mortalidade das localizações primárias mais frequentes, no Brasil, em mulheres, no ano de 2017. Fonte: SIM, 2017.

Nos países desenvolvidos, além do diagnóstico precoce, tem sido demonstrado que, com o surgimento das inovações terapêuticas, como a terapia alvo anti-HER2 (veremos mais adiante), as taxas de sobrevida e tempo livre de doença das pacientes com câncer de mama metastático tem melhorado, aumentando para 2,5 anos a média de sobrevida e para 6 meses, o tempo livre de doença (MENDES *et al.*, 2015; SWAIN *et al.*, 2013).

Em contrapartida, nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, como no Brasil, o câncer de mama ainda é um grande problema de saúde pública (WERUTSKY, NUNES & BARRIOS, 2019). Os números de incidência e mortalidade crescem a cada ano, enfatizando a necessidade de estratégias que visem o controle do câncer de mama a fim de melhorar o prognóstico e qualidade de vida das pacientes. Nesse sentido, o rastreamento e detecção precoce do tumor, através da mamografia, por exemplo, aliados à conscientização da população aos sinais e sintomas da doença; bem como ao acesso gratuito dos pacientes a profissionais e serviços de saúde de qualidade e tratamentos adequados são apontados como

principais pilares para a prevenção e melhor prognóstico, segundo as “Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil”, do Ministério da Saúde e INCA (MS/INCA, 2015).

1.1.2 Classificação do câncer de mama

O câncer de mama é heterogêneo. Há uma variedade de subtipos moleculares, padrões histológicos e comportamentais, seja ele *in situ* (não invasivo) ou invasivo, que são cruciais para o diagnóstico, tomada de decisão do tratamento mais adequado e prognóstico da paciente.

A classificação histológica subdivide os tumores de mama em diversos subtipos, de acordo com a origem, morfologia e comportamento das células tumorais, os quais são constantemente atualizados, de acordo com os achados clínicos e científicos (GOBBI, 2012). Os padrões histológicos mais comuns são o carcinoma ductal (70 - 80%) e lobular (10 - 15%) invasivos. O carcinoma ductal se origina dos ductos que produzem o leite, enquanto que o lobular se inicia nos lóbulos que o transportam, como representado na figura 1.3; contudo, ambos por terem caráter invasivo, são capazes de sair do seu local de origem e alcançar regiões adjacentes à mama e até longas distâncias (metástase) (ONCOGUIA, 2017b).

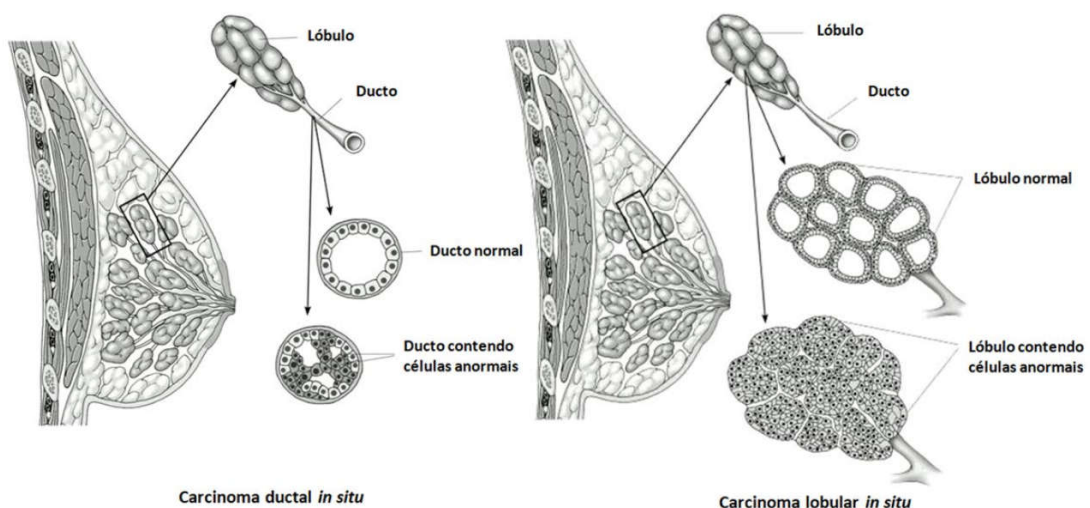


Figura 1.3: Origem dos tipos de câncer de mama mais prevalentes. O carcinoma ductal se origina nos ductos mamários e o lobular nos lóbulos que transportam o leite. Fonte: Oncoguia, 2017b.

Ainda, existe uma classificação histológica que também leva em consideração o grau de diferenciação e potencial replicativo das células, denominada de grau histológico, que varia de I a III. Quanto mais indiferenciadas e proliferativas as células, maior o grau histológico, e pior o prognóstico (HENSON *et al.*, 1991; IVSHINA *et al.*, 2006).

Há também uma classificação molecular que se baseia na expressão ou ausência de expressão de 3 receptores hormonais. São eles: o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), e o receptor de fator de crescimento epidermal tipo 2 (HER2). Sendo o subtipo triplo-negativo (ausência na expressão dos três receptores) o de pior prognóstico. Importante, adicionalmente ao perfil de expressão desses receptores, o *status* de Ki-67, um marcador de proliferação celular, também é averiguado, sendo um importante indicador de malignidade (CHEANG *et al.*, 2009; YIP *et al.*, 2016). Através de análises por imunohistoquímica e/ou moleculares os tumores são então, categorizados nos seguintes subtipos: luminal A (RE+ ou RP+ / HER2- Ki-67-); luminal B (RE+ ou RP+ / HER2- Ki-67+) ou (RE+ ou RP+ / HER2+); HER2 positivo (RE- ou RP- / HER2+); ou triplo-negativo (RE- ou RP- / HER2-) (DAI *et al.*, 2015; SERRA *et al.*, 2014; YERSAL & BARUTCA, 2014), como melhor esquematizado na figura 1.4. Importante ressaltar que, apesar dessa classificação ser aceita na clínica, com o avanço científico e tecnológico, novas biomarcadores e, conseqüentemente, novas classificações vem surgindo ao longo dos anos, contribuindo cada vez mais para o entendimento da biologia tumoral.

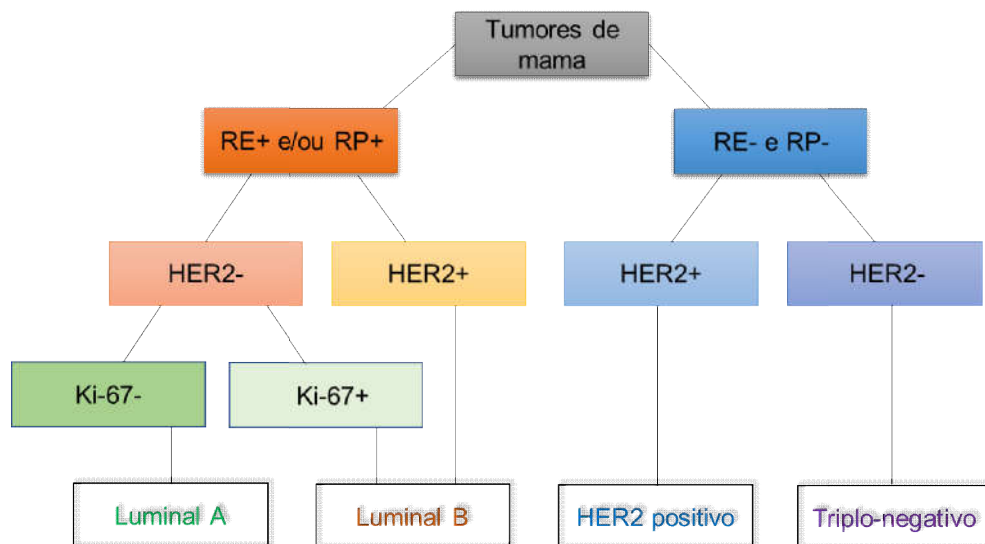


Figura 1.4: Subtipos moleculares do câncer de mama. De acordo com a expressão de receptores celulares e Ki-67, o câncer de mama se subdivide em 4 categorias moleculares básicas: luminal A,

luminal B, HER2 positivo e triplo-negativo. RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; HER2, receptor de fator de crescimento epidermal tipo 2. Fontes: Blows et al., 2010 e Yersal & Barutca, 2014. Desenho esquemático por Laura Coelho.

Existe também a classificação clínica de tumores sólidos baseada do estadiamento, denominada TNM, definida pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), que leva em consideração o tamanho do tumor (T), acometimento ou não de linfonodos regionais (N) e se houve metástase à distância (M). Conforme esta classificação é possível agrupar os tumores em estádios que vão do 0 ao IV, sendo o estágio zero o carcinoma *in situ* e o último o mais agressivo e invasivo (UICC, 2009).

Como mencionado acima, a identificação do subtipo tumoral é de extrema importância não só para o diagnóstico e tratamento. Dependendo da categoria em que é classificado, é possível saber se o tumor está relacionado com um bom ou mal prognóstico. Por exemplo, já foi demonstrado que os tumores com alta expressão de HER2+ e, novamente, os triplo-negativos, são os que apresentam pior resolução, quando comparados ao luminal A (DAI *et al.*, 2017).

1.1.3 Sinais e Sintomas

Os sinais e sintomas do câncer de mama variam de paciente para paciente, contudo existem aqueles mais comuns. É crucial a conscientização e identificação dessas características pelas mulheres, pois contribuem para a detecção precoce e um diagnóstico mais rápido. De acordo com o INCA, o Ministério da Saúde e o Instituto Oncoguia, os principais são (Figura 1.5) (INCA, 2019; MS, 2019; ONCOGUIA, 2017a).

- Nódulo fixo, geralmente indolor
- Alteração no tamanho ou forma da mama
- Edema da pele
- Pele da mama avermelhada, assemelhando-se a casca de laranja
- Alterações no mamilo
- Pequenos nódulos nas axilas ou pescoço
- Secreção de líquido pelo mamilo

- Dor na mama ou mamilo

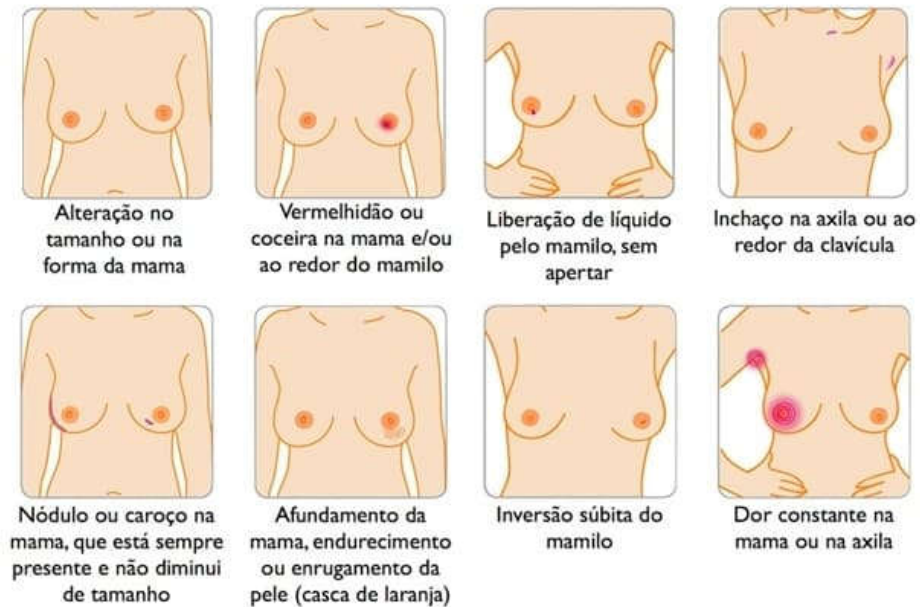


Figura 1.5: Sinais e sintomas do câncer de mama. Fonte: domínio público.

1.1.4 Tratamento

Por se tratar de uma doença heterogênea, com inúmeras apresentações histológicas e moleculares, como vimos acima, o tratamento do câncer de mama varia de acordo com o tipo de tumor do paciente. No momento da decisão do melhor esquema terapêutico, o médico leva em consideração as informações do subtipo do tumor, estadiamento da doença, além das características clínicas do paciente. Quando detectado no início - obviamente, a depender das características do tumor, o prognóstico tende a ser mais positivo. Quando há metástase, os tratamentos visam melhorar as taxas de sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (AL-MAHMOOD *et al.*, 2018)

Nesse sentido, o tratamento pode ser subdividido em local, compreendendo a cirurgia e radioterapia; ou sistêmico, abrangendo a quimioterapia, hormonioterapia e a terapia-alvo. Também há a divisão em tratamento adjuvante ou neoadjuvante. O primeiro ocorre após a cirurgia, a fim de destruir possíveis células remanescentes e evitar a reincidência do tumor; enquanto que o segundo é realizado antes da cirurgia, com o objetivo de reduzir o tamanho e extensão do tumor (CARDOSO *et al.*, 2018).

O tratamento cirúrgico pode ser conservador, com a retirada apenas do tumor, ou radical, através da mastectomia. A quimioterapia inclui antraciclinas (doxorubicina e epirubicina), agentes alquilantes (ciclofosfamida) e taxanos (paclitaxel e docetaxel). A radioterapia pode ser realizada com raios X, gama ou elétrons. Quando considerada, a hormonioterapia compreende o uso de tamoxifeno, letrozole e inibidores da aromatase. Mais recentemente, a terapia alvo vem apresentando bons resultados através da inibição do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) com o anticorpo anti-VEGF (bevacizumabe), e da inibição de HER2 com os anticorpos anti-HER2 (trastuzumabe, pertuzumabe e lapatinibe) (BODAI & TUSO, 2015; CARDOSO *et al.*, 2018; GOLDBIRSCH *et al.*, 2013).

Um grande avanço dos últimos tempos foi o advento da imunoterapia voltada ao câncer, graças aos estudos de dois grupos de pesquisadores, contemplados com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2018 (ISHIDA *et al.*, 1992; LEACH, KRUMMEL & ALLISON, 1996). Esse tipo inovador de tratamento baseia-se na estimulação do sistema imunológico do paciente para atacar as células tumorais. A imunoterapia, através da administração do atezolizumabe, foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) na metade do ano de 2019, apenas para pacientes com câncer de mama triplo-negativo em estágios avançados, e que expressam na superfície das suas células tumorais a proteína PD-L1, necessária para o sucesso do tratamento, uma vez que o atezolizumabe age inibindo esse ligante (HEIMES & SCHMIDT, 2019; ZHANG *et al.*, 2017). A decisão foi baseada num estudo clínico de fase 3, com pacientes desse perfil, o qual evidenciou que o atezolizumabe em combinação com o nab-paclitaxel prolonga a taxa de sobrevida para 10 meses e a taxa de progressão da doença para 2,5 meses, quando comparado com o grupo placebo combinado ao nab-paclitaxel (SCHMID *et al.*, 2018). Contudo, ainda é um grande desafio o alto custo e a indisponibilidade do imunoterápico nos sistemas públicos de saúde do nosso país.

Além da imunoterapia, os avanços científicos e tecnológicos, principalmente na área molecular, com a descoberta de novos subtipos, mutações, biomarcadores e melhor entendimento do comportamento tumoral, têm contribuído para inovações terapêuticas e a possibilidade de tratamentos mais personalizados, ou seja, específico para cada paciente, o grande futuro da medicina, da oncologia e do bem-estar do paciente (DE ABREU *et al.*, 2014; DUMBRAVA & MERIC-BERNSTAM, 2018).

A seguir, discorreremos de forma mais detalhada sobre os dois agentes terapêuticos utilizados nesse estudo: a doxorubicina, quimioterápico amplamente utilizado na clínica e, a β -lapachona, um promissor composto natural que apresenta efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

❖ Doxorubicina

A doxorubicina (dox) é um quimioterápico e antibiótico da classe das antraciclinas, amplamente utilizado na clínica para o tratamento de diversos tipos de câncer, como: leucemia, neuroblastoma, câncer de ovário, pulmão, incluindo câncer de mama (HERNANDEZ-AYA & GONZALEZ-ANGULO, 2013; THORN *et al.*, 2011). Dependendo das características biológicas do tumor e do paciente, a dox pode ser administrada sozinha ou em combinações com outros quimioterápicos, ou mesmo juntamente com outros esquemas terapêuticos que não a quimioterapia (BURANRAT, SUWANNALOET & NAOWABOOT, 2017; WU *et al.*, 2013).

A dox apresenta diferentes mecanismos de ação, podendo atuar como intercalante de DNA, inibir a topoisomerase II ou, ainda, formar radicais livres dentro das células, ambos os processos culminando em inibição da replicação e/ou morte celular (TACAR, SRIAMORNSAK & DASS, 2013). De modo importante, já foi descrita induzir apoptose e necrose, bem como induzir atraso do ciclo celular em diferentes linhagens celulares de câncer de mama, como a MCF-7 e a MDA-MB-231 (BAR-ON, SHAPIRA & HERSHKO, 2007; ONCUL & ERCAN, 2017; PILCO-FERRETO & CALAF, 2016). Apesar de sua excelente atividade antitumoral, até mesmo contra o câncer de mama avançado, a dox pode induzir efeitos colaterais graves, como a cardiotoxicidade aguda ou crônica (CHATTERJEE *et al.*, 2010; KOLEINI & KARDAMI, 2017). Nesse sentido, novas formulações da dox tem sido estudadas e propostas a fim de reduzir possíveis efeitos colaterais, bem como aumentar o *delivery* da droga dentro do tumor, como por exemplo, a sua forma encapsulada lipossomal peguilada já liberada pela Anvisa para o tratamento do câncer de mama metastático (RIVANKAR, 2014; ZHAO *et al.*, 2017).

❖ β -lapachona

A β -lapachona (β -lap) é uma naftoquinona natural, obtida da cerragem da madeira dos ipês (*Tabebuia avellanedae*), árvores nativas da América do Sul. Esse

composto possui diversos efeitos farmacológicos, como atividade antibacteriana, tripanossomicida, antifúngica, antiviral, analgésica, antiinflamatória e antitumoral (GOMEZ CASTELLANOS, PRIETO & HEINRICH, 2009), sendo utilizada durante séculos na fitomedicina tradicional.

A atividade antineoplásica da β -lap já foi relatada em uma variedade de tumores, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, incluindo câncer de pulmão (WOO & CHOI, 2005), cólon (KEE, HAN, PARK, *et al.*, 2017), gástrico (YU *et al.*, 2014), próstata (PLANCHON *et al.*, 2001) e mama (WUERZBERGER *et al.*, 1998). Seu mecanismo de ação ainda não é bem elucidado, mas há estudos demonstrando inibição da topoisomerase I e II, interferindo nos mecanismos de replicação da célula; além de indução de geração de radicais livres (DOCAMPO *et al.*, 1979; KRISHNAN & BASTOW, 2000; LI, AVERBOUKH & PARDEE, 1993). Entre os efeitos antineoplásicos, esse composto natural foi descrito suprimir a progressão do tumor através da inibição da proliferação e ciclo celular; indução de morte celular, por apoptose ou necrose; ou mesmo modulando a transição epitelial-mesenquimal (TEM) (CUI *et al.*, 2018; JEON *et al.*, 2015; LI, WANG & PARDEE, 1995; YANG *et al.*, 2017). De modo interessante, a β -lapachona combinada ao quimioterápico gemcitabina está em estudo clínico de fase 2, para o tratamento do câncer de pâncreas metastático (ARQ 501). Os resultados até a presente data indicaram que de 20 pacientes 6 apresentaram regressão do tumor. Além disso, os principais efeitos adversos encontrados foram anemia, hemólise, fadiga, edema e náusea (KHONG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008).

1.2 Metástase

Nesse segundo tópico discutiremos um pouco sobre a metastase, desde sua origem até a recolonização do tumor no sítio secundário. Falaremos também de alguns mecanismos de migração que as células tumorais orquestram durante este processo e, por fim, discorreremos sobre a metastase como alvo para terapia.

1.2.1 Da origem ao estabelecimento do processo metastático

A metastase é a causa primária de morbidade e mortalidade relacionada ao câncer. Trata-se de processo que inclui múltiplas etapas no qual, de modo simplório,

as células tumorais são capazes de sair do seu local de origem e alcançar longas distâncias no corpo através do sangue ou vasos linfáticos e colonizar outros tecidos (DUFFY, MCGOWAN & GALLAGHER, 2008; LAMBERT, PATTABIRAMAN & WEINBERG, 2017).

A metástase é um importante parâmetro relacionado a progressão tumoral. De fato, é considerado um *hallmark* do câncer (HANAHAH & WEINBERG, 2000; 2011). Sabe-se que há diferentes fatores que propiciam as células tumorais de evadir do seu local de origem como, por exemplo, o ambiente hipóxico em tumores sólidos, que favorece o processo de angiogênese, crescimento e dispersão das células tumorais pelos vasos (GILKES & SEMENZA, 2013; RANKIN & GIACCIA, 2016; RUAN, SONG & OUYANG, 2009). De modo importante, hoje em dia já é reconhecido que não somente as características intrínsecas do tumor, como sua epigenética e genética, mas toda a relação que as células tumorais tem com as células estromais presentes no microambiente tumoral, como os fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, confere uma característica individual ao tumor e podem influenciar no seu desenvolvimento (MARJANOVIC, WEINBERG & CHAFFER, 2013). Por exemplo, a matriz extracelular (MEC), produzida principalmente pelos fibroblastos presentes no estroma, formam um arcabouço funcional para aporte dos novos vasos, além de servir como fonte de diversos fatores de crescimento, como o TGF- β (fator de crescimento transformante beta) e FGF (fator de crescimento de fibroblasto) (WANG *et al.*, 2019). Contudo, o que faz com que uma célula tumoral tenha capacidade metastática?

Existem diferentes hipóteses. Uma delas perpassa pela capacidade das células de perderem suas características epiteliais e adquirir um fenótipo mesenquimal, com ganho de propriedades migratórias e invasivas, processo esse conhecido como transição epitelial-mesenquimal (TEM) (HEERBOTH *et al.*, 2015; KALLURI & WEINBERG, 2009; ZHANG & WEINBERG, 2018) (veremos com mais detalhes no próximo subtópico). Outros acreditam que essas células metastáticas derivam de células-tronco teciduais, células indiferenciadas ou semi-diferenciadas que possuem capacidade intrínseca de proliferar e migrar (MOREL *et al.*, 2008). De fato, o aumento na expressão de marcadores de células-tronco tumorais (CD133, CD90, EpCAM) está correlacionado a maior agressividade do tumor (DRASIN, ROBIN & FORD, 2011; KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014; LIU & FAN, 2015). Ainda há a junção dessas duas hipóteses, onde acredita-se que as células que realizam TEM são originadas a partir de células-tronco epiteliais (DRASIN, ROBIN & FORD, 2011; KALLURI & WEINBERG,

2009). De forma intrigante, segundo Seyfried e Huysentruyt (2013), também existe a possibilidade das células tumorais metastáticas apresentarem uma origem mielóide, a partir de macrófagos, uma vez que muitos tumores metastáticos, inclusive de mama, apresentam células neoplásicas com propriedades de macrófagos (SEYFRIED & HUYSENTRUYT, 2013). Por exemplo, há trabalhos demonstrando antígenos de macrófagos, como o CD11b e o CD163, também sendo expressos pelas células tumorais (CALVO *et al.*, 1987; SHABO *et al.*, 2008).

No entanto, independente da origem, o processo metastático pode ser dividido em quatro etapas principais que se interconectam, também conhecido como cascata de invasão-metástase: desagregação, migração, invasão e adesão, esquematizado na figura 1.6, no final desse subtópico.

A primeira etapa consiste da desagregação das células do sítio primário, envolvendo perda de proteínas de junção célula-célula e célula-matriz, como E-caderina, ZO-1, integrinas, além de perda de polaridade celular, processos estes que caracterizam a TEM (HEERBOTH *et al.*, 2015; KALLURI & WEINBERG, 2009; LAMOUILLE, XU & DERYNCK, 2014), que será abordado mais adiante. Em seguida, as células metastáticas migram e invadem a membrana basal e componentes da matriz extracelular, podendo este processo ser dependente de atividade proteolítica de enzimas presentes na MEC, como as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) (RADISKY & RADISKY, 2010), ou ocorrer sem ação da degradação por protease, como é o caso da migração celular amebóide, em que as células são capazes de exercer força mecânica e passar pela MEC (YOSHIDA & SOLDATI, 2006). De maneira importante, durante o processo migratório/invasivo, as células reorganizam o citoesqueleto de actina, formando protusões membranares como lamelopódia, filapódia e invadopódia, características essenciais para a motilidade celular (ALIZADEH, SHIRI & FARSINEJAD, 2014; GUAN, 2015). Os próximos passos são uma sequência de eventos, que incluem: intravasamento (migração transendotelial) nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, que pode ocorrer passiva ou ativamente (BOCKHORN, JAIN & MUNN, 2007); disseminação das células através dos vasos, alcançando a circulação sistêmica; extravasamento das células tumorais através das células endoteliais e membrana basal dos vasos distais; este último podendo ocorrer por diferentes mecanismos como, por exemplo, migração paracelular ou transcelular (KAWAGUCHI & NAKAMURA, 1986; LANGLEY & FIDLER, 2011), ou mesmo pela capacidade das células tumorais de estimularem as células endoteliais a se

retraírem (HONN *et al.*, 1994); todas essas etapas culminando na adesão e restabelecimento das células tumorais em outros órgãos, formando novas redes de sinalização e vasculares, podendo o tumor crescer novamente (KAWAUCHI, 2012).

Um importante questionamento que surge é se há um lugar “pré-definido” para onde as células tumorais devem metastatizar. De acordo com a hipótese “*seed and soil*” (PAGET, 1889), existe uma interação favorável entre as células tumorais metastáticas (*seed*) e o microambiente do órgão (*soil*) que propiciam a sobrevivência e crescimento das células tumorais num sítio de metástase específico. Estudos já evidenciaram que a interação entre a quimiocina CXCL12, produzida por células estromais de órgãos-alvos para metástase no câncer de mama, e seus receptores expressos nas células tumorais, como o CXCR4, possuem papel na colonização das células tumorais mamárias nesses sítios específicos (BURGER & KIPPS, 2006; LANGLEY & FIDLER, 2011). De fato, pesquisadores demonstraram que ao neutralizar essa interação CXCL12/CXCR4 *in vivo*, há supressão da metástase de células tumorais para o linfonodo e pulmão (MULLER *et al.*, 2001).

Essa hipótese não é universalmente aceita, existem cientistas que acreditam que as propriedades anatômicas e mecânicas dos vasos são os principais fatores que direcionam o local da metástase (LANGLEY & FIDLER, 2011). O consenso que parece prevalecer nos dias atuais, é que nenhuma das propostas é mutualmente exclusiva, tudo vai depender do tipo do tumor que está sendo analisado. De qualquer forma, sabe-se que os principais locais para quais as células tumorais mamárias metastatizam são os linfonodos, ossos, pulmões, cérebro e fígado (PATANAPHAN, SALAZAR & RISCO, 1988; WEIGELT, PETERSE & VAN 'T VEER, 2005).

1.2.2 Transição epitelial-mesenquimal e outros tipos de migração

No ano 2000, Hanahan e Weinberg apontaram seis *Hallmarks* do câncer, dentre eles a “indução de invasão e metástase” (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Em uma revisão posterior, os autores atualizaram os achados e além de incluírem mais quatro *Hallmarks*, reconheceram a importância do microambiente tumoral na tumorigênese e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Mais que isso, o artigo traz a transição epitelial-mesenquimal como principal mecanismo orquestrado pelas células de carcinomas de origem epitelial, como o câncer de mama, para invasão e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Vimos acima que o processo metastático ocorre em múltiplas e complexas etapas. A TEM é considerada um passo inicial da invasão/metástase, onde, de modo suscito, as células tumorais perdem as características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal; apresentando perda de polaridade apical-basal, morfologia alterada - normalmente verifica-se o formato fusiforme, resistência a apoptose e, ganhando propriedades invasivas e migratórias (GUAN, 2015; KALLURI & WEINBERG, 2009; KAWAUCHI, 2012; MITTAL, 2018).

De forma interessante, esse processo não ocorre somente durante a progressão de carcinomas. Pode ter um papel fisiológico, sendo importante no período de morfogênese embrionária (VON GISE & PU, 2012) ou mesmo, na cicatrização de feridas (WEBER *et al.*, 2012); ou patológico, como durante o desenvolvimento da fibrose (CHAPMAN, 2011).

A TEM possui uma plasticidade enorme, da mesma forma que as células tumorais são capazes de adquirir fenótipo mesenquimal, é possível haver a desdiferenciação de mesênquima para epitélio, processo conhecido como transição mesenquimal-epitelial, do inglês MET (IWATSUKI *et al.*, 2010; THIERY, 2002). A MET tem uma importante função na recolonização das células após alcançarem o sítio de metástase (HEERBOTH *et al.*, 2015; LAMOUILLE, XU & DERYNCK, 2014). Além de ser um processo reversível, hoje em dia sabe-se que existem fenótipos intermediários entre a célula epitelial e mesenquimal, ou seja, as células podem ao mesmo tempo expressar marcadores de ambos os fenótipos em determinado momento. Alguns autores chamam esse acontecimento de “espectros intermediários” ou mesmo, TEM parcial (KALLURI & WEINBERG, 2009; ZHANG & WEINBERG, 2018).

Diferentes estímulos já foram descritos favorecer a TEM, havendo contribuições tanto das próprias células tumorais, quanto das estromais. Dentre eles, podemos citar diversos fatores de crescimento (TGF- β , FGF, EGF, VEGF), vias de sinalizações (PI3K/AKT/mTOR, Ras- MAPK), hipóxia, estresse mecânico e metabólico e alterações na rigidez da MEC (CORREIA & BISSELL, 2012; HANAHAN & WEINBERG, 2011; LAMOUILLE, XU & DERYNCK, 2014; LEHUEDE *et al.*, 2016; RANKIN & GIACCIA, 2016; TURLEY *et al.*, 2008; WANG & ZHOU, 2013).

Também foi demonstrado que alguns fatores de transcrição como, por exemplo, Twist, Snail e Slug, que inclusive são acionados durante a embriogênese, são cruciais durante esse processo (DE CRAENE & BERX, 2013; MORENO-BUENO, PORTILLO & CANO, 2008). Uma outra característica-chave é a perda da proteína de

junção célula-célula do tipo aderente E-caderina (E-cad) (HUANG, GUILFORD & THIERY, 2012; MORENO-BUENO, PORTILLO & CANO, 2008), marcador de células epiteliais, processo esse já evidenciado ser regulado pelos fatores de transcrição mencionados acima (BOLOS *et al.*, 2003; PEINADO *et al.*, 2004; VESUNA *et al.*, 2008). Vimentina é o maior componente dos filamentos intermediários do citoesqueleto, sendo expressa pelas células de origem mesenquimal. Durante o desenvolvimento tumoral e TEM, tem-se verificado aumento na expressão dessa proteína, sendo considerado outro importante marcador (HEERBOTH *et al.*, 2015; SATELLI & LI, 2011). Uma variedade de estudos com câncer de mama sejam eles, *in vitro*, em modelo experimental ou mesmo analisando biópsias de pacientes, tem evidenciado que a perda de E-cad, além do aumento na expressão de vimentina e desses fatores de transcrição estão relacionados com a maior capacidade invasiva das células, maior grau histológico e ocorrência de metástase (KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014; VESUNA *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2017).

Além da migração mesenquimal, as células são capazes de migrar de outras duas formas: coletivamente, em grupos; ou, através de movimentos amebóides. No primeiro tipo de migração, não há perda de junção entre as células que se desprenderam do tumor original, dessa forma a E-cad se mantém preservada. A migração coletiva acontece durante o processo fisiológico de formação dos ductos mamários (EWALD *et al.*, 2008) e também já foi identificada no câncer de mama (ILINA *et al.*, 2018; KHALIL *et al.*, 2017). Já a migração amebóide, é uma forma mais rara, onde as células migram individualmente sem atividade de protease, movendo-se através de propulsão mecânica, formando *blebs* ou outras protusões e deslizando pelos interstícios da MEC, podendo ocorrer tanto durante a migração mesenquimal (transição mesenquimal-amebóide, MAT) ou coletiva (transição coletiva-amebóide, CAT) (KAWAUCHI, 2012; TALKENBERGER *et al.*, 2017). Típica de leucócitos, também já foi demonstrada ser realizada por células tumorais mamárias (GAO *et al.*, 2017; MADSEN & SAHAI, 2010).

Todos esses tipos de migração orquestrados pela célula tumoral, bem como a cascata de invasão-metástase, foram didaticamente representados por Kawauchi (2012) (Figura 1.6).

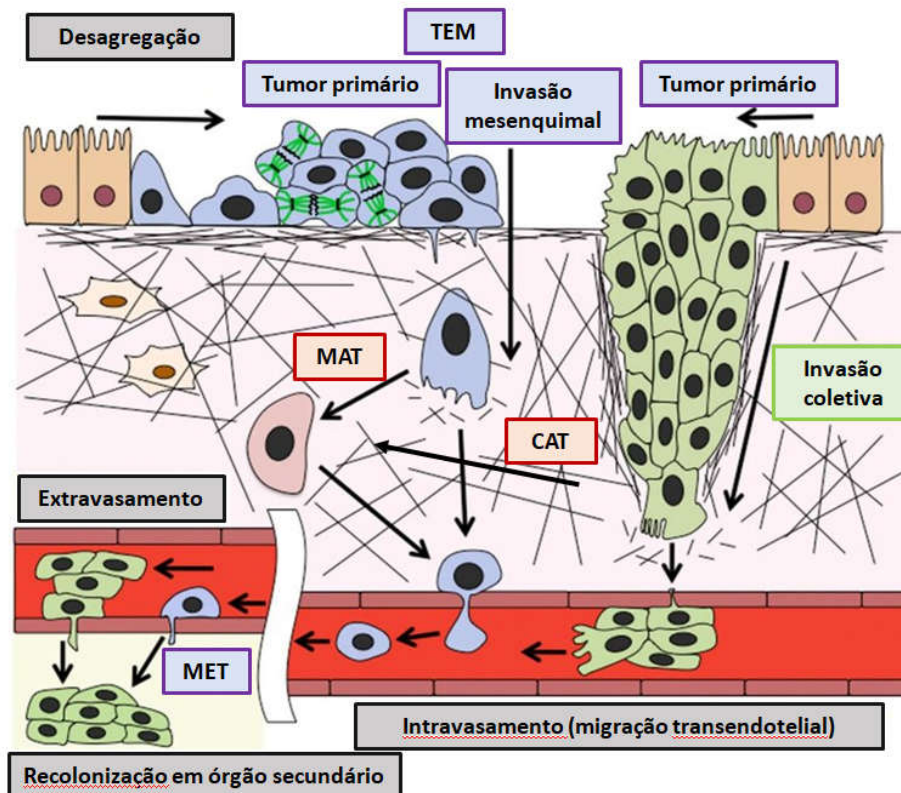


Figura 1.6: Cascata de invasão-metástase e diferentes tipos de migração. Células com potencial metastático se desagregam, migram e invadem a membrana basal e matriz extracelular de forma individual ou coletiva; adentram os vasos sanguíneos e/ou linfáticos (intravasamento), disseminam-se pelos vasos, extravasam e alcançam regiões distais, recolonizando novamente. Células laranjas: células epiteliais não tumorais. Células azuis: células tumorais com fenótipo mesenquimal. Grupo de células verdes: células tumorais que migram coletivamente. TEM: transição epitelial-mesenquimal. MAT: transição mesenquimal-amebóide. CAT: transição coletiva-amebóide. MET: transição mesenquimal-epitelial. Fonte: adaptado a partir de Kawauchi (2012).

1.2.3 A metástase como alvo terapêutico

O tratamento para a doença metastática do câncer de mama se dá primariamente pela terapia sistêmica, com o uso de quimioterápicos, além de outros esquemas, como hormonioterapia, terapia-alvo e mais recentemente (e raro), a imunoterapia, dependendo das características do tumor e aspectos clínicos da paciente (CARDOSO *et al.*, 2018), como já foi falado anteriormente. O advento da terapia-alvo e imunoterapia como alternativa ou uso em conjunto com a quimio e hormonioterapia, possibilitaram um tratamento muito mais direcionado e tem contribuído para a melhora nas taxas de sobrevivência dos pacientes nos países

desenvolvidos (MENDES *et al.*, 2015). Contudo, mesmo a doença metastática podendo ser tratável, muitos pacientes apresentam resistência ao tratamento e a média do índice de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 25%, segundo dados da Sociedade Americana do Câncer, 2017 (ACS, 2017).

De maneira importante, o avanço científico e tecnológico nas últimas décadas e, com grandes contribuições principalmente da área de biologia celular e molecular, ajudando a desvendar os mecanismos envolvidos na progressão tumoral (MCSHERRY *et al.*, 2007), tem possibilitado a emergência de novos biomarcadores e alvos terapêuticos relacionados a metástase. A seguir, discorreremos um pouco sobre tais avanços e descobertas. Enfatizando que, como o câncer metastático compartilha passos e vias de sinalizações comuns, os alvos terapêuticos não se limitam somente ao câncer de mama metastático.

Novamente, um dos primeiros passos da cascata de invasão-metástase é o desprendimento das células do tumor primário (KALLURI & WEINBERG, 2009; KAWAUCHI, 2012). Quando isso ocorre numa situação fisiológica, células epiteliais e endoteliais sofrem apoptose, sendo este fenômeno conhecido como anoiquia, do inglês *anoikis*. Células tumorais apresentam resistência a anoiquia (CAO, LIVAS & KYPRIANOU, 2016; PAOLI, GIANNONI & CHIARUGI, 2013). Nesse sentido, uma das propostas terapêuticas é reverter essa resistência (GUAN, 2015; SAKAMOTO & KYPRIANOU, 2010). Os agentes são divididos em duas classes, os indutores de anoiquia e inibidores de moléculas que a suprimem. Um exemplo de indutor é a doxazosina, que tem sido demonstrada ter grande atividade antitumoral ao induzir apoptose através da ativação de DISC/caspase 8, além da inibição de Akt (GARRISON & KYPRIANOU, 2006). Já o receptor de tirosina quinase neurotrófica B (TrKB) é um supressor da anoiquia, inibição desse receptor tem contribuído para reduzir a progressão tumoral (CAMORATTO *et al.*, 1997).

Existem também inibidores da motilidade celular, dentre eles podemos citar os antagonistas da N-caderina (N-cad) e de integrinas. A N-cad é uma proteína de junção celular e, ao contrário da E-caderina, o aumento na sua expressão está relacionado com maior propensão das células tumorais a migração e metástase. (HAZAN *et al.*, 2000; NAGI *et al.*, 2005). Um exemplo de um inibidor da N-cad é a ADH-1; encontra-se em teste clínico de fase 1, a sua utilização junto a outros quimioterápicos (cloridrato de gencitabina e cisplatina), para pacientes com câncer pancreático ou de bexiga localmente avançado ou metastático (BERIM *et al.*, 2017).

As integrinas são proteínas importantes na interação célula- matriz, e tem papel fundamental na dinâmica do citoesqueleto de actina e movimento celular. Cilengitide é um inibidor da cadeia β da integrina, o qual age impedindo a ligação da mesma com a MEC, interferindo na motilidade das células (HYNES, 2002; MAS-MORUNO, RECHENMACHER & KESSLER, 2010). De modo interessante, em modelo experimental de câncer de mama com metástase óssea, o cilengitide foi capaz de inibir a progressão tumoral, quando comparado com o controle não tratado (BAUERLE *et al.*, 2011).

Uma outra abordagem é tentar interferir com o microambiente tumoral (FANG & DECLERCK, 2013), e pela sua complexidade, existe uma infinidade de vias de sinalização que se entrelaçam, onde podemos citar: inibidores de fatores de crescimento, como inibidores do VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) e seu receptor. O anticorpo monoclonal anti-VEGF (bevacizumabe) já é utilizado na clínica contra o câncer de mama (CARDOSO *et al.*, 2018); inibidores de proteases, como os inibidores das MMPs, ainda em teste clínicos (RADISKY & RADISKY, 2010; WINER, ADAMS & MIGNATTI, 2018); inibidores do processo inflamatório, como os inibidores da produção do TGF- β (estudo clínico já em fase 3 para tumor cerebral) (BOGDAHN *et al.*, 2011) ou inibidores do TNF (fator de necrose tumoral), em fase 2 para câncer de mama metastático (MADHUSUDAN *et al.*, 2004); ainda há aqueles que interferem com a hipóxia (REDDY & WILLIAMSON, 2009); células estromais, muitos deles incluem os inibidores de MMPs, fatores de crescimento e inflamação citados acima (ZOLLO *et al.*, 2012); e remodelamento da MEC (inibidores do ácido hialurônico ou proteoglicanos de heparan sulfato) (BREKKE & DE LANGE DAVIES, 1998; HAMMOND *et al.*, 2014; OMIDI & BARAR, 2014).

À medida que novas descobertas são feitas e, compostos validados, esta lista tende a aumentar. É muito importante o desenvolvimento de alternativas aos tratamentos vigentes a fim de se ter uma terapia mais direcionada, mais eficaz e com menos efeitos adversos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

1.3 Sistema de cultivo celular tridimensional

O cultivo de células em monocamada, ou bidimensional (2D) tem contribuído desde o início do século 19, para importantes descobertas no campo da biologia do câncer, e ainda continua sendo um modelo bastante utilizado, devido a sua

praticidade e baixo custo (NUNES *et al.*, 2019). Contudo, apesar de muitos compostos testados nos sistemas 2D mostrarem resultados promissores *in vitro*, falham quando testados nos modelos *in vivo* (GILLET *et al.*, 2011) e apenas 5% dos compostos de fato possuem atividade antitumoral em ensaios clínicos (LEE *et al.*, 2013). O cultivo tridimensional (3D) surge nas últimas décadas a fim de transpor essas barreiras. Ao mimetizar de forma muito mais fidedigna a morfologia e comportamento do tumor, contribui para preencher o *gap* entre os tradicionais modelos 2D e os sistemas *in vivo* (GOLIWAS *et al.*, 2017; HAM *et al.*, 2016; VIDI, BISSELL & LELIEVRE, 2013), além de reproduzirem as repostas a quimioterápicos dos próprios pacientes quando preparados a partir de células tumorais isoladas de pacientes (HALFTER *et al.*, 2015).

Nesse último tópico falaremos brevemente sobre os diferentes tipos de cultivo 3D, dando maior enfoque aos esferoides tumorais multicelulares, modelo utilizado no presente estudo, e discorreremos sobre as contribuições desse modelo para o estudo da biologia do câncer, análise de resposta terapêutica e metástase.

1.3.1 Tipos de cultivo 3D

Existem diferentes formas de se cultivar as células tridimensionalmente. Todas vão apresentar suas vantagens e limitações. Ao definir qual método utilizar, é importante pensar na aplicabilidade para a sua pesquisa, se será suficiente para responder suas perguntas. Os três modelos de cultivo 3D predominantes são: explantes de tecido tumoral; *tumor on a chip*, traduzido literalmente como “tumor em um chip”; ou esferoides tumorais (WEISWALD, BELLET & DANGLES-MARIE, 2015) (Figura 1.7).

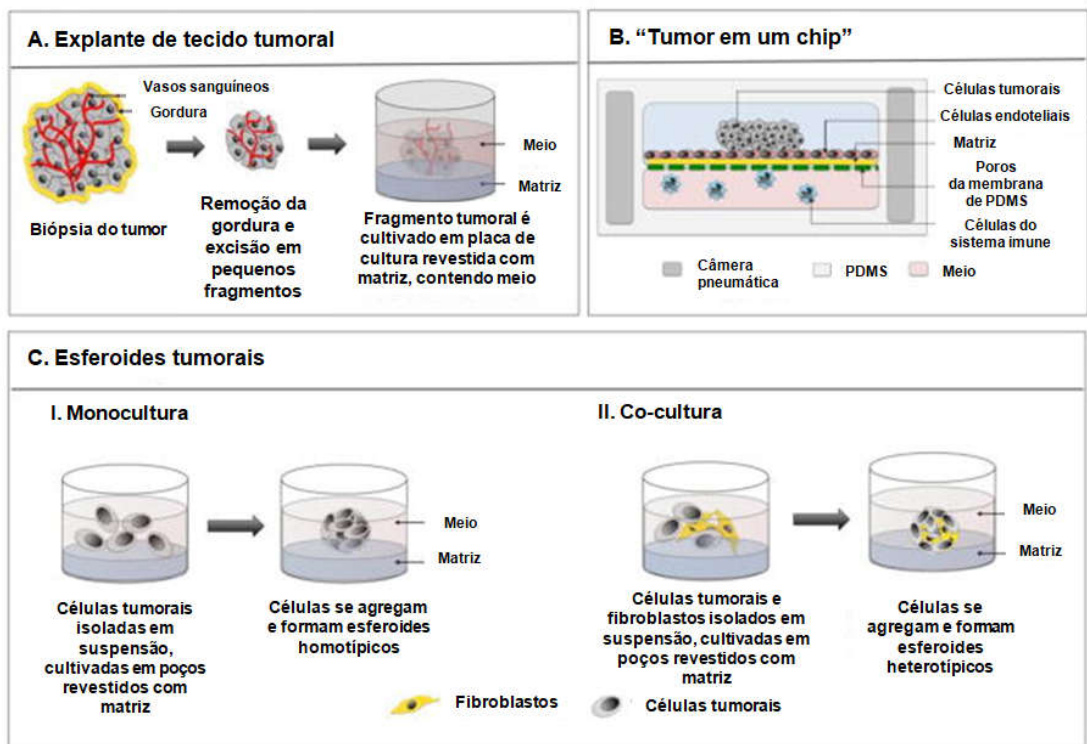


Figura 1.7: Tipos de cultivo 3D. A. modelo do explante de tecido tumoral: após remoção da gordura, cultivam-se fragmentos do tumor em uma placa de cultura contendo meio nutritivo e matriz (não obrigatório), preservando a morfologia do tecido original, como a presença de vasos sanguíneos. B. "Tumor em um chip": células tumorais são cultivadas em chips contendo câmara pneumática, células endoteliais, fibroblastos, células do sistema imune e matriz, além de um sistema de canais microfluídicos que permite circulação das células do sistema imune células tumorais. C: Esferoides tumorais: células tumorais podem ser cultivadas sozinhas ou co-cultivadas com outras células, como os fibroblastos, formando esferoides homotípicos ou heterotípicos, respectivamente. PDMS: polidimetilsiloxano (material inerte). Fonte: adaptado a partir de Nath e Devi (2016).

No modelo de explante, cultiva-se fragmentos inteiros do tumor em um recipiente (garrafa/placa) de cultura contendo meio nutritivo. Dessa forma preserva-se a morfologia do tecido original, mantendo a presença de vasos, células estromais (fibroblastos, células do sistema imune) e a própria MEC. Este modelo é um dos mais antigos, sendo muito utilizado para teste de eficácia de drogas (BERRY, LAING & WELLS, 1975; FREEMAN & HOFFMAN, 1986; KAREKLA *et al.*, 2017). Apesar de ele mimetizar muito bem a heterogeneidade do tecido original, isso também é uma desvantagem para o modelo, pois acaba refletindo as características tumor-específicas e perde na questão de reprodutibilidade (NATH & DEVI, 2016). Por outro lado, é uma boa ferramenta para a terapia personalizada (GHOSH *et al.*, 2019).

Outras limitações são o tempo de cultivo e a densidade dos fragmentos; por serem densos, eles acabam se desfazendo, e não duram muito tempo em cultura, impossibilitando estudos cinéticos grandes. Além disso, a densidade prejudica certas análises, como citometria de fluxo e aquisições de imagens através da microscopia (NATH & DEVI, 2016).

Em relação ao sistema “tumor em um chip”, trata-se de um modelo com grandes contribuições no campo da bioengenharia para reprodução do tumor *in vivo* juntamente com a recapitulação do microambiente tumoral. Baseia-se no cultivo de células tumorais em chips com um sistema de canais microfluidos, contendo câmara pneumática, células endoteliais, fibroblastos, células do sistema imune e MEC. Os chips permitem uma organização espacial dos componentes celulares e acelulares de forma similar ao que ocorre *in vivo*, além disso, os microcanais permitem a circulação de células do sistema imune e células tumorais (ALESSANDRI *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2017). Esse dispositivo engenhoso permite estudar as inter-relações dinâmicas entre tumor e microambiente tumoral e tem possibilitado análises de resposta terapêutica, moleculares e de migração celular (CHOI *et al.*, 2015; LEE, SONG & CHEN, 2016; SLEEBOOM *et al.*, 2018). Contudo, ainda é uma tecnologia muito cara.

O próximo modelo de cultivo 3D é a produção de esferoides tumorais, por ser foco do estudo será abordado de forma mais detalhada no próximo subtópico.

1.3.1.1 Esferoides tumorais

Os esferoides são o tipo de modelo 3D mais utilizado para se estudar a biologia do câncer. São capazes de recapitular a arquitetura, além de características moleculares e funcionais do tumor *in vivo* (FRIEDRICH *et al.*, 2009; GOLIWAS *et al.*, 2017; HAM *et al.*, 2016; TIMMINS *et al.*, 2005; VIDI, BISSELL & LELIEVRE, 2013). Tumores avasculares (0,5- 1 mm³) ou mesmo micrometástases, são caracterizados por apresentarem um centro necrótico e uma periferia com células ativamente proliferativas; tal heterogeneidade é gerada pela baixa difusão de oxigênio, nutrientes, metabólitos e fatores de crescimento através das células que compõem o tumor. De maneira relevante, tais características podem ser reproduzidas pelos esferoides quando atingem um diâmetro entre 200 e 500 µm (GROEBE & MUELLER-

KLIESER, 1991; KUNZ-SCHUGHART, KREUTZ & KNUECHEL, 1998; MEHTA *et al.*, 2012). Ainda, são considerados o melhor modelo para *highthroughput screening* (KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2004; LABARBERA, REID & YOO, 2012). Além disso, nesse sistema as células tumorais também podem ser co-cultivadas com outros tipos celulares, como as células estromais, reproduzindo além do tumor, o microambiente tumoral (CORREA DE SAMPAIO *et al.*, 2012).

Existem diferentes formas de produzir os esferoides e cada técnica possuirá suas vantagens e limitações. A escolha deverá se basear no direcionamento das perguntas do trabalho. Contudo, didaticamente, eles podem ser divididos em duas categorias: esferoides produzidos sobre ou embebidos em algum substrato (*scaffold-based*); ou aqueles gerados sem nenhum substrato como suporte (*scaffold-free*). Veremos alguns exemplos a seguir:

Na primeira categoria os esferoides são cultivados no topo ou embebidos dentro de uma MEC sintética ou natural. Alguns exemplos de MEC utilizadas são os polímeros de hidrogéis ou metilcelulose, ou mesmo matrizes ricas em laminina, fibronectina ou colágeno (XU *et al.*, 2016). Matrigel é uma matriz de hidrogel natural comercial bastante utilizada, derivada de extratos de membrana basal de células de sarcoma de camundongo (Engelbreth-Holm-Swarm), rica em laminina, colágeno, proteoglicanos de heparan sulfato e fatores de crescimento (KLEINMAN & MARTIN, 2005; NUNES *et al.*, 2019). Existe também a possibilidade de cultivar as células tumorais em sistemas rotatórios, como os biorreatores, os quais através da movimentação rápida e constante de barras magnéticas fornecem fluxo de oxigênio e nutrientes, além de suportes para organização espacial das células em suspensão. Esse sistema normalmente é utilizado para produzir esferoides em grande escala. Todos estes métodos possuem a desvantagem de produzir esferoides de quantidade e tamanhos variados (CUI, HARTANTO & ZHANG, 2017; INGRAM *et al.*, 1997), então não seria a melhor escolha para realização de testes *highthroughput*.

A outra modalidade de cultivo 3D é baseada na formação espontânea de esferoides, independente de ancoragem. Os esferoides são cultivados em condições não-aderentes diversas, e, dessa forma, a adesão célula-célula é maior que a adesão célula-substrato (WEISWALD, BELLET & DANGLES-MARIE, 2015).

Há diferentes métodos para se obter esferoides não-aderentes. A técnica de *Liquid overlay* se baseia na adição de uma superfície inerte, não-aderente, às placas de cultura, como o ágar ou a agarose, previamente ao cultivo das células,

prevenindo a adesão das células à placa e, conseqüentemente, promovendo a agregação das mesmas umas às outras e a MEC produzidas por elas, compactação e formação da estrutura tridimensional em esfera. Através dessa técnica, a formação dos esferoides também é favorecida pela ação gravitacional (HAM *et al.*, 2016). Ainda, quando utilizada em placas de 96 poços, favorece a formação de um único esferoide por poço e de tamanho homogêneo, sendo ideal para testes em grande escala, além disso, apresentam baixo custo e praticidade. Há também placas comerciais revestidas com poliestireno, que proporcionam uma condição de baixa adesão celular (*ultra-low attachment plates*). Nesse método, é comum a utilização de centrifugação para agilizar a formação do esferoide. Apesar do baixo custo e fácil manuseio, formam-se esferoides de tamanhos variados (VINCI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014). A técnica de *Hanging drop* se baseia na produção de esferoides em gotas suspensas de meio nutritivo, onde a ação gravitacional também favorece a formação dos esferoides (TIMMINS *et al.*, 2005). É uma das técnicas pioneiras, porém mais laboriosas. Ainda há a possibilidade de produzi-los utilizando nanopartículas magnéticas. As células dispersas são adicionadas junto às nanopartículas e através de aplicação de forças magnéticas (barra magnéticas, por exemplo), são impulsionadas a agregarem umas às outras (TSENG *et al.*, 2015; WHATLEY *et al.*, 2014). Uma das desvantagens dessa técnica é a necessidade do pré-tratamento com as nanopartículas, as quais possuem preço elevado e a introdução de elementos externos ao sistema.

De modo interessante, além das diferentes maneiras de se produzir esferoides, eles podem apresentar diferentes origens: provenientes de linhagens celulares, dissociação de tumor de camundongo ou humano (WANG *et al.*, 2014).

Não existe um consenso quanto as terminologias utilizadas para referenciar os esferoides. Weiswald *et al.*, (2015), numa revisão sobre os modelos de esferoides utilizados para o estudo do câncer, propõe uma classificação em quatro categorias, de acordo com sua origem e tipo celular. Os esferoides tumorais multicelulares (MCTS), aqueles originados a partir de células de linhagem; as tumoresferas, aqueles produzidos apenas com células-tronco tumorais, tendo suas variações dependendo do tipo de tumor: mamosferas, neurosferas, etc; os esferoides tumorais derivados de tecido (TDTS), obtidos através de dissociação enzimática e/ou mecânica do tumor, seja ele de camundongo ou humano, obtendo uma suspensão de células isoladas; e, por último, os esferoides multicelulares organotípicos (OMS),

obtidos a partir de dissociação mecânica, o tumor é apenas seccionado e cultivado em condições não aderentes, preservando-se a histologia do mesmo, como os capilares sanguíneos. Os autores ainda apontam que o termo, bastante utilizado nessa área, “organóide”, deveria ser utilizado apenas para nomear culturas 3D realizadas a partir de células ou tecidos normais (KUPERWASSER *et al.*, 2004; WEISWALD, BELLET & DANGLES-MARIE, 2015).

1.3.2 Contribuições do modelo de esferoide para entendimento do câncer de mama

Cultivos 3D de células epiteliais mamárias não-tumorais e tumorais já foram estabelecidos e têm sido utilizados para diferentes aplicações, como o entendimento da biologia do câncer, estudos de análise terapêutica e avaliação de potencial metastático das células tumorais.

Em um dos trabalhos pioneiros (EMERMAN *et al.*, 1977), foi demonstrado que células epiteliais mamárias não-tumorais obtidas a partir de glândulas mamárias murinas, quando cultivadas no modelo 3D, sobre uma membrana de colágeno e, uma vez estimuladas com os hormônios insulina, cortisol e prolactina, apresentam expressão intracelular e extracelular de caseína, proteína encontrada no leite. Mais tarde, também demonstraram que esferoides mamários, quando cultivados sem adição de uma matriz exógena, além de recapitularem a arquitetura dos ácinos, ao serem estimulados com o hormônio prolactina expressam proteínas do leite (TIMMINS *et al.*, 2005). Esses achados mostram que esferoides além de mimetizarem a morfologia das glândulas mamárias *in vivo*, são estruturas funcionais, capazes de produzir leite.

Os trabalhos do grupo da Mina Bissel têm contribuído bastante em todos estes aspectos, também desde os anos 80 (BARCELLOS-HOFF *et al.*, 1989; EMERMAN, BARTLEY & BISSELL, 1981; LEE *et al.*, 1985; LI *et al.*, 1987). Seus estudos com células mamárias não-tumorais demonstraram que quando as células são cultivadas como esferoides, são capazes de mimetizar a arquitetura dos ácinos, apresentando polaridade celular basoapical e expressão de proteínas de membrana basal e de adesão similares ao observado *in vivo* (VIDI, BISSELL & LELIEVRE, 2013). De modo interessante, um estudo do grupo utilizando esferoides tumorais mamários,

demonstrou que é possível reverter parcialmente o fenótipo tumoral ao bloquear $\beta 1$ integrina, MAPK ou PI3K, evidenciado por mudanças na morfologia dos esferoides e redução no crescimento, potencial de invasão e formação tumoral *in vivo* (camundongo nude) (WANG *et al.*, 2002). Seu grupo também evidenciou a importância do microambiente tumoral para o desenvolvimento do tumor e resposta a quimioterápicos, demonstrando que o microambiente tumoral atua como protagonista na resistência a múltiplas drogas, enfatizando a importância de sistemas *in vitro* que reproduzam as características estruturais do tecido mamário, como os sistemas 3D, para estudos de quimioterapia experimental (CORREIA & BISSELL, 2012). Na verdade, o foco das pesquisas do grupo de Bissel é demonstrar que qualquer perturbação na arquitetura e polaridade celular são cruciais para a progressão tumoral. De fato, um outro grupo também já havia demonstrado que a perda da arquitetura tecidual, mais especificamente a perda da polaridade apical das células luminais das unidades ducto-lobulares do tecido mamário, é um evento crítico para o desenvolvimento de tumores (CHANDRAMOULY *et al.*, 2007).

Ainda, um trabalho recente, com esferoides originados a partir de células mioepiteliais e luminais de pacientes que passaram por mamoplastia de redução, mostrou que é possível reconstruir o ducto mamário no modelo 3D *in vitro* e, ainda, que ao superexpressar o HER2 nas células luminais através de transdução com lentivírus, essas células antes não-tumorais, passam a obter um fenótipo e comportamento tumoral, recapitulando características do carcinoma ductal *in situ*, sendo um modelo interessante para se estudar a interrelação entre esses dois tipos celulares na progressão do tumor, além de poder ser utilizado para testes com compostos anticâncer (CARTER *et al.*, 2017).

Muitos trabalhos recentes vêm descrevendo o potencial da utilização de esferoides tumorais para estudos de resposta terapêutica *in vitro* (LEE *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2017). Inclusive, muitos deles sugerem o modelo de esferoide como sendo a plataforma ideal para testes *highthroughput* (HOWES *et al.*, 2014; KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2004).

A resistência a quimioterápicos é uma característica observada nos tumores *in vivo* não representada pelo tradicional modelo 2D. Nessa direção, a maioria dos trabalhos investiga a resposta a quimioterápicos comparando os dois modelos, e tem demonstrado que as células no modelo 3D apresentam maior resistência as drogas quando comparadas com a mesma concentração utilizada no modelo 2D (BRESLIN &

O'DRISCOLL, 2016; LOVITT, SHELPER & AVERY, 2015; XU, FARACH-CARSON & JIA, 2014; YILDIZ-OZTURK *et al.*, 2017), por exemplo. Algumas das explicações são: a arquitetura de microtecido que dificulta a internalização da droga (CORREIA & BISSELL, 2012; LOVITT, SHELPER & AVERY, 2018); os esferoides tumorais expressarem genes relacionados a resistência (DOUBLIER *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2016); ou ainda possuírem taxa de proliferação menor, sendo menos responsivos aos quimioterápicos (GONG *et al.*, 2015; IMAMURA *et al.*, 2015); ou mesmo por albergarem mais células-tronco tumorais (WANG *et al.*, 2014; YILMAZER, 2018). Independente do mecanismo utilizado, fica claro que é o melhor modelo para mimetizar o comportamento tumoral *in vivo* em resposta a drogas e, portanto considerado uma importante ferramenta para análise de resposta terapêutica *in vitro*.

Ainda, sistemas de cultivo 3D heterotípicos (co-cultivo) de células tumorais mamárias com células endoteliais, fibroblastos e/ou células do sistema imune tem sido estabelecidos para avaliação da progressão de tumores e resposta a quimioterápicos, mimetizando ainda mais o microambiente tumoral *in vivo* (CORREA DE SAMPAIO *et al.*, 2012; DWYER *et al.*, 2016; HOWES *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, o modelo de esferoide tem demonstrado reproduzir característica morfológicas e funcionais dos tumores de pacientes. Esses estudos têm demonstrado que esferoides mamários apresentam resposta ao tratamento *in vitro* similar aos seus tumores de origem quando tratados com os mesmos quimioterápicos, através da comparação entre a viabilidade celular dos esferoides com a resposta patológica dos pacientes. Sendo já considerado um sistema promissor para avaliação de terapia personalizada (HALFTER *et al.*, 2015; HALFTER & MAYER, 2017).

Os esferoides também podem ser utilizados para análise de migração e invasão. Muitos estudos avaliam o potencial invasivo ou migratório das células tumorais utilizando sistemas tradicionais de *Transwell* (KRAMER *et al.*, 2013), também bastante utilizado no modelo em monocamada, em que é possível quantificar o número de células que saem do esferoide e passam através de um filtro revestido ou não com MEC, ou ainda componentes estromais, como os fibroblastos. Através de tais sistemas, foi demonstrado, por exemplo, que em condições de hipóxia, em comparação com normóxia, há maior migração das células dos esferoides (WANG *et al.*, 2018), bem como que células da linhagem MCF-7 têm maior capacidade invasiva quando cultivadas como esferoides do que em 2D (YILMAZER, 2018). Além disso,

também foi demonstrado que essa maior capacidade migratória pode estar relacionada com o aumento da expressão gênica e proteica de marcadores de células-tronco tumorais nos esferoides, pontuando aqui outra aplicabilidade do modelo: estudar o papel das célula-tronco tumorais no desenvolvimento do câncer (BIELECKA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2014).

Dando continuidade, hoje em dia já existem modelos, inclusive comerciais, baseados no cultivo de esferoides em matriz de hidrogel, chamado de “matriz de invasão”, para observação e quantificação da dispersão das células (VINCI, BOX & ECCLES, 2015).

Também é possível analisar a migração utilizando o sistema de co-cultivo. Foi demonstrado que monócitos são capazes de infiltrar esferoides tumorais de mama de diferentes linhagens e fibroblastos obtidos a partir do estroma de tumor mamário (KSIĄZKIEWICZ *et al.*, 2010). Existe um outro método, chamado de “ensaio de confronto entre esferoides” no qual diferente do anterior, em que se observa células isoladas invadindo os esferoides, dois esferoides de tipos celulares distintos são cultivados juntos e analisa-se o comportamento invasivo de ambos (KRAMER *et al.*, 2013). Em um estudo utilizando esferoides mamários e de glioma, demonstrou-se que, uma vez estimulados com L-endoglina, uma proteína coreceptora do TGF- β , as células tumorais de mama invadiam os esferoides de glioma e, uma vez bloqueando o TGF- β , essa invasão era suprimida (OXMANN *et al.*, 2008).

Finalmente, recentemente (2014), foi patenteado (C13089) um modelo 3D utilizando esferoides produzidos a partir de condições não aderentes (*ultra-low attachment*), que reproduz diferentes características da metástase *in vivo*, não somente a capacidade invasiva das células. O grupo demonstrou que após completa reversão do esferoide para monocamada, as células preservam características essenciais envolvidas no processo metastático, como o potencial de migração/invasão, expressão de proteínas da TEM, quimiorresistência e expressão de marcadores de células-tronco tumorais (KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014).

1.3.3 – Outras aplicações

Apesar do foco desse trabalho ser câncer de mama, é racional pensar que o modelo 3D também tem contribuído para estudos da morfologia e comportamento

tumoral, além de avaliação terapêutica em outros tipos de câncer, como cólon, ovário, pulmão, próstata e cérebro (KRATZ *et al.*, 2019; MIRAB, KANG & MAJD, 2019; MOSAAD *et al.*, 2018; PAULLIN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018).

Além disso, dados do nosso grupo demonstraram que cultura de esferoides de células cardíacas são funcionais, capazes de produzir estruturas vasculares quando co-cultivados com células endoteliais e mesenquimais de medula óssea, ainda, capazes de produzir uma rede complexa de matriz extracelular e proteínas de membrana basal, além de fibrose e hipertrofia quando estimulados, e a responder a agentes terapêuticos anti-fibróticos (GARZONI *et al.*, 2008; GARZONI *et al.*, 2009; FERRÃO *et al.*, 2018).

Evidenciamos ainda, que utilizando-se esferoides de células mesenquimais de medula óssea co-cultivados com osteoblastos é possível estudar a proliferação e migração de células hematopoiéticas de medula óssea *in vitro*, (DE BARROS *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer o cultivo tridimensional de células tumorais mamárias do tipo esferoide para estudo de resposta terapêutica e metástase *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar o modelo 3D de esferoide tumoral mamário utilizando a linhagem celular MCF-7, avaliando-se: morfologia, crescimento e expressão de proteínas específicas (E-caderina e laminina).
- 2) Produzir esferoides a partir de tumores de camundongos com diferentes capacidades invasivas (4T1 e 67NR).
- 3) Caracterizar o modelo 3D para avaliação do potencial metastático *in vitro*, analisando migração celular e proteínas envolvidas na transição epitelial-mesenquimal (E-caderina e vimentina)
- 4) Avaliar o efeito citotóxico e antimetastático da doxorrubicina e da β -lapachona através da análise do diâmetro dos esferoides, de morte celular, da viabilidade celular, da migração celular e da expressão de proteínas envolvidas na transição epitelial-mesenquimal (E-caderina e vimentina).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular e tumores provenientes de camundongo

Nesse estudo, utilizamos a linhagem celular tumoral mamária humana MCF-7 (ATCC® HTB-22™), que foi fornecida pelo Dr. Hector Seuanez do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Em colaboração com a Dra. Adriana Bonomo da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), nos foram fornecidos tumores mamários de camundongos BALB/cJ, formados a partir de células das linhagens tumorais mamárias murinas 4T1 (metastática) ou 67NR (não-metastática).

3.2 Cultura primária de células tumorais mamárias murinas

Tumores originados a partir das linhagens tumorais mamárias murinas 4T1 e 67NR nos foram fornecidos, os quais foram transportados a 4 °C, em tubos contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) ou solução salina, dependendo do protocolo de dissociação realizado, como discriminado a seguir. A cultura foi realizada até 2 h após retirada dos tumores. Testamos dois protocolos distintos de acordo com dados da literatura (Vázquez *et al.*, 2004 e DuPré *et al.*, 2007). No primeiro protocolo, foi feita a fragmentação e digestão enzimática do tumor murino com 5 mg/ml de colagenase em meio RPMI 1640 + 10% de soro fetal bovino (SFB), durante 2 ciclos de 40 minutos, havendo troca da solução de digestão entre os ciclos. Já no segundo protocolo, utilizamos 10 mg/mL de colagenase diluída em solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (BSS-CMF), e a digestão foi feita durante 1 ciclo de 1 h. Independente do protocolo realizado, a digestão foi feita a 37 °C, sob agitação em *shaker* elétrico. Os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados a 200g, por 5 minutos e as células ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), sendo mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.3 Propagação das células em monocamada (2D) e cultura tridimensional (3D)

Após as células obterem confluência, foram feitos os repiques utilizando-se tripsina (0,125%) e EDTA (0,02%) em BSS – CMF, pH: 7,8. As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultivo sem qualquer substrato, a 37°C em atmosfera contendo CO₂ a 5%, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Para produção dos esferoides tumorais, após a dissociação enzimática com solução de tripsina, diferentes quantidades de células por poço (3.125 a 25.000), a depender do experimento, foram introduzidas em placas de 96 poços com fundo em “U”, contendo agarose a 1% (GARZONI *et al.*, 2008; GARZONI *et al.*, 2009). Os esferoides foram mantidos nas mesmas condições descritas acima. A formação e o crescimento dos esferoides foram observados e fotografados diariamente, utilizando-se o microscópio invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100, Japão) e o programa BELView, versão 7.1.

3.4 Tratamento, análise do tamanho do esferoide e ensaio de migração celular

Após 5 dias de cultura, os esferoides foram tratados com diferentes concentrações da doxorubicina (dox) (1, 2 e 4 µM) ou do extrato de β-lapachona (β-lap) (0,3; 0,6 e 1,2 mg/L) durante 72 h, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. Após 48 h de tratamento, as células foram retratadas (GARZONI *et al.*, 2004). As concentrações estoque da dox e do extrato de β-lap eram 10 mM e 8720 mg/L, respectivamente. Realizamos um experimento inicial e verificamos que a concentração de DMSO no meio de cultura não excedia a 0,04% e não foi tóxica para as células. A partir desse dado, utilizamos como controle do experimento apenas células não tratadas. O extrato de β-lap encontra-se em processo de patente e foi disponibilizado para este estudo pelos pesquisadores Drs. Edmilson José Maria e Rodrigo Rodrigues Oliveira (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), e Dra. Claudia Coutinho (Universidade Federal Fluminense). Para os ensaios de migração, previamente ao tratamento os esferoides foram transferidos para uma placa de 24 poços, sem lamínula. Contudo, nos ensaios envolvendo marcação para fluorescência, eles foram transferidos para a placa de 24 poços com lamínula redonda de vidro revestida com gelatina. Novamente, através

de microscopia de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100, Japão) e auxílio do programa BELView, versão 7.1, o tamanho ou migração das células dos esferoides foram acompanhados e fotografados a cada 24 h. A análise do tamanho do esferoide foi feita através da quantificação do diâmetro do mesmo e, a migração, avaliando o diâmetro de dispersão das células, utilizando o programa Image J (EUA).

3.5 Análise do centro necrótico

Para avaliação do centro necrótico, depois de uma semana de cultura, os esferoides com diferentes tamanhos (3.125 a 25.000 células por poço) foram incubados durante 30 minutos com iodeto de propídeo (IP) (556547, BD Biosciences, EUA), resultando em uma concentração final de 0,5 µg/mL. A marcação para IP foi analisada usando o microscópio confocal invertido de varredura a laser LSM 710 (Zeiss, Alemanha). Como dado complementar, realizamos também a coloração dos esferoides com solução de Giemsa. Para isso, eles foram criopreservados e seccionados utilizando-se o criomicrotomo (Leica, Alemanha). Os cortes foram fixados em Bouin (75 mL de solução de ácido pícrico a 1,2%, 25 mL de formalina (37% formaldeído) e 5 mL de ácido acético) durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram coradas com solução de Giemsa (1:10) em água destilada e desidratadas em gradiente crescente/decrescente de xilol-acetona. As lâminas foram montadas em Permount com lamínulas de vidro e as imagens obtidas usando microscopia de campo claro (Zeiss, Alemanha).

3.6 Análise de morte celular

Após 5 dias de cultura, os esferoides foram tratados com diferentes concentrações da dox (1, 2 e 4 µM) por 48 h ou com a maior concentração do extrato de β-lap (1,2 mg/L) por 72 h. A análise de morte celular foi feita através de citometria de fluxo, utilizando o intercalante de DNA fluorescente 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (*BD Via-Probe™*) (555815, BD Bioscience, EUA). O 7-AAD é excluído pelas células viáveis, sendo utilizado para discriminação de morte celular. Após dissociação dos esferoides com solução de tripsina/EDTA em BSS-

CMF, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e incubadas por 20 min a 4 °C com 20 µl de 7-AAD (ready-to-use solution), conforme indica o protocolo do fabricante. Células aquecidas em banho seco a 60 °C por 10 min e marcadas com 7-AAD foram usadas como controle positivo e células não marcadas foram utilizadas como controle negativo. Após lavagem e fixação com 4% de paraformaldeído, as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, EUA) e a análise dos dados feita através do software Summit 6,1 (Beckman Coulter, EUA).

3.7 Análise de viabilidade celular

Para análise de viabilidade celular, após 5 dias de cultura, os esferoides foram tratados com as distintas concentrações da dox (1, 2 e 4 µM) e o tratamento foi mantido durante 72 h. Uma vez que só detectamos alteração colorimétrica após 24 h de incubação dos esferoides com o AlamarBlue® (*ready-to-use* - rezazurina) (Thermo Scientific, EUA), 24 h antes dos *endpoints*, os esferoides foram incubados com 20 µl (10% do volume do meio) do reagente a 37 °C, seguindo as especificações do protocolo do fabricante. A absorbância foi medida a 570 nm e 600 nm, usando o espectrofotômetro de microplacas Spectramax plus 384 (Molecular Devices, EUA). A viabilidade celular foi definida a partir do cálculo da razão (em porcentagem) entre cada condição tratada pela não tratada (controle).

3.8 Microscopia confocal e de fluorescência

Após 48 h de tratamento com dox (4 µM) ou β-lap (0,6 mg/L), os esferoides foram lavados 2x com tampão fosfato-salino (PBS) a 4 °C, corados com azul de metileno (para melhor visualização dos esferoides), incluídos em *Tissue-Tek O.C.T Compound* (Japão), e armazenados em nitrogênio líquido até sua utilização. As amostras foram seccionadas (5 µm) através de criomicrotomia e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%, por 10 minutos, a 4 °C. Após lavagem com PBS, os cortes foram permeabilizados com PBS + Triton X-100 a 0,1%. Para os ensaios de migração, os esferoides foram fixados e permeabilizados com etanol absoluto (Merck, Alemanha), por 20 minutos. Em seguida, as ligações inespecíficas foram

bloqueadas com PBS (ensaio de migração) ou tampão Tris-salino (TBS) (cortes) contendo 4% de albumina de soro bovino (BSA), e as células foram incubadas com anticorpos primários (especificados na Tabela 3.1) diluídos na solução de bloqueio, *overnight* (16 a 20 h), a 4 °C. Após bloqueio com BSA a 1% em PBS ou TBS, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a Alexa 488/594 (Tabela 3.1), durante 1 h, a 37 °C. Os controles negativos foram preparados incubando apenas o anticorpo secundário, estando ausentes anticorpos primários específicos para as proteínas do estudo. A marcação do núcleo das células foi feita com o 1-4-Diazabicyclo[2.2.2]octano (DAPI) na concentração de 0,2 mg/ml, incubado por 5 a 10 minutos, a 20 °C. As lâminas foram montadas com *ProLong® Gold Antifade Mountant* para posterior análise, utilizando o microscópio confocal invertido de varredura a laser LSM 710 (Zeiss, Alemanha), e as imagens processadas com o auxílio do programa Zen lite 2.3 (*blue edition*) (Zeiss, Alemanha).

Tabela 3.1: Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência.

Anticorpos	Fabricante/código	Diluição
Anticorpo primário IgG de coelho anti-E-caderina	Sigma – SAB5500022	1:100
Anticorpo primário IgG de camundongo anti-vimentina	Sigma – V5255	1:200
Anticorpo primário IgG de coelho anti-fibronectina	Sigma – F3648	1:200
Anticorpo primário IgG de coelho anti-laminina	Sigma - L9393	1:50
Anticorpo primário IgG de coelho anti-Ki-67	ABCAM - ab16667	1:100
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa Fluor® 594	Thermo Scientific - A21203	1:800
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 488	Thermo Scientific - A21206	1:800

3.9 Western Blotting

Para o preparo dos esferoides para a realização do *Western blotting*, após duas lavagem com PBS a 4 °C, foi feita a extração de proteínas das células, utilizando o tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% desoxicolato de sódio), contendo 10% de inibidores de protease (13136600, Roche, EUA) e 10% de fosfatase (P0044, Sigma, EUA) seguido por sonicação (2 ciclos de 10 segundos, 120 W, 20 kHz, amplitude 20%), utilizando o equipamento da empresa Fisher Scientific (FB120, Pittsburgh, EUA).

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se o kit BCA (Pierce – Life Technologies, EUA), segundo as instruções do fabricante. A absorbância do total de proteínas nas amostras foi comparada com a curva padrão de BSA 1 mg/mL. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até o momento do experimento.

Dez microgramas de proteínas totais foram suficientes para realização do ensaio, as quais foram diluídas em tampão de amostra 5x (Tris-HCl 80 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 12%; β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,05%), submetidas à temperatura de 100 °C por 5 minutos e separadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). *Running Gel*: 10% Bis/Acrilamida; 0,37M Tris (pH6, 8); 0,2% SDS; 0,1% Persulfato de amônio e 0,04% TEMED. *Stacking Gel*: 5% Bis/Acrilamida; 0,19 M Tris (pH 8,8); 0,2% SDS; 0,1% persulfato de amônio e 0,1% TEMED. Sobre o gel, foi aplicado um campo elétrico de 100 Volts, separando as proteínas de acordo com seu peso molecular.

Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (1620115, Bio-rad, EUA). Visando inibir as ligações inespecíficas, foi feito bloqueio com solução contendo TBST (Tris 50 mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%) e 5% de leite em pó desnatado (MOLICO®) por 1 hora. Em seguida, os anticorpos primários (detalhados na Tabela 3.2), previamente diluídos em solução de bloqueio, foram incubados *overnight* (16 a 20 h), a 4 °C. Os anticorpos secundários (Tabela 3.2), também diluídos em solução de bloqueio, foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. O anti-GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi incubado *overnight* (16 a 20 h), a 4 °C, sendo utilizado como controle endógeno. A revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology, EUA) e filmes de Raios-X. A densitometria foi realizada utilizando-se o programa Studio Lite, versão 4.0 (NIH, EUA). A expressão relativa das proteínas-alvo (E-caderina e vimentina) foi

determinada pela razão entre os valores de intensidade de suas bandas pelos valores de intensidade das bandas do GAPDH. Os valores de expressão relativa das amostras tratadas foram normalizados pelos valores das amostras não tratadas no mesmo tempo de cultura.

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blotting*.

Anticorpos	Fabricante e código do produto	Diluição
Anticorpo primário IgG de coelho anti-E-caderina	Sigma – SAB5500022	1:2.000
Anticorpo primário IgG de camundongo anti-vimentina	Sigma – V5255	1:3.000
Anticorpo primário IgG de camundongo anti-GAPDH	Fitzgerald - 10R-G109a	1:80.000
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase	R&D Systems – HAF007	1:1.000
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase	R&D Systems – HAF008	1:1.000

3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 5.0 (Graph-Pad Software Inc.), aplicando-se os testes *One-way* ou *Two-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni. Ou ainda, o teste de Mann Whitney, como indicado nas legendas das figuras. Os dados foram apresentados como média±desvio padrão de no mínimo 3 experimentos, considerando a média de 5 esferoides por condição experimental. Para o *Western Blotting*, fizemos um *pool* de 70 esferoides/ condição (FERRÃO *et al.*, 2018). Considerou-se diferença significativa quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***)

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento do modelo 3D do tipo esferoide

O passo inicial do estudo foi o desenvolvimento de um modelo 3D sem utilização de substratos, visando a geração espontânea de esferoides sem influência de fatores externos, como matrizes exógenas (por exemplo, Matrigel), ou seja, dentro da categoria *scaffold-free*. Dessa forma, revestimos placas de 96 poços com fundo em “U” com uma fina camada de agarose a 1%, obtendo-se uma superfície não-aderente. Com base em estudos anteriores do nosso grupo (GARZONI *et al.*, 2008; GARZONI *et al.*, 2009), as células em diferentes densidades (3.125 a 25.000 células por poço), foram introduzidas nas placas e a formação e morfologia dos esferoides foram observadas durante 10 dias, utilizando microscopia de contraste de fase.

Em nosso sistema 3D, as células MCF-7 aderiram umas às outras, espontaneamente, gerando um único esferoide por poço, de tamanho uniforme em apenas um dia de cultivo. Esferoides de todos os tamanhos exibiram geometria esférica e formato compacto e um centro necrótico que foi observado ser mais proeminente ao longo do tempo e com o aumento do tamanho dos esferoides. Por exemplo, o centro necrótico só foi possível ser visto a partir do sétimo dia de cultura nos esferoides de menor tamanho (3.125 células/poço), enquanto que nos maiores esferoides (25.000 células/poço), foi observado já no segundo dia. Ainda, foi possível notar a diferença no tamanho do esferoide dependendo do número inicial de células introduzidas nos poços. Comparando, novamente, os esferoides de menor e maior tamanho, no quinto dia, o primeiro apresentava diâmetro em torno de 350 μm , ao passo que o diâmetro do segundo era de aproximadamente 580 μm . Além disso, todos os esferoides cresceram com o tempo de cultura, começando a crescer entre o quinto e sétimo dia. Exceto o de maior tamanho, que apresentou diâmetro/área aumentado apenas no décimo dia de cultivo, (Figura 4.1 A, B e C).

Investigamos também o centro necrótico dos esferoides pela marcação com iodeto de propídeo (IP) e coloração com Giemsa, além de avaliar a proliferação celular através da expressão de Ki-67, por imunofluorescência. Como esperado, os esferoides apresentaram marcação para IP na sua região central, confirmando a morte celular por necrose nessa área (Figura 4.2 A - D). O centro necrótico também

pôde ser visualizado quando o esferoide foi corado com solução de Giemsa (Figura 4.2 E). A análise de proliferação celular demonstrou a expressão de Ki-67 mais proeminente na periferia do esferoide (Figura 4.2 F). Como caracterização adicional, também verificamos, por imunofluorescência, que os esferoides produzidos com a MCF-7 apresentavam, como esperado, imunorreatividade para E-caderina, marcador de células epiteliais, e foram capazes de produzir sua própria matriz extracelular revelada pela marcação para laminina (Figura 4.3 A e B).

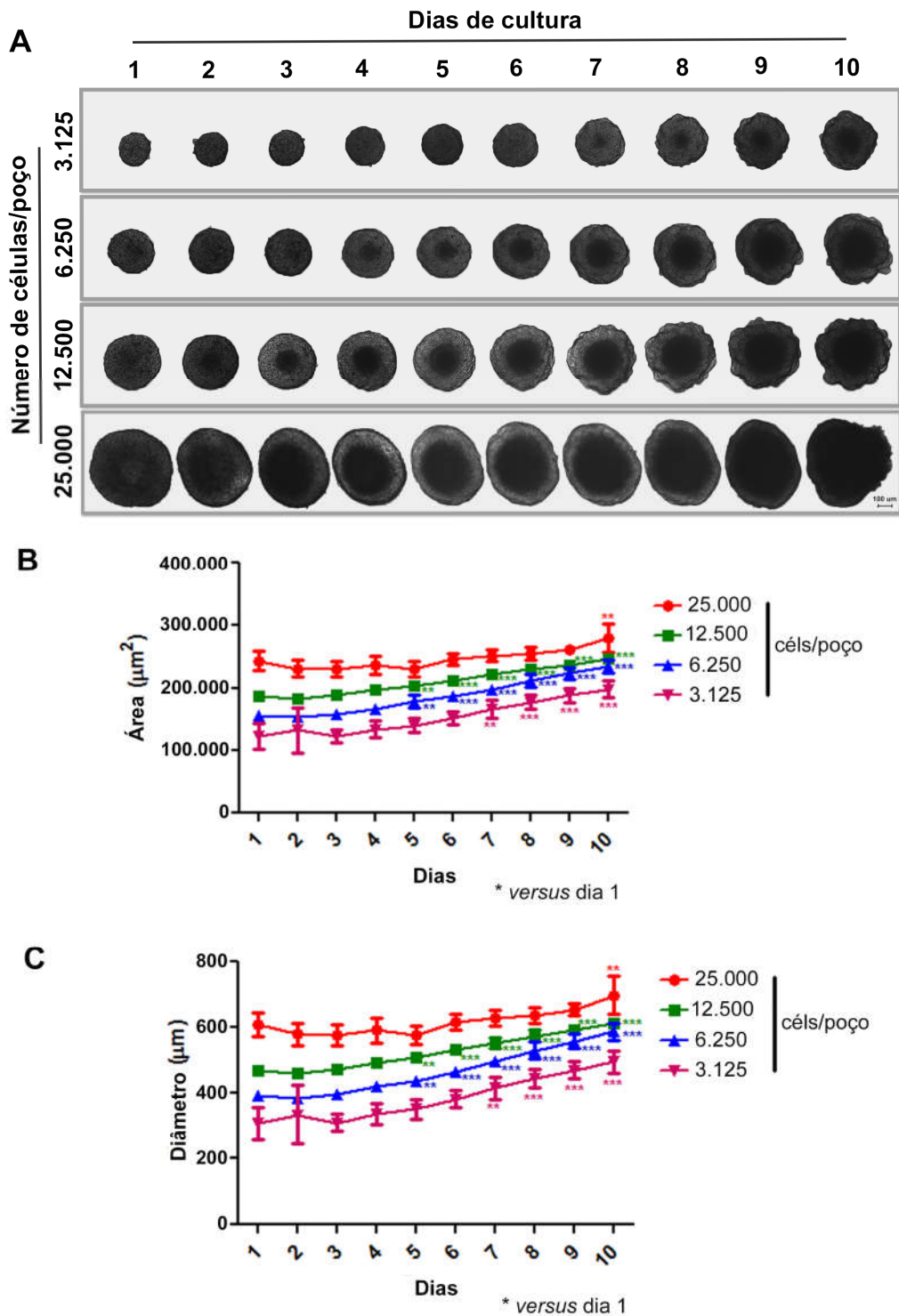


Figura 4.1: Estabelecimento de esferoides com a linhagem celular MCF-7. A: Imagens representativas mostrando crescimento e morfologia dos esferoides com diferentes densidades, durante 10 dias, por microscopia de contraste de fase. Foi possível notar a diferença no tamanho do esferoide, dependendo do número inicial de células plaqueadas nos poços. B e C: Dados quantitativos da área e diâmetro, respectivamente. Todos os esferoides, exceto o de maior tamanho, cresceram ao longo do tempo, começando a crescer entre os dias 5 a 7 de cultura. Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento ($n = 10$). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste *One-way* ANOVA. Pós-teste Bonferroni.

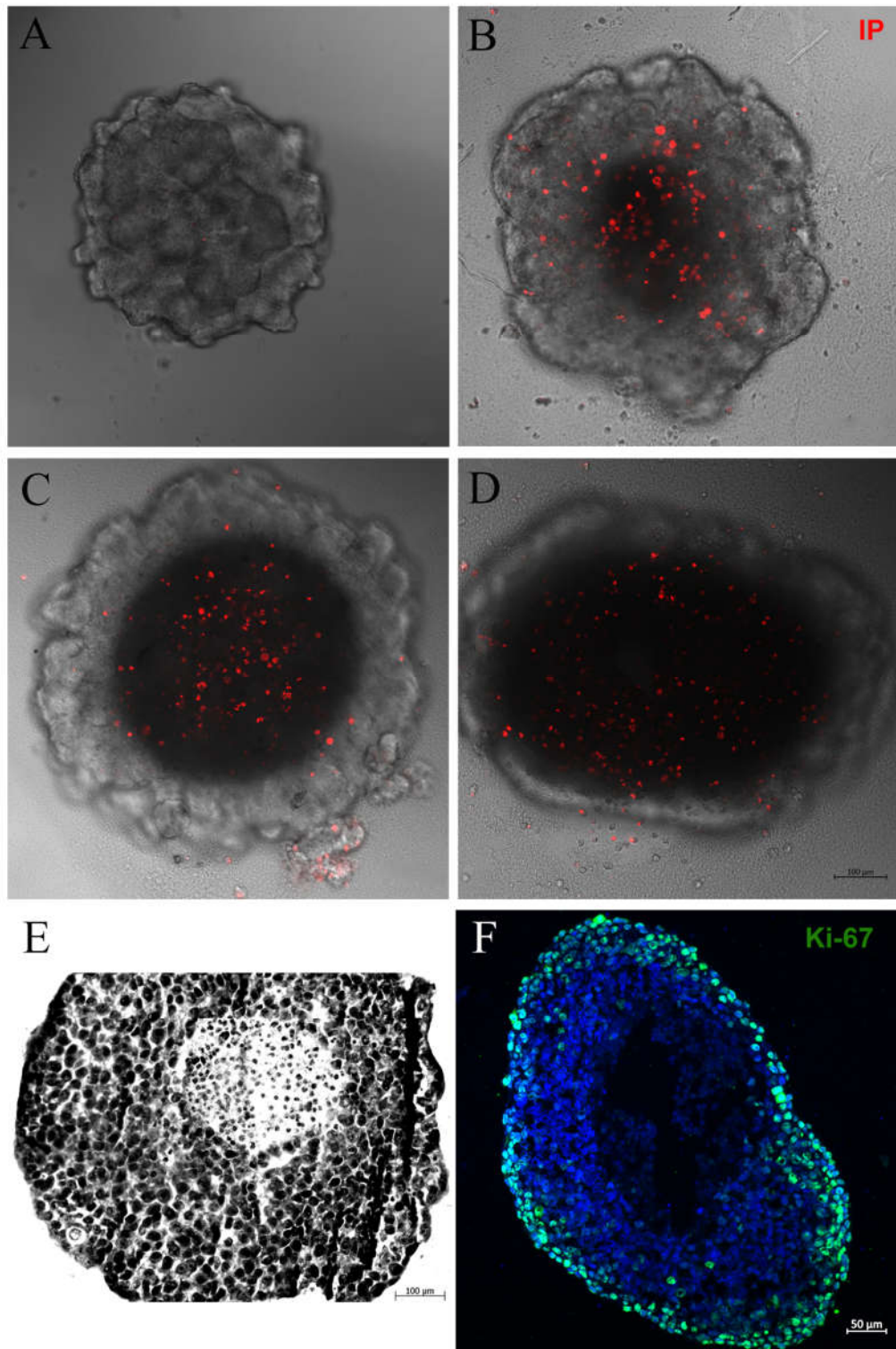


Figura 4.2: Os esferoides tumorais mamários mimetizam as características dos tumores avasculares. A-D: marcação para iodeto de propídeo (IP), mostrando núcleo necrótico nos esferoides de diferentes densidades; 3.125 (A), 6.250 (B), 12.500 (C), 25.000 (D). E: coloração com Giemsa mostrando centro necrótico e morfologia do esferoide de densidade 6.250. F: Imunofluorescência mostrando a expressão de Ki-67 em verde. A coloração do DNA com DAPI pode ser observada em azul. A expressão de Ki-67 foi mais proeminente na periferia do esferoide.

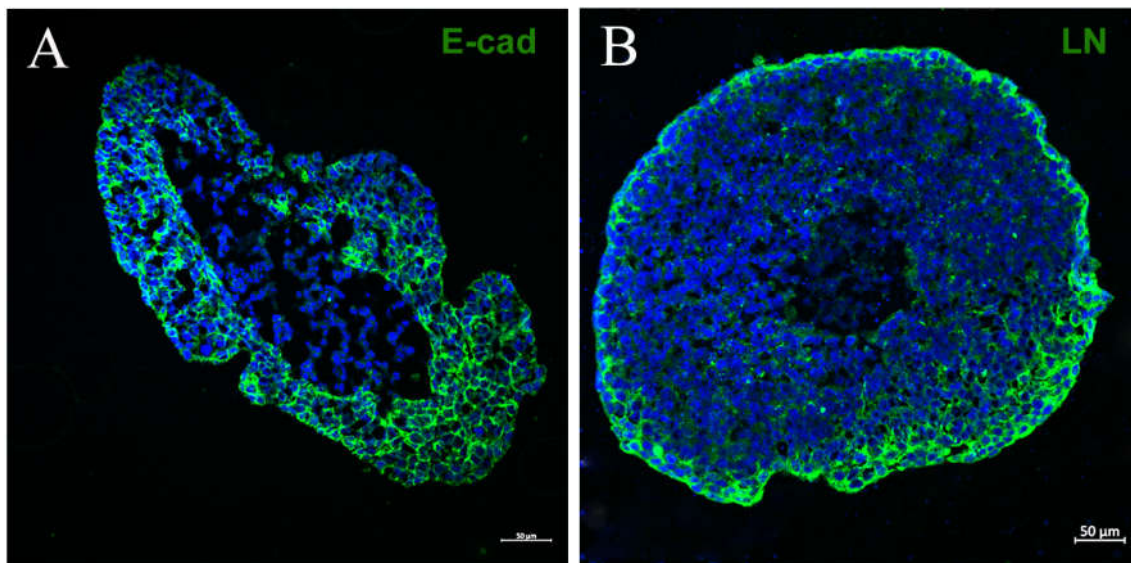


Figura 4.3: Os esferoides tumorais mamários expressam marcador epitelial e produzem sua própria matriz extracelular. A e B: Imunofluorescência mostrando a expressão de E-caderina (E-cad) e vimentina (VIM), respectivamente. Os esferoides apresentaram imunorreatividade para a E-caderina, marcador epitelial, e foram capazes de produzir sua própria matriz revelada pela marcação para laminina.

4.2 Produção de esferoides a partir de tumores mamários murinos

Após a geração de esferoides a partir da linhagem celular MCF-7, nos questionamos se seria possível produzir esferoides mamários primários a partir de tumores de camundongos. Nessa direção, foram obtidos tumores formados a partir das linhagens celulares 4T1 e 67NR, os quais passaram por digestão mecânica e enzimática com solução de colagenase. É importante ressaltar que os tumores da 4T1 são altamente metastáticos, enquanto os tumores da 67NR não metastatizam. Preparamos esferoides a partir de células isoladas diretamente dos tumores (Figura 4.4 E e F); mas também, a partir de monocamadas produzidas com as células isoladas dos tumores (Figura 4.4 G e H). O cultivo em monocamada (cultura 2D) não teve necessidade de utilização de substrato e as células atingiram a confluência em 72 h, podendo ser utilizadas para repique. A formação dos esferoides produzidos tanto de células isoladas diretamente dos tumores como a partir de monocamadas ocorreu após 24 horas de cultivo e os esferoides formados apresentaram morfologia semelhante (Figura 4.4 E - H).

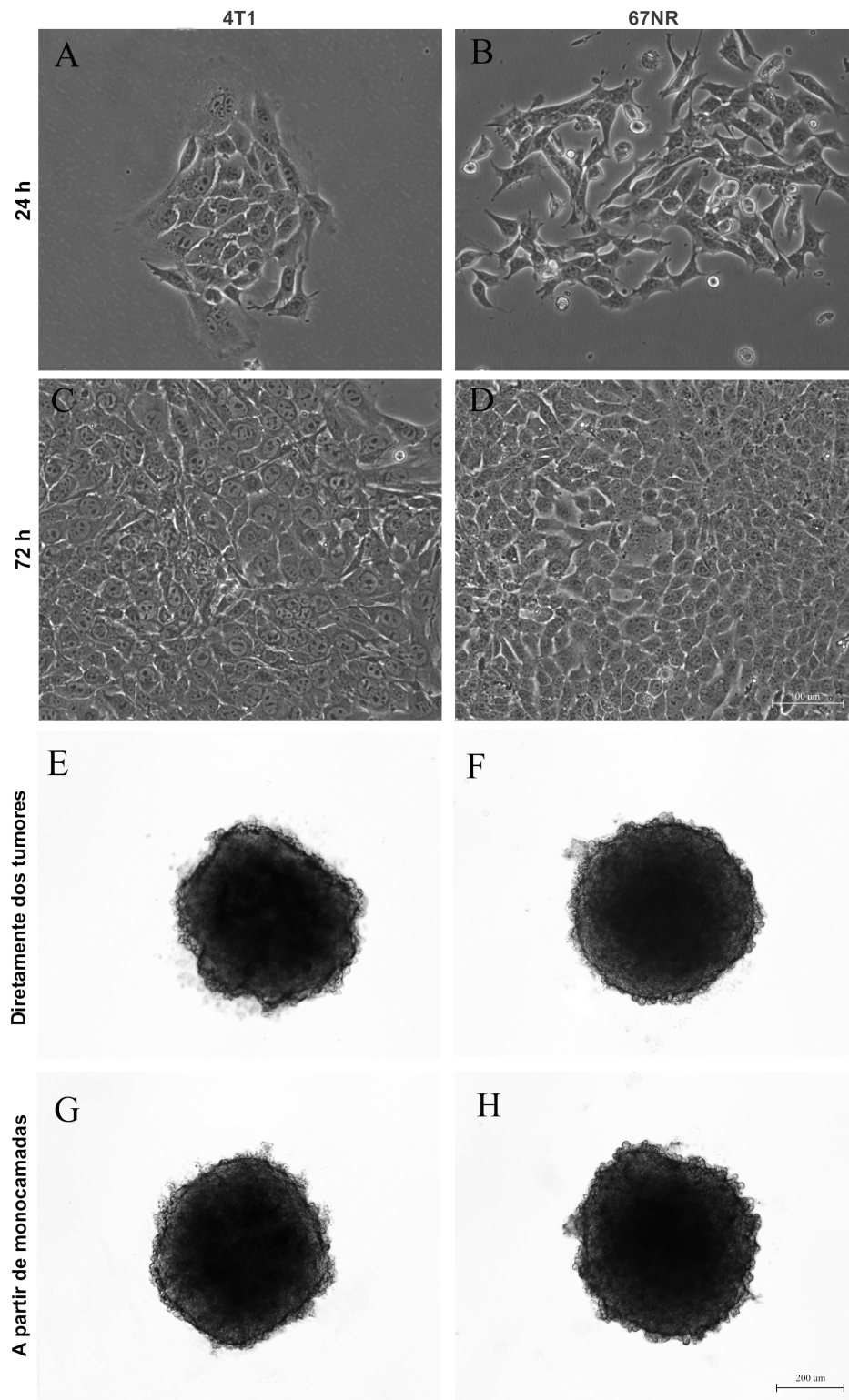


Figura 4.4: Produção de esferoides a partir de tumores de camundongos. A-H: Microscopia de contraste de fase mostrando cultura em monocamada (2D) no tempo de 24h (A e B) e 72h (C e D) e cultura tridimensional (3D) das células tumorais 4T1 (A, C, E e G) e 67NR (B, D, F e H). Os tumores de ambas as linhagens celulares foram dissociados enzimática e mecanicamente e foram capazes de aderir na superfície plástica, crescer e formar monocamadas confluentes ao longo do tempo (A-D), além de formar esferoides de células isoladas diretamente dos tumores (E e F) e a partir de monocamadas (G e H), após 24 h de cultura.

4.3 Caracterização do ensaio de migração para avaliação do potencial metastático *in vitro*

Outro parâmetro importante relacionado à progressão tumoral é a capacidade de migração/invasão das células tumorais. Buscamos avaliar esses parâmetros utilizando esferoides com 5 dias de cultura que foram transferidos para placas de 24 poços visando a adesão dos esferoides para analisarmos a capacidade migratória das células.

Os esferoides foram capazes de aderir e as células migraram ao longo do tempo de cultura, independente do uso de substratos, como a gelatina (dados não mostrados). Observamos que as células MCF-7 migraram do esferoide para a placa em direções distintas, formando alguns nichos ou “aglomerados de migração”, sugerindo migração coletiva de células (Figura 4.5 A e B). Ainda, pudemos observar diminuição na expressão de fibronectina nos locais onde as células tumorais extravasaram (Figura 4.5 C). Além disso, as células na periferia da zona de migração foram observadas migrando em conjunto com outras células e exibindo características típicas de migração, como filopódia e morfologia fusiforme (Figura 4.5 A - C).

Na tentativa de verificar se esse modelo realmente reproduz características da metástase, como a transição epitelial-mesenquimal, analisamos por imunofluorescência, a expressão de E-caderina (E-cad) e vimentina (VIM). Observamos que as células próximas a borda dos ETM expressavam E-cad e esse marcador se perdia ao atingir a zona periférica de migração (Figura 4.5 D). De modo contrário, observamos reduzida expressão de VIM nas células localizadas próximo a borda dos esferoides e alta expressão nas células da zona periférica de migração (Figura 4.5 E). Ainda, observamos nesta área células com morfologia achatada e/ou fusiforme, características típicas das células mesenquimais (Figura 4.5 C e F). Este resultado reproduziu, pela primeira vez, o processo de TEM em ETM, onde as células perdem o marcador E-cad e ganham VIM à medida que se tornam mais distantes do esferoide, passando a apresentar morfologia de células mesenquimais, mimetizando *in vitro* uma característica importante da metástase *in vivo*.

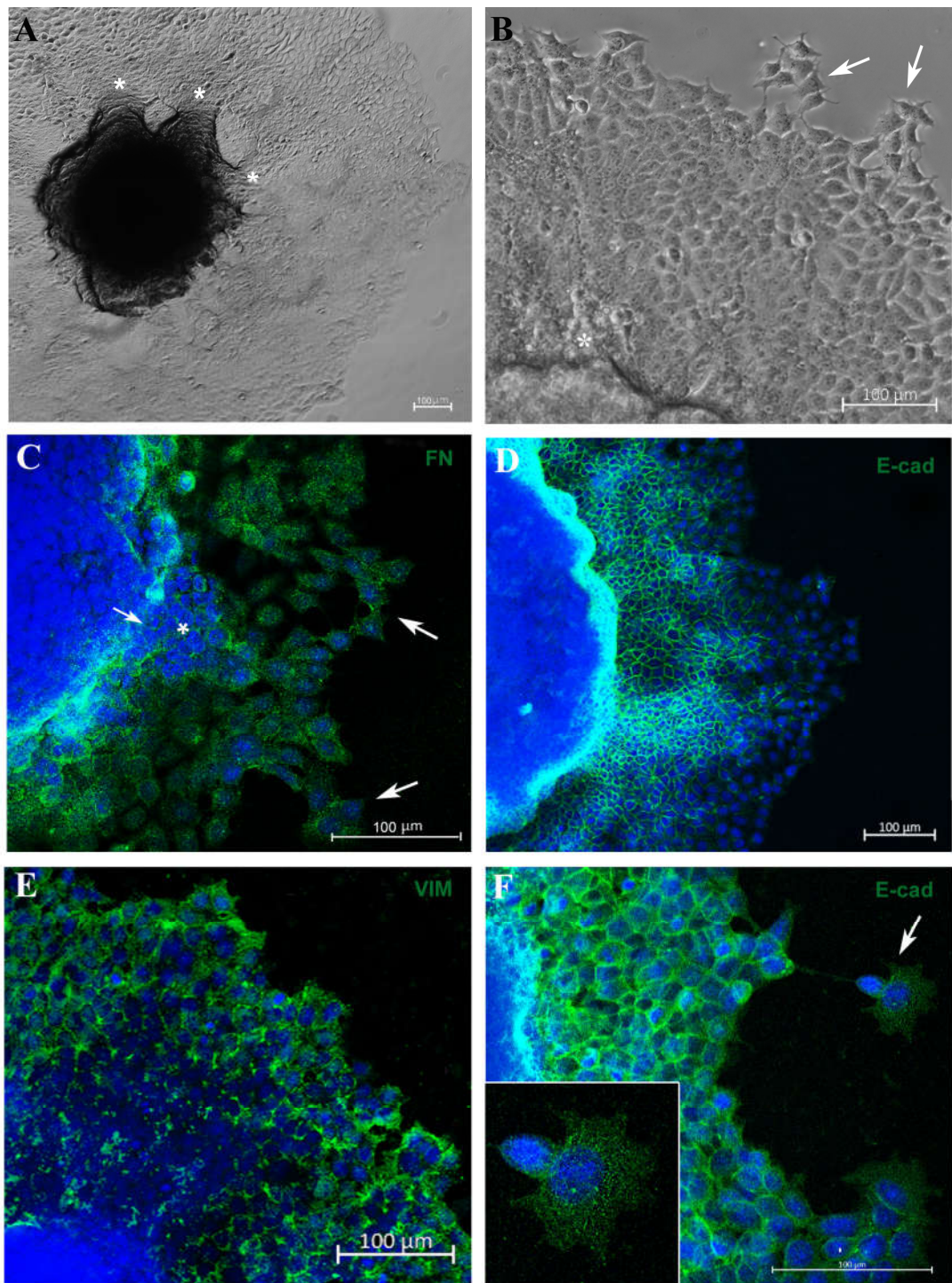


Figura 4.5. Ensaio de migração com esferoides reproduz características da metástase *in vivo*. A e B: imagens representativas com contraste de fase mostrando “aglomerados de migração” (asterisco), sugerindo migração coletiva de células. Em B, também foi possível observar células na periferia da zona de migração migrando em grupos e exibindo características típicas de migração, como filopódia (seta). C - F: Marcação por imunofluorescência para fibronectina (FN) (C), E-caderina (E-cad) (D e F) e vimentina (VIM) (E), em verde. Em C, pôde-se ver um “aglomerado de migração” (asterisco) e diminuição da expressão de fibronectina nessa área. Ainda, foi possível observar células migratórias na periferia com morfologia fusiforme (seta). D e E: processo de TEM: as células perdem a marcação para E-cad (D) e ganham VIM (E) à medida que as células se tornam mais distantes do esferoide. F: zoom de uma célula com morfologia achatada na periferia (*inset*), característica típica das células mesenquimais. Os núcleos foram marcados com DAPI.

4.4 Validação do modelo de ETM para teste de resposta terapêutica

4.4.1 Doxorubicina induz citotoxicidade nos ETM

Nosso próximo passo foi testar o efeito antitumoral *in vitro* da dox nos ETM da linhagem celular MCF-7. A partir deste momento, realizamos todos os experimentos utilizando os esferoides com a densidade de 6.250 células por poço, pois no dia em que começavam a crescer (quinto dia - dia escolhido para iniciar o tratamento), apresentavam centro necrótico e células proliferativas na periferia (Figuras 4.1 e 4.2), características típicas de esferoides grandes e tumores avasculares.

Primeiro, analisamos o efeito de concentrações distintas da dox (1, 2 e 4 μM) sobre o tamanho dos esferoides, durante 72 horas. Nossos resultados revelaram redução de 5,7% ($p < 0,05$) do diâmetro dos esferoides após 24 horas de tratamento, comparando o controle não tratado com a maior concentração da dox. No tempo de 48 horas de tratamento houve diminuição de 8,4% ($p < 0,001$) do tamanho dos esferoides na menor concentração utilizada, 10,3% ($p < 0,001$) na concentração de 2 μM e 12,2% ($p < 0,001$) utilizando 4 μM da dox. Com 72h de tratamento, a redução foi de 10,3% ($p < 0,001$) (1 μM), 14,2% ($p < 0,001$) (2 μM) e 18,6% ($p < 0,001$) (4 μM). Esses resultados sugerem um efeito citotóxico dessa droga nos ETM (Figura 4.6 A - E).

Posteriormente, analisamos a morte celular por citometria de fluxo. Para este fim, os esferoides foram tripsinizados e as células isoladas foram incubadas com o 7-AAD. Observamos que todas as concentrações da dox induziram a morte celular em todos os tempos estudados (Figura 4.7 A e B). Com 24 horas de tratamento houve aumento da marcação para 7-AAD de 135% ($p < 0,01$), 223% ($p < 0,001$), e 268% ($p < 0,001$), comparando o controle com a menor concentração, concentração intermediária e maior concentração da dox, respectivamente. Já no tempo de 48 horas, verificamos aumento de 169% ($p < 0,001$) desse marcador de morte celular utilizando a menor concentração da dox, 214% ($p < 0,001$) na concentração de 2 μM e 268% ($p < 0,001$) na concentração de 4 μM (Figura 4.7 A e B). Também investigamos a viabilidade celular, realizando o ensaio com Alamarblue®, e nossos resultados corroboraram os dados acima, indicando diminuição da viabilidade celular durante o tratamento com a dox em todos os tempos analisados (Figura 4.7 C). No tempo de 24 horas houve redução da viabilidade celular de 20,3% ($p < 0,05$), 22,4%

($p < 0,05$) e 21,6% ($p < 0,05$), comparando o controle com as concentrações de 1, 2 e 4 μM , respectivamente. Já com 48 horas, verificamos redução de 43,3% ($p < 0,001$) (1 μM), 44,3% ($p < 0,001$) (2 μM) e 43,6% ($p < 0,001$) (4 μM). No tempo de 72 horas esse efeito foi ainda mais pronunciado, a redução foi de 71,2% ($p < 0,001$) (1 μM), 73,8% ($p < 0,001$) (2 μM) e 76,8% ($p < 0,001$) (4 μM) (Figura 4.7 C).

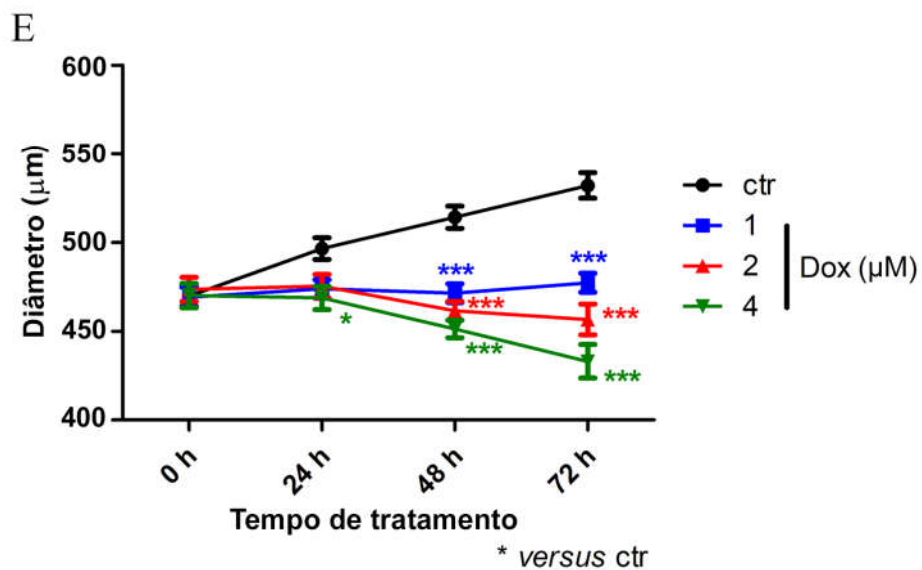
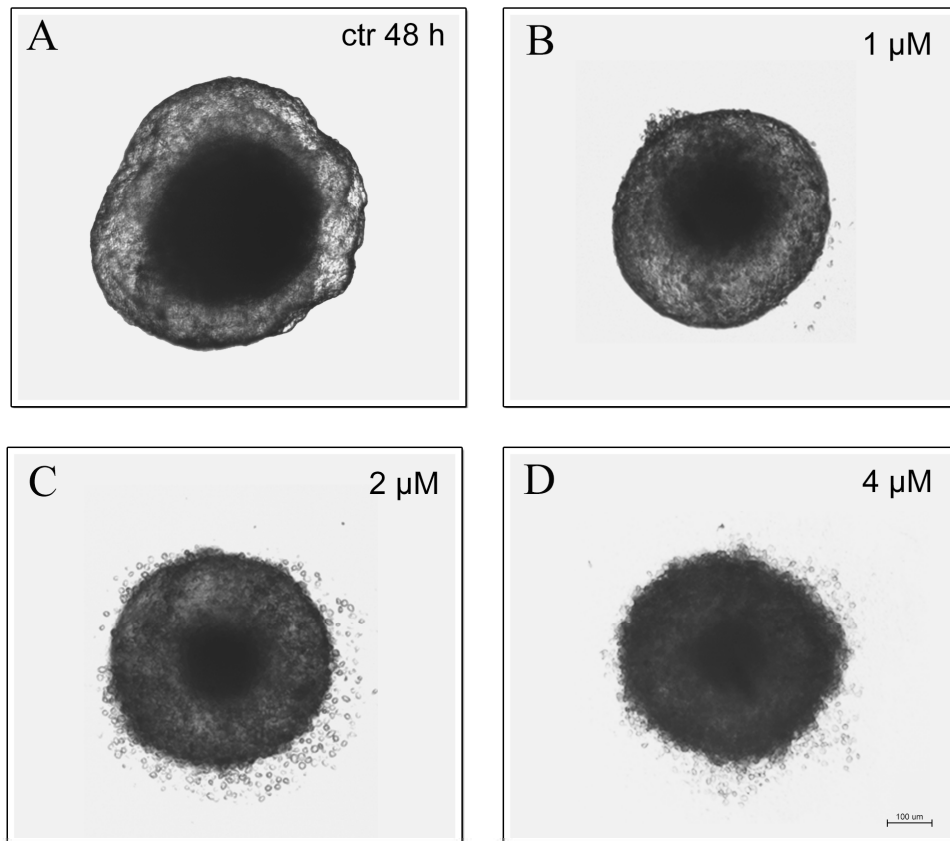


Figura 4.6: Doxorubicina reduz o tamanho do esferoide. A-D: Imagens representativas de microscopia de contraste de fase dos esferoides não tratados (ctr) (A) e tratados com 1 μ M (B), 2 μ M (C) e 4 μ M (D) de dox, no tempo de 48 h de tratamento. Além da redução no tamanho dos esferoides, foi possível observar morfologia alterada. E: Gráfico mostrando redução do diâmetro do esferoide ao longo do tempo, durante o tratamento com dox, comparando com o controle não tratado. Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos, analisando cinco esferoides por condição experimental. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Teste *Two-way* ANOVA. Pós-teste Bonferroni.

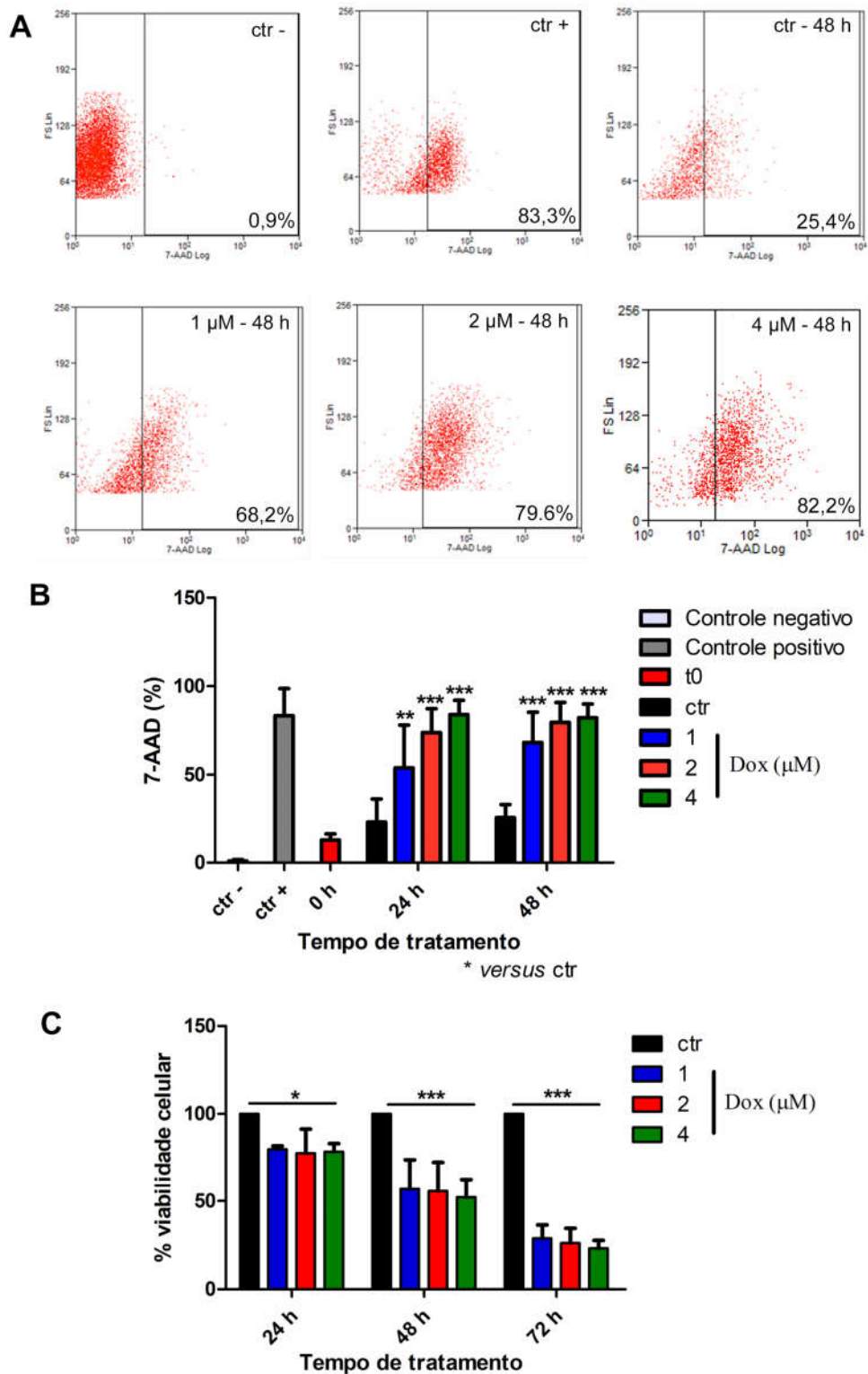


Figura 4.7: Doxorubicina induz citotoxicidade nos esferoides. A: Dot Plot representativo da marcação para 7-AAD por citometria de fluxo. B: porcentagem de células positivas para 7-AAD, mostrando aumento de morte celular durante o tratamento com dox. C: Ensaio com Alamarblue®. Os resultados revelaram viabilidade celular reduzida durante o tratamento com dox em todos os tempos analisados. Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos, analisando cinco esferoides por condição experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste *Two-way* ANOVA. Pós-teste Bonferroni.

4.4.2 Doxorubicina inibe potencial metastático *in vitro*

Posteriormente, começamos a analisar o efeito do tratamento com a dox sobre a migração/potencial metastático das células MCF-7. Esferoides com 5 dias de cultura foram transferidos para uma placa de 24 poços para permitir a adesão celular e foram tratados com concentrações distintas da dox (1, 2 e 4 μM) por 72 horas. Observamos diminuição de 16,1% ($p < 0,001$) na dispersão das células a partir dos esferoides, após 24 horas de tratamento, quando as células foram tratadas com a maior concentração da dox. No tempo de 48 horas houve diminuição de 7,0% ($p < 0,01$) na dispersão das células, na menor concentração utilizada, 19,7% ($p < 0,001$) na concentração de 2 μM e 32,8% ($p < 0,001$) utilizando 4 μM da dox. Com 72 horas de tratamento, a redução foi de 20,8% ($p < 0,001$) (1 μM), 34,4% ($p < 0,001$) (2 μM) e 43,0% ($p < 0,001$) (4 μM). Esses resultados indicam que a dox foi capaz de inibir a migração das células tumorais (Figura 4.8 A - B). A inibição da migração pela dox não foi apenas observada pela redução do diâmetro da dispersão celular, também foi possível observar a diminuição dos “aglomerados de migração” e do número de células saindo dos ETM (Figura 4.8 C).

A partir desses dados, nos perguntamos se o tratamento com dox poderia interferir de alguma forma no processo de TEM. Para responder a esse questionamento, analisamos por *Western Blotting* e imunofluorescência, o conteúdo de E-caderina e vimentina nas células tratadas e não tratadas. Nossos resultados de WB revelaram aumento do conteúdo de E-cad (33,8%, $p = 0,0087$) e diminuição do conteúdo de VIM (44,0%, $p = 0,0043$) durante o tratamento com dox (Figura 4.9 A e B). Através de imunofluorescência, observamos que nos esferoides controles a marcação de E-cad ocorreu principalmente nas células próximas ao esferoide enquanto que durante o tratamento com dox a marcação foi observada também nas células da zona periférica de migração. Observamos ainda, menor marcação de VIM nessa mesma região (Figura 4.9 C - F).

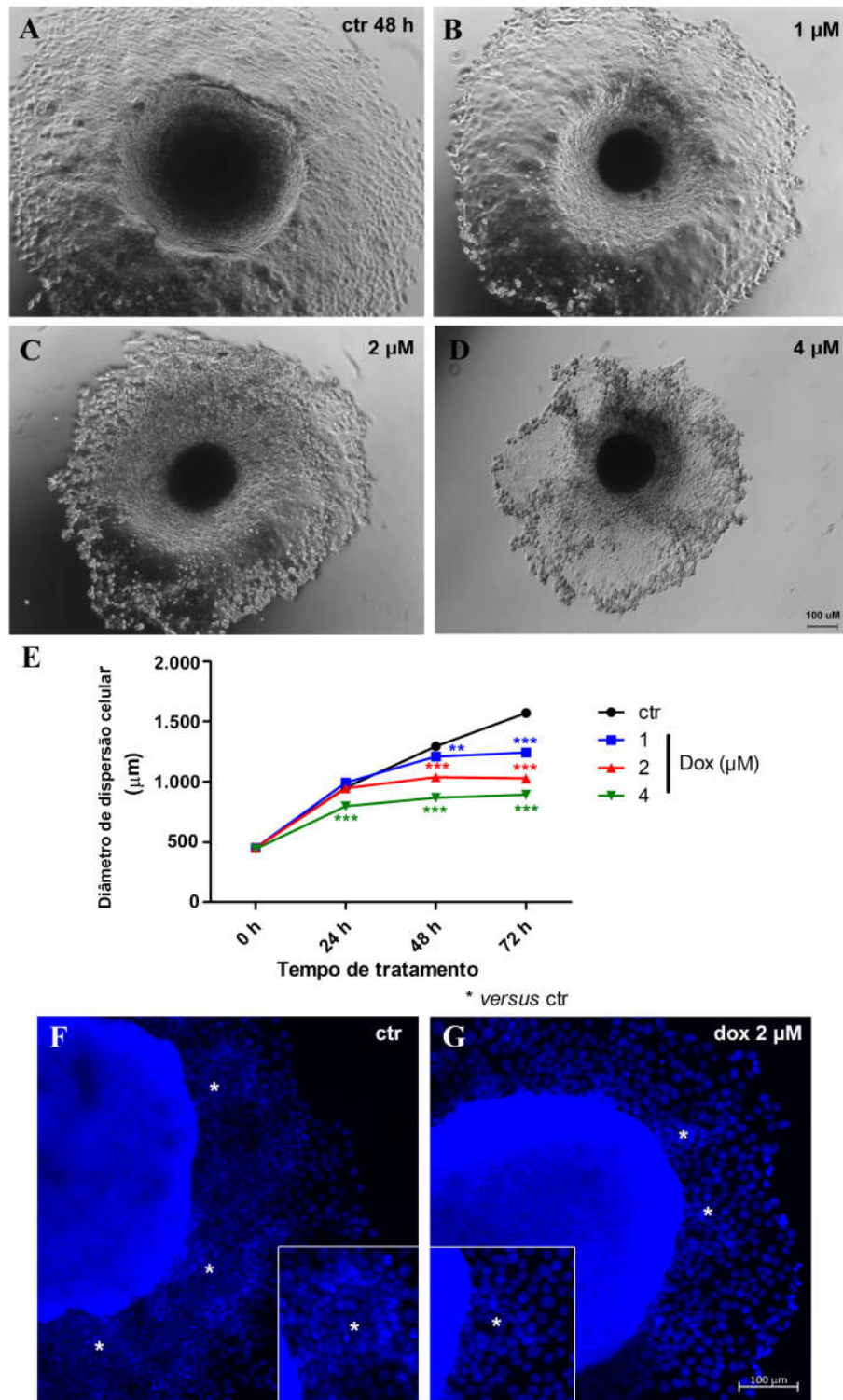


Figura 4.8. Doxorubicina inibe a migração celular. A-D: Imagens representativas da microscopia de contraste de fase dos esferoides não tratados (ctr) (A) e tratados com 1μM (B), 2μM (C) e 4μM (D) de dox, após 48 h de tratamento. E: Gráfico mostrando a quantificação da diminuição da dispersão celular a partir do esferoide, durante o tratamento com dox, comparando com o controle não tratado. F e G: marcação do DNA com DAPI em azul, mostrando redução dos “aglomerados de migração” (asterisco) (*inset*) e número de células que saem dos esferoides na condição tratada (G) comparando com os esferoides não tratados (F). Os dados quantitativos são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos, analisando cinco esferoides por condição experimental. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste *Two-way* ANOVA. Pós-teste Bonferroni.

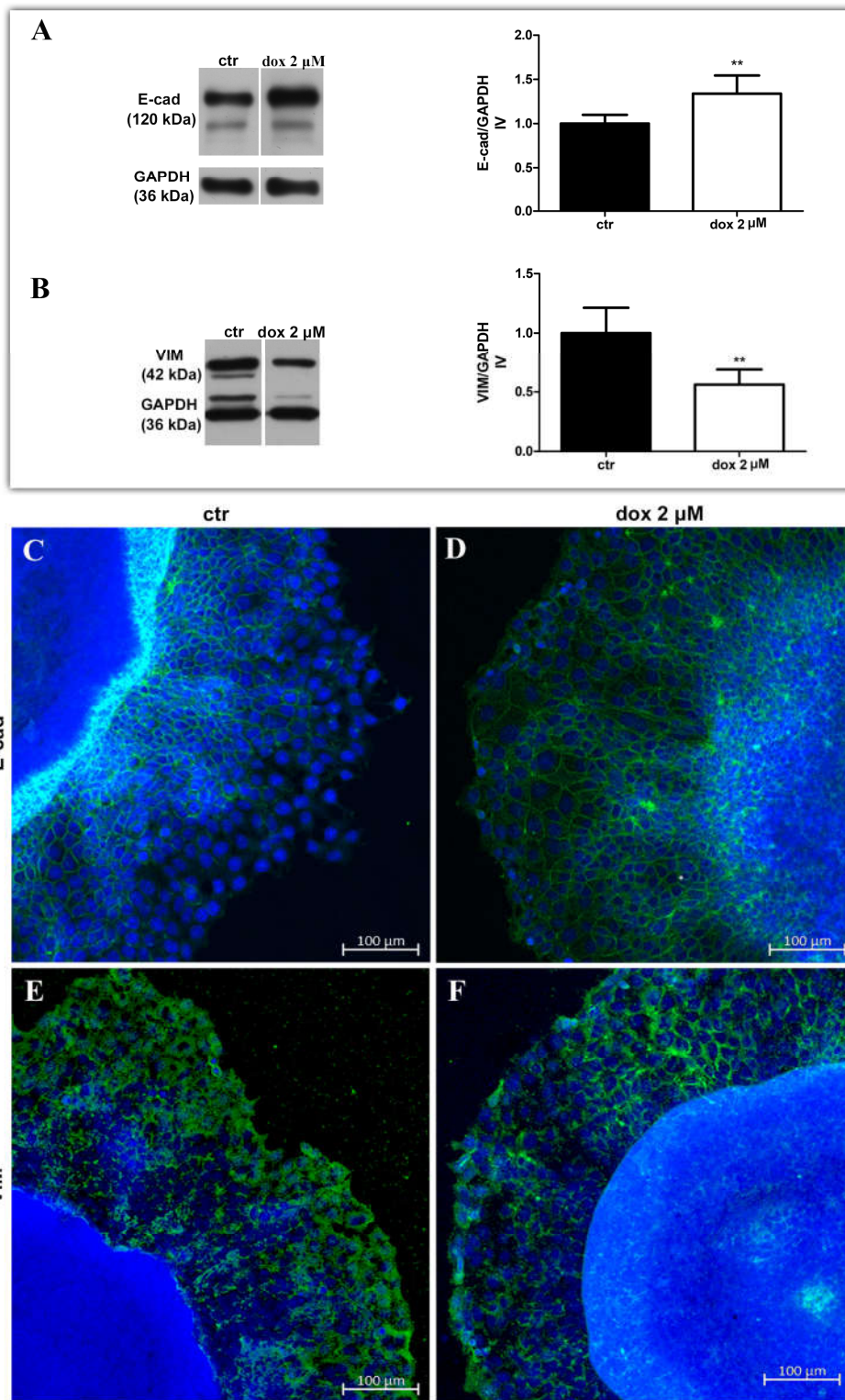


Figura 4.9. Doxorubicina inibe o processo de TEM. A e B: *Imunoblotting* para avaliação do conteúdo de E-caderina (E-cad) (A) e vimentina (VIM) (B) durante a migração celular, após 48 h de tratamento. Análises de densitometria revelaram aumento do conteúdo de E-cad e diminuição de VIM durante o tratamento com dox. C-F: Ensaio de imunofluorescência mostrando marcação para E-cad (D) também na zona periférica de migração e diminuição da marcação de VIM (F) quando as células foram tratadas com dox (D e F) comparando com a condição não tratada (C e E). Os núcleos foram marcados com DAPI. Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos. ** $p < 0,01$. Teste de Mann Whitney.

4.4.3 β -lapachona induz citotoxicidade nos ETM

Na segunda parte do trabalho, decidimos investigar o efeito da β -lap nos ETM, utilizando nosso modelo de esferoide e a linhagem celular MCF-7. Primeiramente, realizamos uma curva dose resposta avaliando o efeito de concentrações distintas do extrato de β -lap (0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L) sobre o tamanho dos esferoides, durante 72 horas de tratamento. Como o composto ainda encontra-se em processo de patente, fizemos a curva acima utilizando como referência dados ainda não publicados na literatura (Relatório Final do Projeto Biocida Verde, 2017–UENF) do ensaio de citotoxicidade com a linhagem tumoral HCT-8, em que foi verificado efeito citotóxico a partir da concentração de 1 mg/L da β -lap. Nossos resultados demonstraram que, com apenas 24 horas de tratamento (e que se manteve até 72 horas), as três maiores concentrações de β -lap foram tóxicas para as células. Comparando com o controle, em que é possível observar o centro necrótico mais escuro e as bordas claras, verificamos que a morfologia das células tratadas com β -lap foi alterada: o esferoide apresentou coloração escura por toda sua extensão, sendo difícil discriminar o centro necrótico da periferia de células viáveis (Figura 4.10 A). Por esse motivo, decidimos realizar todos os experimentos utilizando as três concentrações mais baixas. Ao analisar o tamanho dos ETM durante o tratamento, observamos diminuição do diâmetro dos mesmos (12,9%, $p < 0,01$) após 72 horas, utilizando a concentração de 1,2 mg/L de β -lap, quando comparados com o controle não tratado. Além disso, nesse tempo de tratamento, também pudemos observar que os esferoides estavam bastante danificados, sugerindo um efeito citotóxico da β -lap (Figura 4.10 B - C). Em seguida, na tentativa de elucidar esses dados, analisamos a morte celular por citometria de fluxo. Os esferoides foram tripsinizados e as células isoladas foram incubadas com o 7-AAD. Observamos que quase 100% ($p < 0,05$) das células morreram após 72 horas de tratamento com β -lap na concentração de 1,2 mg/L (Figura 4.11 A e B), corroborando os resultados obtidos acima.

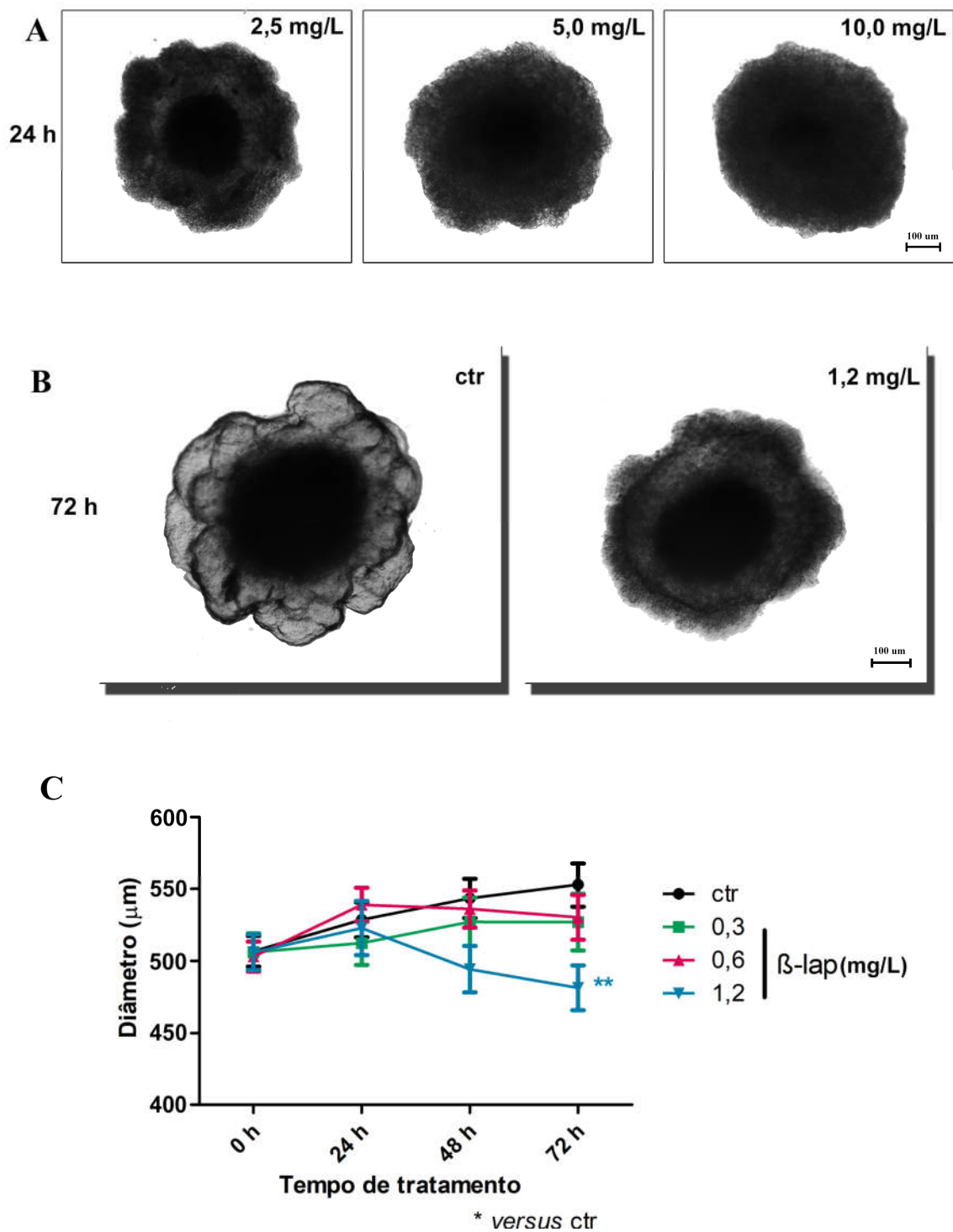


Figura 4.10: β-lapachona reduz o tamanho do esferoide. A e B: Imagens representativas de microscopia de contraste de fase dos esferoides da linhagem celular MCF-7. A: Esferoides tratados com 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L após 24 h. As três maiores concentrações de β-lap foram tóxicas para as células. B: Esferoides não tratados (ctr) e tratados com 1,2 mg/L de β-lap, no tempo de 72 h de tratamento. Observamos diminuição do tamanho dos esferoides e morfologia alterada. C: Gráfico mostrando redução do diâmetro do esferoide com 1,2 mg/L de β-lap no último tempo estudado, comparando com o controle não tratado. Os dados quantitativos são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos, analisando cinco esferoides por condição experimental. ** p < 0,01. Teste *Two-way ANOVA*. Pós-teste Bonferroni.

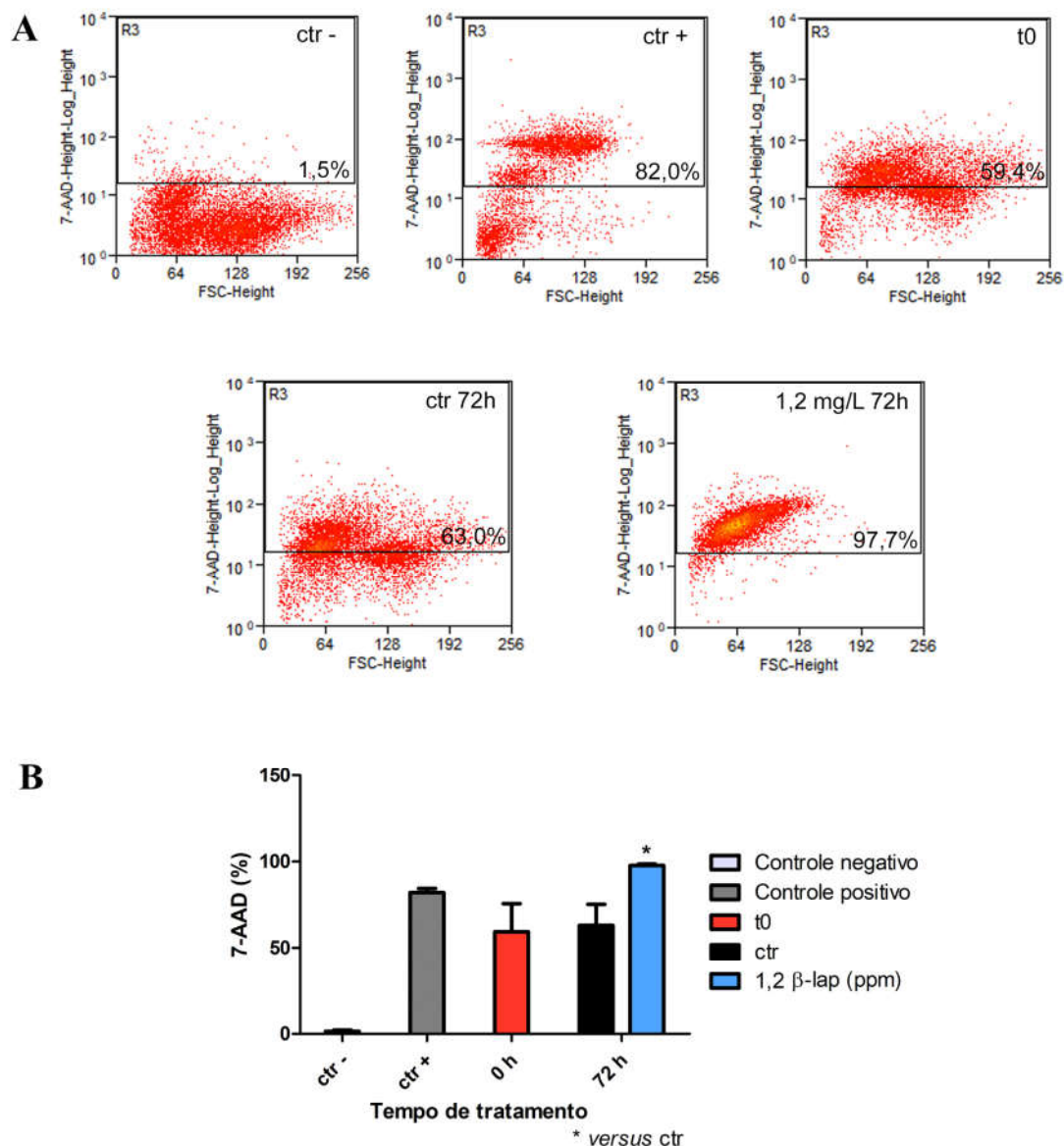


Figura 4.11: β -lapachona induz citotoxicidade nos esferoides. A: Dot plot representativo da marcação das células MCF-7 para 7-AAD, por citometria de fluxo. B: porcentagem de células positivas para 7-AAD, mostrando quase 100% de morte celular durante o tratamento com β -lap. Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos, analisando cinco esferoides por condição experimental. * $p < 0,05$. Teste *Two-way* ANOVA. Pós-teste Bonferroni.

4.4.4 β -lapachona inibe potencial metastático *in vitro*

Também nos perguntamos se a β -lap poderia interferir na migração/potencial metastático das células *in vitro*. Para responder nossa pergunta, realizamos o ensaio de migração, em que os esferoides foram transferidos para a placa de 24 poços para permitir a adesão celular e tratados com concentrações distintas de β -lap (0,3; 0,6 e 1,2 mg/L), durante 72 horas. Todas as concentrações de β -lap, durante todos os tempos estudados (exceto a menor concentração no tempo de 24 horas) diminuíram a dispersão das células a partir dos ETM, comparando com a condição não tratada (ctr) (Figura 4.12 A - E). No tempo de 24 horas de tratamento houve diminuição de 19,1% ($p < 0,001$) na dispersão celular utilizando a concentração de 0,6 mg/L e 35,3% ($p < 0,001$) utilizando 1,2 mg/L da β -lap. Com 48 horas de tratamento, a redução foi de 9,9% ($p < 0,05$) (0,3 mg/L), 34,3% ($p < 0,001$) (0,6 mg/L) e 50,9% ($p < 0,001$) (1,2 mg/L). Já com 72 horas, verificamos diminuição de 18,2% ($p < 0,001$) (0,3 mg/L), 44,7% ($p < 0,001$) (0,6 mg/L) e 66,9% ($p < 0,001$) (1,2 mg/L). Além da redução do diâmetro de dispersão celular, também foi possível observar diminuição dos “agrupamentos de migração” e da quantidade de células saindo dos ETM, sugerindo inibição da migração coletiva (Figura 4.12 F e G). Estes resultados indicam que a β -lap foi capaz de inibir a migração de células tumorais.

Posteriormente, decidimos verificar se o tratamento com a β -lap poderia inibir não somente a migração celular, mas também a TEM. Para este propósito, comparamos do conteúdo de E-caderina e vimentina nas células que migraram a partir dos esferoides tratados e não tratados, através das técnicas de *Western Blotting* e imunofluorescência. Nossos resultados de WB revelaram que o tratamento com a β -lap induziu aumento do conteúdo de E-cad (18,4%, $p = 0,0190$) e diminuição da VIM (34,3%, $p = 0,0381$), quando comparamos com a condição não tratada (Figura 4.13 A e B). Nossos resultados de imunofluorescência corroboraram os dados obtidos acima, nos quais observamos maior marcação para E-cad e menor marcação para VIM durante o tratamento com β -lap (Figura 4.13 D e F), quando comparamos com controle (Figura 4.13 C e E). Foi possível também observar células com fenótipo mesenquimal na periferia da migração (Figura 4.13 E).

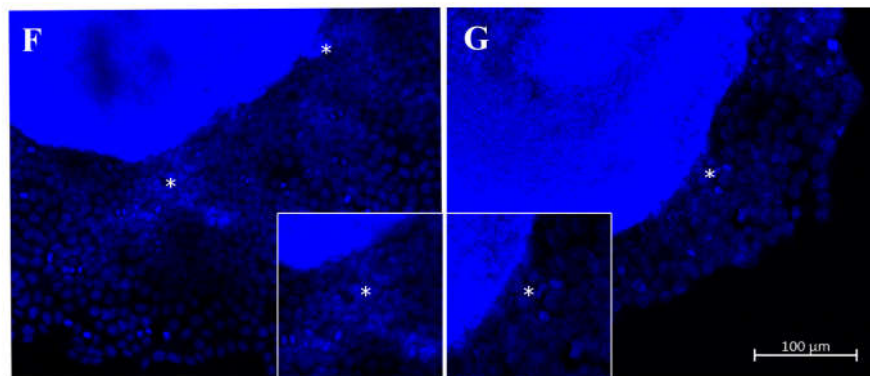
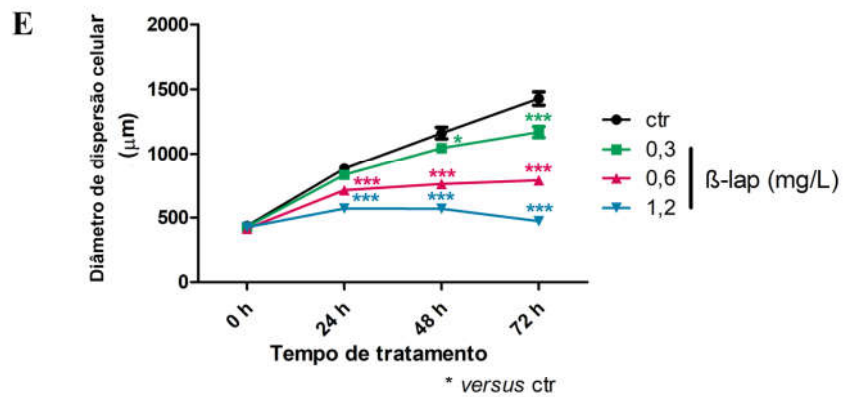
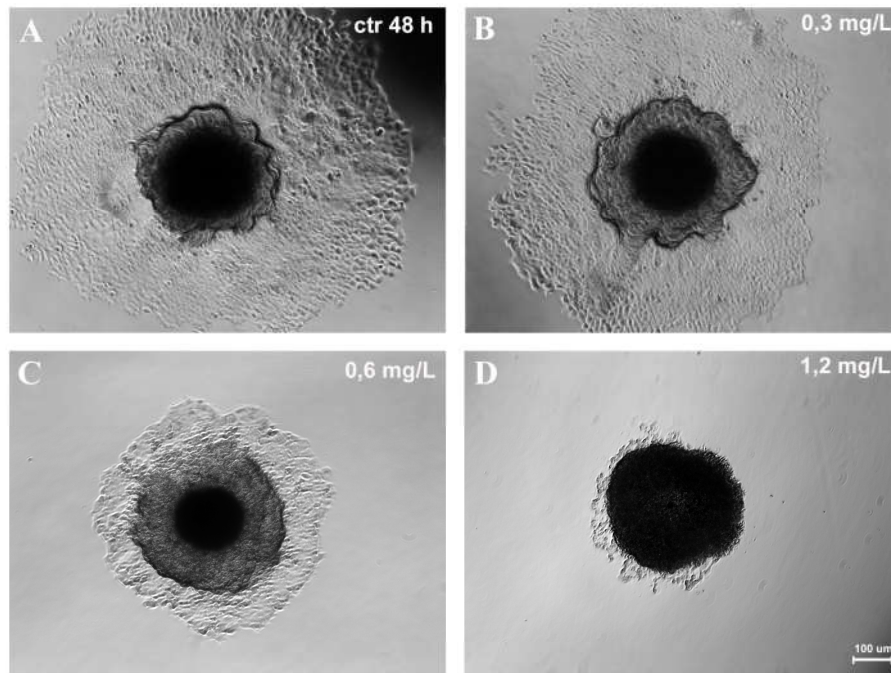


Figura 4.12: β -lapachona inibe a migração celular. A-D: Imagens representativas da microscopia de contraste de fase de esferoides não tratados (ctr) (A) e tratados com 0,3 mg/L (B), 0,6 mg/L (C) e 1,2 mg/L (D) de β -lap após 48 h de tratamento. E: Gráfico mostrando diminuição da propagação de células dos ETM ao longo do tempo, durante o tratamento em β -lap, quando comparado com o controle não tratado. F e G: marcação de DNA com DAPI (azul), mostrando diminuição de células agrupadas saindo dos ETM na condição tratada (F) em comparação com a não tratada (G). Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos, analisando cinco esferoides por condição experimental. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Teste *Two-way* ANOVA. Pós-teste Bonferroni.

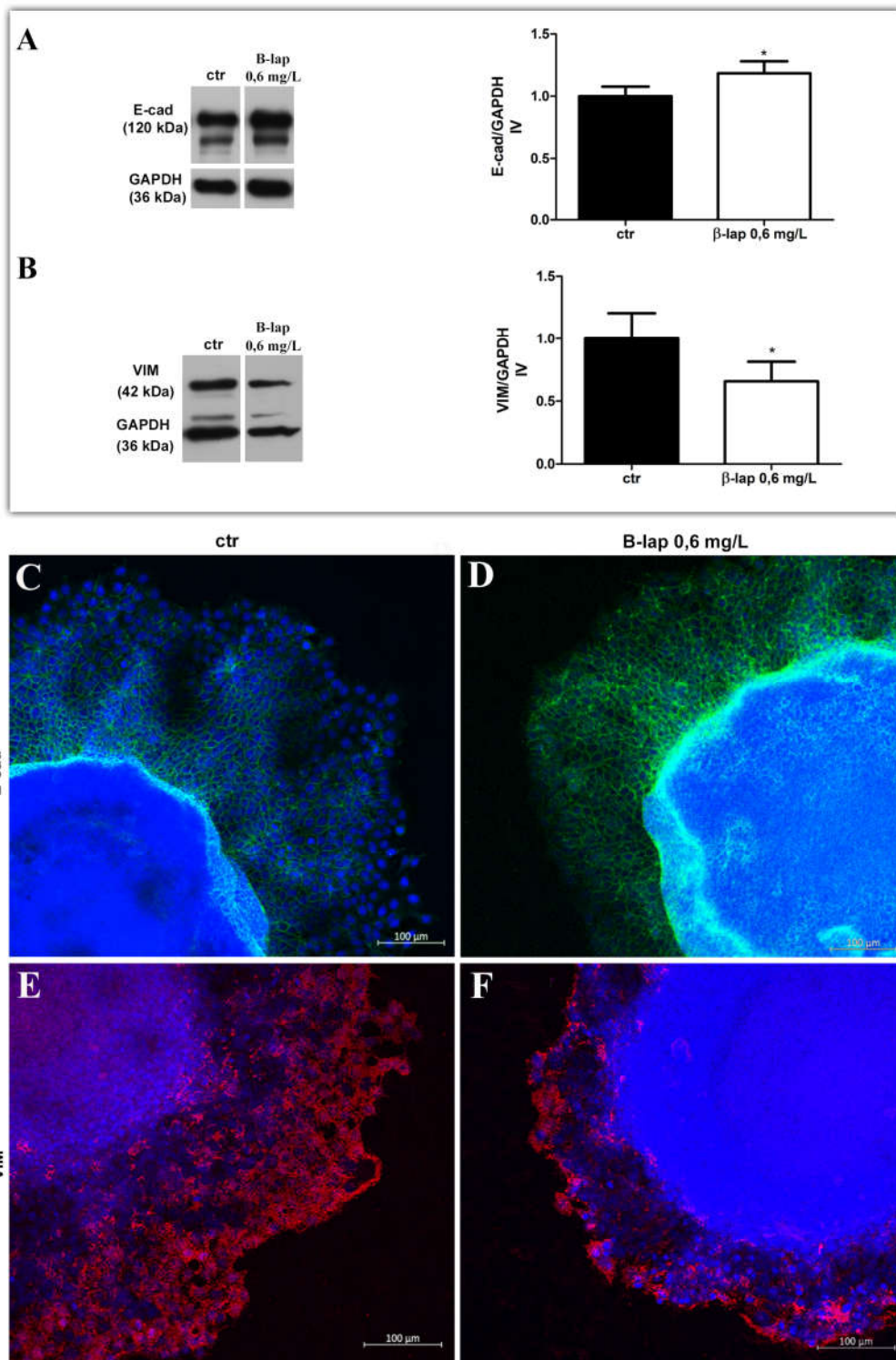


Figura 4.13: β -lapachona inibe a TEM. A e B: *Imunoblotting* para avaliação do conteúdo de E-caderina (E-cad) (A) e vimentina (VIM) (B) durante o ensaio de migração celular. Análises de densitometria revelaram aumento do conteúdo de E-cad e diminuição de VIM após o tratamento com β -lap. C-F: Ensaio de imunofluorescência mostrando aumento da marcação para E-cad (D) (verde) e diminuição da marcação para VIM (F) (vermelho) na zona periférica de migração após o tratamento (D e F) em comparação com a condição não tratada (C e E). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos. * $p < 0,05$. Teste de Mann Whitney.

5 DISCUSSÃO

A metástase é o principal problema no tratamento do câncer; sendo indicativo de mau prognóstico, afeta diretamente a sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes. Apesar dos avanços científicos e tecnológicos terem propiciado o surgimento de novos marcadores e alvos terapêuticos, é patente a necessidade de novas terapias que inibam a metástase (AL-MAHMOOD *et al.*, 2018; HIGGINS & BASELGA, 2011; QIAN, MEI & ZHANG, 2017; STEEG, 2016).

Os sistemas 3D de cultura de células desde os anos 70 têm contribuído com o entendimento da biologia do câncer e estudos de análise terapêutica *in vitro* (EMERMAN *et al.*, 1977). Cultivos 3D mimetizam melhor as características moleculares, morfológicas e funcionais do tumor *in vivo* (GOLIWAS *et al.*, 2017; VIDI, BISSELL & LELIEVRE, 2013), funcionando como uma ponte entre os tradicionais modelos 2D e os sistemas *in vivo* (HAM *et al.*, 2016; WEIGELT & BISSELL, 2008), além de reproduzir as respostas a quimioterápicos dos próprios pacientes (HALFTER *et al.*, 2015; HALFTER *et al.*, 2016). Os cultivos 3D de células não-tumorais e tumorais mamárias já são bem estabelecidos e existem várias maneiras de produzi-los (CARTER *et al.*, 2017; GONG *et al.*, 2015; WEIGELT & BISSELL, 2008; WEISWALD, BELLET & DANGLES-MARIE, 2015).

Existe uma variedade de modelos *in vitro* empregados para se estudar a migração e invasão de células tumorais. Os métodos mais simples, práticos e mais utilizados são os sistemas tradicionais de *Transwell* e *Wound healing* (KRAMER *et al.*, 2013; LIANG, PARK & GUAN, 2007). Ambos são capazes de reproduzir o processo migratório/ invasivo das células, porém têm suas limitações. Por exemplo, esses modelos não conseguem retratar a TEM, um importante processo inicial da metástase (DRASIN, ROBIN & FORD, 2011; HEERBOTH *et al.*, 2015; SEYFRIED & HUYSENTRUYT, 2013). Entender melhor como funciona a TEM torna possível projetar novas estratégias terapêuticas. Recentemente, foi patenteado um modelo 3D de migração que reproduz características da metástase *in vivo*, como a TEM, investigando esferoides após sua completa reversão para monocamada (KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014).

Nosso grupo possui experiência na produção de cultura 3D do tipo esferoide, gerados de forma espontânea em condições não aderentes, sem a utilização de matriz extracelular, incluindo a geração de sistemas de co-cultivos com células

endoteliais, mesenquimais de medula óssea e osteoblastos (DE BARROS *et al.*, 2010; GARZONI *et al.*, 2008; GARZONI *et al.*, 2009; ROSSI *et al.*, 2005). Nesse contexto e com base nesses estudos anteriores do nosso grupo, estabelecemos o modelo de esferóide utilizando a linhagem celular de mama MCF-7 para investigar a metástase e resposta terapêutica *in vitro*. Nosso sistema foi capaz de reproduzir características da metástase *in vivo*, como a migração coletiva de células e expressão de proteínas relacionadas ao processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM). Além disso, na primeira parte do estudo, mostramos que a doxorrubicina, um agente quimioterápico amplamente utilizado na clínica para diferentes tipos de câncer, inclusive câncer de mama (HERNANDEZ-AYA & GONZALEZ-ANGULO, 2013) foi capaz de inibir esse processo.

Nosso primeiro passo foi estabelecer um modelo 3D sem a utilização de fatores externos, como forças mecânicas e fatores de crescimento proporcionados por matrizes exógenas - que poderiam influenciar a formação e comportamento dos esferóides. Além disso, era do nosso interesse investigar se os esferóides tumorais eram capazes de sintetizar sua própria MEC. A intenção desse primeiro experimento, além de verificar a formação do esferóide, foi padronizar o tamanho do mesmo, crescimento e morfologia. No nosso sistema, vimos que as células aderiram espontaneamente umas nas outras e formaram esferóides compactos em apenas um único dia de cultura, independentemente da quantidade inicial de células introduzidas nos poços, ao contrário do que foi observado por nosso grupo com esferóides de células cardíacas, que levavam cerca de 5 dias para compactarem (GARZONI *et al.*, 2009). Além disso, cresceram de acordo com o tempo de cultura, exceto o de maior tamanho, possivelmente pela grande extensão de hipóxia gerada no interior do mesmo, perturbando seu crescimento. O crescimento dos esferóides em cultura parece ser uma característica de esferóides de células tumorais, visto que nossos dados prévios com células cardíacas não demonstraram tal crescimento (dados não publicados). De modo importante, a geração de um único esferóide por poço, com tamanho uniforme, favorece resultados reproduzíveis e torna esse sistema uma ferramenta importante para ensaios *highthroughput*. De fato, os esferóides produzidos através da técnica de *Liquid overlay* em superfícies inertes (o modelo utilizado nesse estudo), são reconhecidos como melhor modelo para esse tipo de teste, pelos motivos já mencionados acima (KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2004; LABARBERA, REID & YOO, 2012; LV *et al.*, 2017). Vale ressaltar que nem toda técnica

empregada para gerar esferoides, baseada na não aderência do mesmo à superfície da placa de cultura, irá formar esferoides homogêneos e individuais por poço. Por exemplo, utilizando placas comerciais revestidas com poliestireno, as conhecidas *ultra-low attachment plates*, gera-se esferoides de número e tamanho variados (KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014; VINCI *et al.*, 2012).

Ainda, como caracterização complementar do modelo, avaliamos também proteínas expressas pelas células de origem epitelial, como a E-caderina, uma proteína de junção aderente, e a laminina, proteína de matriz/lâmina basal, através da técnica de imunofluorescência. Verificamos que os ETM exibiram a marcação característica para E-caderina e foram capazes de produzir sua própria matriz extracelular (laminina). Os trabalhos de Bissel já demonstraram que esferoides não tumorais e tumorais mamários expressam proteínas de junção celular, como a E-caderina e também ZO-1, além de integrinas, de forma similar como ocorre *in vivo*. Interessantemente, alteração de alguns desses componentes tem sido relacionado com perda de polaridade celular e desenvolvimento tumoral (CHANDRAMOULY *et al.*, 2007; VIDI, BISSELL & LELIEVRE, 2013). A secreção de laminina e outros componentes de matriz, como colágeno IV e tenascina, já foram evidenciados tanto em esferoides produzidos a partir de células não tumorais quanto tumorais mamárias (STREULI, BAILEY & BISSELL, 1991; TIMMINS *et al.*, 2005) e, inclusive em sistemas de co-cultivo com células endoteliais e fibroblastos (CORREA DE SAMPAIO *et al.*, 2012). A capacidade da célula de produzir sua própria MEC é fundamental para o desenvolvimento do fenótipo funcional e retrata de forma muito mais fidedigna como ocorre *in vivo* (TIMMINS *et al.*, 2005). Além disso, possibilita melhor controle da sua condição experimental. Matrigel por exemplo, possui uma mistura de componentes e fatores solúveis endógenos que podem ser variáveis e acabar interferindo reprodutibilidade dos resultados (NATH & DEVI, 2016; NUNES *et al.*, 2019).

Tumores avasculares quando atingem entre 0,5 e 1 mm³, ou mesmo micrometástases, são caracterizados por possuir um núcleo necrótico com células quiescentes e uma periferia com células ativamente proliferativas, originados principalmente pela baixa difusão de oxigênio, nutrientes, metabólitos e fatores de crescimento através das células. Tais características podem ser alcançadas pelos denominados grandes ETM (tamanho entre 200 e 500 µm de diâmetro) (GROEBE & MUELLER-KLIESER, 1991; HAM *et al.*, 2016; KUNZ-SCHUGHART, KREUTZ & KNUECHEL, 1998). No nosso sistema de cultivo 3D, os esferoides apresentaram um núcleo

necrótico, evidenciado pela marcação para IP. Também pudemos verificar células ativamente proliferativas na zona periférica, através da marcação para Ki-67. Esses achados estão de acordo com dados da literatura para o modelo de esferoide (GROEBE & MUELLER-KLIESER, 1991; HAM *et al.*, 2016; MEHTA *et al.*, 2012). As células da periferia estão em contato íntimo com o meio, consumindo mais nutrientes e oxigênio, enquanto que a região central possui insuficiente oxigenação e baixa perfusão de nutriente, resultando em células não proliferativas, necróticas e hipóxicas (GROEBE & MUELLER-KLIESER, 1991; HAM *et al.*, 2016; MEHTA *et al.*, 2012). Essa heterogeneidade compartilhada por tumores avasculares, micrometástases e os grandes esferoides os torna modelos relevantes para estudos fisiopatológicos. De modo importante, por serem capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, na presença de hipóxia, como o VEGF, esferoides de diferentes tipos celulares são utilizados para estudos nessa linha, em sistemas de co-cultivo com células endoteliais (CORREA DE SAMPAIO *et al.*, 2012; HOWES *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018), por exemplo; e até para análise do potencial de metástase das células (WANG *et al.*, 2018). Ainda, a hipóxia também está relacionada com a resistência a quimioterápicos; inclusive trabalhos demonstram que a expressão e ativação de HIF-1 em esferoides da MCF-7 induz resistência a doxorubicina, sendo um bom modelo para investigações nesse âmbito (DOUBLIER *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2019).

Na perspectiva de validarmos nosso sistema de cultivo para futuramente utilizarmos células isoladas de tumores de pacientes, para estudos de terapia personalizada, nos propusemos a estabelecer nessa tese esferoides tumorais mamários obtidos a partir do cultivo primário de células de tumores de camundongos, com capacidades invasivas distintas, produzidos a partir de linhagens celulares tumorais (4T1 e 67NR). Utilizando protocolos de digestão enzimática previamente utilizados para dissociação de tumores proveniente de pacientes (VAZQUEZ *et al.*, 2004), verificamos que foi possível dissociar as células dos tumores e que as mesmas cresceram em cultura tanto em monocamada, como em 3D, formando compactos esferoides em apenas um único dia, assim como a MCF-7. Esses dados foram muito promissores e servem como prova de conceito para dois novos projetos, um que está sendo desenvolvido pelo meu co-orientando, Matheus Menezes Vianna (Mestrado), utilizando estas linhagens para o estudo do efeito antimetastático de compostos naturais; e um segundo, denominado “Projeto esferocâncer”, para estudos de terapia personalizada com células humanas que fará

parte do meu pós-doutorado. Embora haja uma escassez de estudos usando essa abordagem, ela poderia ser mais explorada para um melhor entendimento da biologia do câncer e do papel do microambiente tumoral na progressão do tumor, bem como para fornecer informações sobre novas estratégias terapêuticas. De forma interessante, um trabalho recente demonstrou que esferoides originados a partir da dissociação de xenoenxertos derivados de paciente (PDX, do inglês *patient-derived xenografts*) exibiram expressão semelhante de Ki-67 e caspase-3 quando comparados com o tumor original do paciente e com o tumor PDX do que as tradicionais culturas 2D (IMAMURA *et al.*, 2015), mostrando mais uma vez que a cultura 3D recapitula melhor as características do tumor em modelo experimental e em amostras de pacientes. De fato, nos últimos anos, os estudos têm demonstrado que esferoides tumorais mamários apresentam resposta ao tratamento *in vitro* similar aos seus tumores de origem (pacientes) quando tratados com os mesmos quimioterápicos (HALFTER *et al.*, 2015). Desta forma, é considerado um sistema promissor para avaliação de terapia personalizada (HALFTER *et al.*, 2015; HALFTER *et al.*, 2016; HALFTER & MAYER, 2017).

Antes da validação do modelo de ETM para teste de resposta terapêutica, primeiramente realizamos e caracterizamos o ensaio de migração utilizando os esferoides. Nossos resultados de microscopia de contraste de fase e fluorescência demonstraram que as células aderiram e migraram ao longo do tempo de cultura, em direções distintas, formando os “aglomerados de migração”, sugestivo de migração coletiva, um tipo de migração muito comum no câncer de mama (KHALIL *et al.*, 2017), que é caracterizada pela preservação de junções célula-célula funcionais, como a E-caderina. Um estudo *in vivo* utilizando esferoides da 4T1 e da MMT (célula tumoral mamária murina, negativa para E-cad), demonstrou através de microscopia intravital que, após dois dias da microimplantação dos esferoides na gordura mamária murina, as células saíam do esferoide e migravam de forma coletiva e, ainda, algumas delas apresentam morfologia fusiforme, depois migravam individualmente (sugerindo TEM), formando micro e macrometástases no pulmão (ILINA *et al.*, 2018). Além disso, esse modelo de migração reproduziu, pela primeira vez, o processo de TEM, verificado pela perda do marcador E-cad e ganho de VIM à medida que as células se tornavam mais distantes do esferoide. Ainda, as células na periferia exibiam fenótipo achatado e/ou fusiforme, características típicas das células mesenquimais. A partir destes dados, vimos então que, neste estudo, além de

recapitularmos as características do tumor *in vivo*, mimetizamos a migração de células que ocorre a partir dos tumores sólidos ou micrometástases *in vivo*, além de reproduzimos o processo de TEM (DRASIN, ROBIN & FORD, 2011; HEERBOTH *et al.*, 2015; KALLURI & WEINBERG, 2009; ZHANG & WEINBERG, 2018). Nesse sistema de migração não é necessário nenhum estímulo adicional para as células saírem do esferoide; por ser um ambiente inóspito e hipóxico, espontaneamente as células saem, assim como ocorre *in vivo* (RANKIN & GIACCIA, 2016).

A doxorubicina (dox) é um agente quimioterápico amplamente utilizado na clínica para o tratamento de diversos tipos de câncer, como: leucemia, neuroblastoma, câncer de ovário, pulmão, incluindo câncer de mama (HERNANDEZ-AYA & GONZALEZ-ANGULO, 2013). Os principais mecanismos de ação da dox incluem intercalação de DNA, inibição da topoisomerase II e formação de radicais livres dentro das células (TACAR, SRIAMORNSAK & DASS, 2013). Na tentativa de validar nosso sistema de cultura 3D, investigamos o efeito da dox sobre o tamanho dos ETM, viabilidade e morte celular, além de investigar se a dox interferiria no processo de migração e potencial metastático das células.

Como esperado, demonstramos que a dox induziu citotoxicidade nos ETM, reduzindo o diâmetro do esferoide, a viabilidade celular e induzindo a morte celular. Muitos estudos comparam a ação da dox com outras drogas ou compostos naturais e/ou com o modelo 2D (GHAFARI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2016; YILDIZ-OZTURK *et al.*, 2017). De qualquer forma, eles têm demonstrado que a dox inibe a proliferação e ciclo celular, bem como favorece a morte celular (necrose e apoptose), porém esse efeito é menos pronunciado quando comparado com às células que crescem em monocamada e são tratadas com a mesma concentração da droga (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2016; LOVITT, SHELPER & AVERY, 2015; XU *et al.*, 2016; XU, FARACH-CARSON & JIA, 2014; YILDIZ-OZTURK *et al.*, 2017), possivelmente pelo fato do modelo 3D ser mais resistente à drogas. Por exemplo, de forma interessante, a organização complexa das proteínas da MEC, bem como a menor taxa de proliferação das células que compõem os esferoides têm sido implicadas em promover a resistência das células tumorais mamárias a dox em um modelo de cultura 3D usando matrizes (Matrigel ou matriz de hidrogel) como arcabouço funcional para a produção dos esferoides. E, ainda, uma vez inibindo a $\beta 1$ integrina, aumentava-se o efeito da dox em alterar a integridade e tamanho dos esferoides (LOVITT, SHELPER & AVERY, 2018). Além disso, estudos têm demonstrado que os esferoides tumorais expressam genes

relacionados à resistência a drogas, como o MDR1 (NUNES *et al.*, 2019) e apresentam maior quantidade de células-tronco tumorais, células com maior potencial metastático e também conhecidas por serem mais resistentes à terapia (KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; YILMAZER, 2018). O fato de o modelo 3D ser mais resistente à drogas, não diminui sua importância ou sua aplicabilidade para testes terapêuticos, pelo contrário, ao mimetizar muito melhor o *in vivo* e inclusive a resistência terapêutica encontrada nos tumores sólidos humanos, torna seus resultados muito mais comparáveis, reprodutíveis e confiáveis (NUNES *et al.*, 2019).

Importante ressaltar que, apesar de a dox apresentar excelente atividade antitumoral, também é capaz de induzir efeitos colaterais graves, como imunossupressão e cardiotoxicidade aguda ou crônica (CHATTERJEE *et al.*, 2010; KOLEINI & KARDAMI, 2017; TACAR, SRIAMORNSAK & DASS, 2013). Além dos efeitos adversos, o uso prolongado da dox também tem sido relacionado com a resistência a essa droga, ambos fatores sendo os principais desafios para a eficácia do tratamento (LI *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006). Nesse sentido, novas formulações ou mesmo combinações da dox com outras drogas, objetivando à redução da concentração da mesma, são estratégias efetivas para evitar os efeitos adversos (RIVANKAR, 2014). Contudo, ao diminuir a concentração da droga, também é possível propiciar resistência e indução do potencial metastático (VYAS, LAPUT & VYAS, 2014; ZHONG *et al.*, 2017). Concentrações baixas de dox tem sido, de fato, implicadas em favorecer o processo metastático das células de câncer de mama triplo-negativas, por meio da ativação do TGF- β 1 (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2010; JANDA *et al.*, 2002), da regulação positiva da via RhoA / MLC (LIU *et al.*, 2019) ou do Twist1 (LI *et al.*, 2009). Ao interferir com essas vias de sinalizações, a dox induz alterações na morfologia (formato achatado e perda de contato célula-célula), capacidade invasiva das células ou mesmo promove o processo de TEM em modelos 2D e *in vivo*.

Após avaliação do efeito citotóxico, fomos investigar o efeito do tratamento com a dox sobre a migração e o potencial metastático das células MCF-7. Primeiramente, através de microscopia de contraste de fase, realizamos a análise do diâmetro de dispersão celular e verificamos que a dox reduziu a propagação das células a partir dos esferoides. Depois, através das técnicas de *Western blotting* e imunofluorescência, observamos que a dox não só inibiu a migração celular, mas também interferiu no potencial metastático das células tumorais da mama, reduzindo

a migração coletiva e o processo de TEM. A inibição da TEM foi observada pela redução expressiva de vimentina e aumento de E-caderina. Por imunofluorescência foi possível verificar com mais detalhes esse fenômeno, onde vimos a marcação para E-cad na zona periférica de migração e a diminuição da expressão de VIM nessa mesma região. Infelizmente, por motivos técnicos, não conseguimos fazer a dupla marcação dessas proteínas, o que poderia demonstrar etapas intermediárias do processo de TEM.

Discordâncias entre nossos achados e dados da literatura, acima mencionados, podem estar relacionadas com o fato de que esses estudos foram realizados com concentrações muito baixas de dox (máximo de 800 nM). Um trabalho utilizando um outro quimioterápico, o paclitaxel, demonstrou que doses baixas (1 mg/kg) do mesmo favorecia a metástase de células tumorais mamárias para o fígado, em modelo murino, enquanto que altas doses (20 mg/kg) reduzia (Li *et al.*, 2016). Ainda, independente da concentração da droga utilizada nesses trabalhos, outro viés poderia ser a falta de um modelo *in vitro* ideal para o estudo do potencial metastático, uma vez que as análises *in vitro* foram realizadas no sistema 2D. Recentemente, um ensaio de migração semelhante ao nosso, utilizando esferoides, foi patenteado. Eles demonstraram que os esferoides, após completa reversão para monocamada preservam características da metástase *in vivo*, como potencial migratório/invasivo, quimiorresistência e expressão de marcadores de células-tronco tumorais (CD133, CD90, EpCAM) (KUNJITHAPATHAM *et al.*, 2014). Diferentemente, em vez de investigar os esferoides que foram completamente revertidos para a monocamada, como nesse acima, nosso objetivo foi investigar características da metástase durante o processo de reversão. Transpondo para a situação *in vivo*, pensamos que seria melhor estudar e tentar intervir no processo metastático quando o mesmo se inicia do que quando ele já está estabelecido.

Como já mencionado acima, mesmo com os avanços científicos e surgimento de inovações terapêuticas contra o câncer, o câncer de mama continua sendo uma neoplasia comum e com um índice de óbito elevado, principalmente devido à recorrência do tumor e metástase (QIAN, MEI & ZHANG, 2017; STEEG, 2016). Novas estratégias terapêuticas para controlar o tumor e/ou melhorar a qualidade de vida de pacientes com câncer são iminentes.

No contexto dos compostos naturais, durante séculos, a casca interna das árvores conhecidas como ipês (*Tabebuia avellanedae*) têm sido utilizadas na

fitomedicina tradicional para tratar várias condições, como infecções bacterianas, virais e fúngicas, febre, malária, tripanossomíase, problemas gástricos e neoplasias. O principal componente do extrato da madeira desta árvore, que contribui para todas essas atividades farmacológicas, é um composto natural, uma naftoquinona, denominada β -lapachona (β -lap) (GOMEZ CASTELLANOS, PRIETO & HEINRICH, 2009). É importante ressaltar que, devido ao seu efeito antitumoral descrito em várias linhagens de células tumorais *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo*, incluindo estudos sobre câncer de pulmão, cólon, gástrico, próstata (CUI *et al.*, 2018; KEE, HAN, PARK, *et al.*, 2017; LI, WANG & PARDEE, 1995; WOO & CHOI, 2005) e câncer da mama (WUERZBERGER *et al.*, 1998), a β -lap tem sido, nos últimos anos, intensamente estudada e vem emergindo como um composto anticâncer bastante promissor. De forma interessante, a β -lap combinada ao quimioterápico gemcitabina já está em estudo clínico de fase 2 para o tratamento do câncer de pâncreas (ARQ 501) (YANG *et al.*, 2008).

Embora existam estudos que investiguem o potencial anticâncer da β -lap, abordagens que utilizam o cultivo 3D são raras. E, como temos enfatizado, os sistemas de cultivo 3D têm sido utilizados como uma potente ferramenta no estudo da fisiopatologia do câncer por mimetizar a arquitetura e funcionalidade do modelo *in vivo* (HONGISTO *et al.*, 2013; IMAMURA *et al.*, 2015; LABARBERA, REID & YOO, 2012; LIN & CHANG, 2008; LV *et al.*, 2017). Em vista do exposto, na segunda parte do trabalho, nos propusemos a estudar o efeito antitumoral da β -lap nos esferoides tumorais mamários. Nossos dados demonstraram que, além de induzir citotoxicidade, diminuindo o diâmetro do esferoide e favorecendo a morte celular, a β -lap inibiu o potencial metastático das células tumorais da mama *in vitro*, através da inibição da migração e do processo de TEM.

A atividade citotóxica da β -lap no contexto tumoral é conhecida. No entanto, o mecanismo detalhado da morte celular induzida por este composto natural ainda está sob investigação. Até o momento, os dados da literatura apontam para dois principais mecanismos de ação: inibição da topoisomerase I (LI, AVERBOUKH & PARDEE, 1993) e II (KRISHNAN & BASTOW, 2000) e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxido e peróxido de hidrogênio (DOCAMPO *et al.*, 1979). Interessantemente, as ROS são geradas principalmente através da redução da própria β -lap pela redutase NQO1 (NAD(P)H Desidrogenase (Quinona1)), que é altamente expressa em tumores sólidos, como câncer de pâncreas, carcinoma de

pulmão de células não pequenas e câncer de mama (SIEGEL & ROSS, 2000; SIEGEL, YAN & ROSS, 2012). O que pode explicar, mesmo que em parte, o efeito antitumoral, já descrito, deste composto natural sobre os tumores sólidos. Além disso, indução de morte celular já foi relatada durante o tratamento de células tumorais mamárias com β -lap, orquestrando diferentes tipos de morte (apoptose ou necrose), a depender do tipo de célula tumoral/ linhagem e a concentração de β -lap utilizada (PARK *et al.*, 2014; PINK *et al.*, 2000; WOO *et al.*, 2006). Ainda, dados da literatura indicam que a β -lap é capaz de inibir o crescimento tumoral e promover a parada do ciclo celular (conhecido no inglês como *cell cycle arrest*) (DIAS *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2006). É importante ressaltar que um trabalho demonstrou que esse composto natural é capaz de inibir a formação de “mamosferas”, usando esferoides produzidos apenas com células-tronco tumorais de mama (KIM & CHO, 2018). Nesse estudo, nossos resultados revelaram que o tratamento com β -lap reduziu o diâmetro do esferoide, indicando um efeito citotóxico desse composto. Esse resultado foi corroborado pela análise da morte celular, através da técnica de citometria de fluxo, em que o número de células positivas para 7-AAD atingiu quase 100% na condição tratada. Alteração na morfologia (coloração escura) também pôde ser observada, através da microscopia de contraste de fase.

Após verificarmos o efeito citotóxico da β -lap nos esferoides tumorais de mama, realizamos nosso ensaio de migração de esferoides para avaliar se a β -lap poderia também intervir no processo de migração/potencial metastático *in vitro*. Primeiramente, analisamos o efeito da β -lap sobre a dispersão das células a partir do esferoide, por microscopia de contraste de fase e fluorescência. Nossos resultados demonstraram redução não só do diâmetro de dispersão, mas quantidade de aglomerados celulares saindo dos esferoides, indicando que a β -lap inibiu a migração de células tumorais de mama *in vitro*, no modelo 3D do tipo esferoide, pela primeira vez.

Em seguida, fomos avaliar o efeito da β -lap sobre a TEM, uma importante etapa inicial da metástase. Mais uma vez verificamos que na situação controle (sem tratamento) há reprodução de características da metástase *in vivo*, como migração coletiva e processo de TEM, observadas aqui pela perda da expressão de E-cad e pela regulação positiva de VIM nos esferoides; além de células apresentando fenótipo mesenquimal na área periférica da migração. Vimos também que o tratamento com β -lap foi capaz de modular esse processo, regulando positivamente

a expressão de E-cad e diminuindo a marcação para VIM. Esses achados corroboram dados da literatura, nos quais foi demonstrado que o β -lap suprime o processo de TEM e a migração de células tumorais de melanoma, câncer de colorretal e câncer de mama *in vitro* (2D) e *in vivo* (KEE, HAN, KIM, *et al.*, 2017; KEE, HAN, PARK, *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017). De modo interessante, já foi descrito que a regulação negativa da NQO1 inibe a invasão celular em um estudo utilizando esferoides tumorais de pulmão (MADAJEWSKI *et al.*, 2016). Ainda, a elevada expressão de NQO1 tem sido relacionada com a ocorrência de metástases *in vivo* e em pacientes (LI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2019).

Compilando os dados, nossos resultados demonstraram que nosso sistema de cultivo 3D foi capaz de reproduzir características do tumor *in vivo*. Além disso, validamos o sistema para teste de drogas usando a doxorrubicina, um agente quimioterápico amplamente utilizado na clínica. Ainda, nosso ensaio de migração foi capaz de reproduzir características da metástase *in vivo* e, então, poderia funcionar como uma importante ferramenta para o estudo da progressão do câncer *in vitro* e para testes de agentes antimetastáticos. Mais que isso, mostramos que a doxorrubicina, no nosso modelo e com as concentrações que utilizamos, foi capaz de inibir esses processos, sugerindo uma nova aplicação desse quimioterápico, que precisa ser mais explorada em estudos futuros. Ainda, demonstramos, pela primeira vez, o efeito antitumoral e antimetastático da β -lap em esferoides de tumores da mama. Esse composto natural induziu a morte celular e inibiu o potencial metastático *in vitro*, reduzindo a migração coletiva e inibindo o processo de TEM. De maneira importante, a β -lap é um composto natural sob investigação ativa de pesquisadores e tem potencial para ser um agente anticâncer promissor para a prevenção do câncer.

Finalmente, podemos concluir que, uma vez que os esferoides tumorais mamários recapitulam *in vitro* características do tumor e da metástase *in vivo*, estes podem ser considerados uma poderosa ferramenta para o estudo de novas estratégias terapêuticas *in vitro* antitumorais e, mais especificamente, antimetastáticas.

6 CONCLUSÕES

Esferoides tumorais mamários podem funcionar como uma importante ferramenta para o estudo da progressão do câncer *in vitro* e para análises de resposta terapêutica com agentes antitumorais, visto que:

- 1) O sistema *in vitro* de ETM é uma ferramenta que reproduz aspectos do tumor *in vivo*, como o centro necrótico e células proliferativas na periferia, podendo ser utilizado para estudos da biologia tumoral e resposta terapêutica.
- 2) Aspectos do processo metastático, com ênfase para a migração coletiva e a TEM, podem ser estudados *in vitro* com os ETM.
- 3) Além do efeito citotóxico já descrito previamente, concluímos pela primeira vez que a doxorrubicina foi capaz de atuar sobre o potencial metastático *in vitro* em modelo 3D, através da inibição da migração celular e TEM.
- 4) β -lapachona apresenta efeito citotóxico e antimetastático em ETM.

7 FRUTOS DO PROJETO

Os resultados desse projeto foram muito promissores e propiciaram a elaboração de um segundo trabalho a ser desenvolvido por dois estudantes do grupo, em que visamos avaliar o potencial antimetastático *in vitro* da β -lapachona e da dihidrochalcona QUE-2, outro composto natural, no modelo tridimensional de células tumorais mamárias com diferentes capacidades invasivas (4T1 e 67NR).

Os resultados deste trabalho também deram origem a dois manuscritos a serem submetidos para as revistas *European Journal of Cell Biology* e *BMC Cancer*. O primeiro artigo, intitulado “Development of a spheroid model to study metastasis *in vitro*”, compila os dados do estabelecimento do modelo e validação com a doxorubicina; o segundo, intitulado “ β -lapachone inhibits tumor progression of breast cancer spheroids”, aborda o efeito antitumoral da β -lapachona nos esferoides tumorais mamários.

8 PERSPECTIVAS

Para o meu projeto de pós doutorado, temos como perspectivas obter amostras de tumores de mama de pacientes, produzir esferoides a partir dos mesmos e avaliar a similaridade dos esferoides com os tumores de origem quanto as características morfológicas, funcionais, moleculares e de resposta terapêutica quando tratados com as mesmas drogas prescritas para as pacientes doadoras; e após a validação dos esferoides como preditores de resposta terapêutica, propor a elaboração de um “quimiograma” tumoral para análise da resposta terapêutica na perspectiva da medicina personalizada, a ser disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS. **Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018**. Atlanta: 2017.

AL-MAHMOOD, S.; SAPIEZYNSKI, J.; GARBUZENKO, O. B.; MINKO, T. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Deliv Transl Res**, 8, n. 5, p. 1483-1507, Oct 2018.

ALESSANDRI, K.; SARANGI, B. R.; GURCHENKOV, V. V.; SINHA, B. *et al.* Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 37, p. 14843-14848, Sep 10 2013.

ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumour Biol**, 35, n. 9, p. 8483-8523, Sep 2014.

BANDYOPADHYAY, A.; WANG, L.; AGYIN, J.; TANG, Y. *et al.* Doxorubicin in combination with a small TGFbeta inhibitor: a potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. **PLoS One**, 5, n. 4, p. e10365, Apr 28 2010.

BAR-ON, O.; SHAPIRA, M.; HERSHKO, D. D. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, 18, n. 10, p. 1113-1121, Nov 2007.

BARCELLOS-HOFF, M. H.; AGGELER, J.; RAM, T. G.; BISSELL, M. J. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. **Development**, 105, n. 2, p. 223-235, Feb 1989.

BAUERLE, T.; KOMLJENOVIC, D.; MERZ, M.; BERGER, M. R. *et al.* Cilengitide inhibits progression of experimental breast cancer bone metastases as imaged noninvasively using VCT, MRI and DCE-MRI in a longitudinal in vivo study. **Int J Cancer**, 128, n. 10, p. 2453-2462, May 15 2011.

BEASLEY, G. M.; RIBOH, J. C.; AUGUSTINE, C. K.; ZAGER, J. S. *et al.* Prospective multicenter phase II trial of systemic ADH-1 in combination with melphalan via isolated limb infusion in patients with advanced extremity melanoma. **J Clin Oncol**, 29, n. 9, p. 1210-1215, Mar 20 2011.

BERIM, L. D.; KOS, B. M.; EVANDE, R.; MEZA, J. L. *et al.* A phase I study of ADH-1 with cisplatin (Cisp) and gemcitabine (Gem) in patients (Pts) with unresectable or metastatic pancreatic and biliary tract cancers. **Journal of Clinical Oncology**, 35, n. 4_suppl, p. 306-306, 2017.

BERRY, R. J.; LAING, A. H.; WELLS, J. Fresh explant culture of human tumours in vitro and the assessment of sensitivity to cytotoxic chemotherapy. **Br J Cancer**, 31, n. 2, p. 218-227, Feb 1975.

BIELECKA, Z. F.; MALISZEWSKA-OLEJNICZAK, K.; SAFIR, I. J.; SZCZYLIK, C. *et al.* Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 92, n. 3, p. 1505-1520, Aug 2017.

BOCKHORN, M.; JAIN, R. K.; MUNN, L. L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? **The Lancet Oncology**, 8, n. 5, p. 444-448, 2007.

BODAI, B. I.; TUSO, P. Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations. **Perm J**, 19, n. 2, p. 48-79, Spring 2015.

BOGDAHN, U.; HAU, P.; STOCKHAMMER, G.; VENKATARAMANA, N. K. *et al.* Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. **Neuro Oncol**, 13, n. 1, p. 132-142, Jan 2011.

BOLOS, V.; PEINADO, H.; PEREZ-MORENO, M. A.; FRAGA, M. F. *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. **J Cell Sci**, 116, n. Pt 3, p. 499-511, Feb 1 2003.

BREKKEN, C.; DE LANGE DAVIES, C. Hyaluronidase reduces the interstitial fluid pressure in solid tumours in a non-linear concentration-dependent manner. **Cancer Lett**, 131, n. 1, p. 65-70, Sep 11 1998.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. **Oncotarget**, 7, n. 29, p. 45745-45756, Jul 19 2016.

BURANRAT, B.; SUWANNALOET, W.; NAOWABOOT, J. Simvastatin potentiates doxorubicin activity against MCF-7 breast cancer cells. **Oncol Lett**, 14, n. 5, p. 6243-6250, Nov 2017.

BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, 107, n. 5, p. 1761-1767, Mar 1 2006.

CALVO, F.; MARTIN, P. M.; JABRANE, N.; DE CREMOUX, P. *et al.* Human breast cancer cells share antigens with the myeloid monocyte lineage. **Br J Cancer**, 56, n. 1, p. 15-19, Jul 1987.

CAMORATTO, A. M.; JANI, J. P.; ANGELES, T. S.; MARONEY, A. C. *et al.* CEP-751 inhibits TRK receptor tyrosine kinase activity in vitro exhibits anti-tumor activity. **Int J Cancer**, 72, n. 4, p. 673-679, Aug 7 1997.

CAO, Z.; LIVAS, T.; KYPRIANOU, N. Anoikis and EMT: Lethal "Liaisons" during Cancer Progression. **Crit Rev Oncog**, 21, n. 3-4, p. 155-168, 2016.

CARDOSO, F.; SENKUS, E.; COSTA, A.; PAPADOPOULOS, E. *et al.* 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4) dagger. **Ann Oncol**, 29, n. 8, p. 1634-1657, Aug 1 2018.

CARTER, E. P.; GOPSILL, J. A.; GOMM, J. J.; JONES, J. L. *et al.* A 3D in vitro model of the human breast duct: a method to unravel myoepithelial-luminal interactions in the progression of breast cancer. **Breast Cancer Res**, 19, n. 1, p. 50, Apr 21 2017.

CHANDRAMOULY, G.; ABAD, P. C.; KNOWLES, D. W.; LELIEVRE, S. A. The control of tissue architecture over nuclear organization is crucial for epithelial cell fate. **J Cell Sci**, 120, n. Pt 9, p. 1596-1606, May 1 2007.

CHAPMAN, H. A. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. **Annu Rev Physiol**, 73, p. 413-435, 2011.

CHATTERJEE, K.; ZHANG, J.; HONBO, N.; KARLINER, J. S. Doxorubicin cardiomyopathy. **Cardiology**, 115, n. 2, p. 155-162, 2010.

CHEANG, M. C.; CHIA, S. K.; VODUC, D.; GAO, D. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, 101, n. 10, p. 736-750, May 20 2009.

CHOI, Y.; HYUN, E.; SEO, J.; BLUNDELL, C. *et al.* A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. **Lab Chip**, 15, n. 16, p. 3350-3357, Aug 21 2015.

CORREA DE SAMPAIO, P.; AUSLAENDER, D.; KRUBASIK, D.; FAILLA, A. V. *et al.* A heterogeneous in vitro three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis. **PLoS One**, 7, n. 2, p. e30753, 2012.

CORREIA, A. L.; BISSELL, M. J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. **Drug Resist Updat**, 15, n. 1-2, p. 39-49, Feb-Apr 2012.

CUI, X.; CHEN, L.; SUN, J.; WANG, Y. *et al.* [beta-Lapachone combined with NVP-BEZ235 inhibit proliferation and migration of BGC-823 gastric cancer cells]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, 34, n. 2, p. 129-135, Feb 2018.

CUI, X.; HARTANTO, Y.; ZHANG, H. Advances in multicellular spheroids formation. **J R Soc Interface**, 14, n. 127, Feb 2017.

DAI, X.; CHENG, H.; BAI, Z.; LI, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **J Cancer**, 8, n. 16, p. 3131-3141, 2017.

DAI, X.; LI, T.; BAI, Z.; YANG, Y. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **Am J Cancer Res**, 5, n. 10, p. 2929-2943, 2015.

DE ABREU, F. B.; SCHWARTZ, G. N.; WELLS, W. A.; TSONGALIS, G. J. Personalized therapy for breast cancer. **Clin Genet**, 86, n. 1, p. 62-67, Jul 2014.

DE BARROS, A. P.; TAKIYA, C. M.; GARZONI, L. R.; LEAL-FERREIRA, M. L. *et al.* Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. **PLoS One**, 5, n. 2, p. e9093, Feb 8 2010.

DE CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 2, p. 97-110, Feb 2013.

DIAS, R. B.; DE ARAUJO, T. B. S.; DE FREITAS, R. D.; RODRIGUES, A. *et al.* beta-Lapachone and its iodine derivatives cause cell cycle arrest at G2/M phase and reactive oxygen species-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. **Free Radic Biol Med**, 126, p. 87-100, Oct 2018.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R. P. *et al.* beta-Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochem Pharmacol**, 28, n. 6, p. 723-728, Mar 15 1979.

DOUBLIER, S.; BELISARIO, D. C.; POLIMENI, M.; ANNARATONE, L. *et al.* HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. **BMC Cancer**, 12, p. 4, Jan 4 2012.

DRASIN, D. J.; ROBIN, T. P.; FORD, H. L. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. **Breast Cancer Res**, 13, n. 6, p. 226, 2011.

DUFFY, M. J.; MCGOWAN, P. M.; GALLAGHER, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. **J Pathol**, 214, n. 3, p. 283-293, Feb 2008.

DUMBRAVA, E. I.; MERIC-BERNSTAM, F. Personalized cancer therapy-leveraging a knowledge base for clinical decision-making. **Cold Spring Harb Mol Case Stud**, 4, n. 2, Apr 2018.

DWYER, A.; ELLIES, L.; HOLME, A.; PIXLEY, F. A three-dimensional co-culture system to investigate macrophage-dependent tumor cell invasion. **Journal of Biological Methods**, 3, p. 49, 07/24 2016.

EMERMAN, J. T.; BARTLEY, J. C.; BISSELL, M. J. Glucose metabolite patterns as markers of functional differentiation in freshly isolated and cultured mouse mammary epithelial cells. **Exp Cell Res**, 134, n. 1, p. 241-250, Jul 1981.

EMERMAN, J. T.; ENAMI, J.; PITELKA, D. R.; NANDI, S. Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74, n. 10, p. 4466-4470, Oct 1977.

EWALD, A. J.; BRENOT, A.; DUONG, M.; CHAN, B. S. *et al.* Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. **Dev Cell**, 14, n. 4, p. 570-581, Apr 2008.

FANG, H.; DECLERCK, Y. A. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. **Cancer Res**, 73, n. 16, p. 4965-4977, Aug 15 2013.

FERNANDES, G. C.; MICHELLI, R. A.; GALVAO, H. C.; PAULA, A. E. *et al.* Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget**, 7, n. 49, p. 80465-80481, Dec 6 2016.

FERRÃO, P. M.; NISIMURA, L. M.; MOREIRA, O. C.; LAND, M. G. *et al.* Inhibition of TGF-beta pathway reverts extracellular matrix remodeling in T. cruzi-infected cardiac spheroids. **Exp Cell Res**, 362, n. 2, p. 260-267, Jan 15 2018.

FREEMAN, A. E.; HOFFMAN, R. M. In vivo-like growth of human tumors in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 8, p. 2694-2698, Apr 1986.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nat Protoc**, 4, n. 3, p. 309-324, 2009.

GAO, Y.; WANG, Z.; HAO, Q.; LI, W. *et al.* Loss of ERalpha induces amoeboid-like migration of breast cancer cells by downregulating vinculin. **Nat Commun**, 8, p. 14483, Mar 7 2017.

GARRISON, J. B.; KYPRIANOU, N. Doxazosin induces apoptosis of benign and malignant prostate cells via a death receptor-mediated pathway. **Cancer Res**, 66, n. 1, p. 464-472, Jan 1 2006.

GARZONI, L. R.; CALDERA, A.; MEIRELLES MDE, N.; DE CASTRO, S. L. *et al.* Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risnedronate on *Trypanosoma cruzi*. **Int J Antimicrob Agents**, 23, n. 3, p. 273-285, Mar 2004.

GARZONI, L. R.; ADESSE, D.; SOARES, M. J.; ROSSI, M. I. *et al.* Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. **J Infect Dis**, 197, n. 6, p. 906-915, Mar 15 2008.

GARZONI, L. R.; ROSSI, M. I.; DE BARROS, A. P.; GUARANI, V. *et al.* Dissecting coronary angiogenesis: 3D co-culture of cardiomyocytes with endothelial or mesenchymal cells. **Exp Cell Res**, 315, n. 19, p. 3406-3418, Nov 15 2009.

GHAFAFI, F.; RAJABI, M. R.; MAZOOCHI, T.; TAGHIZADEH, M. *et al.* Comparing Apoptosis and Necrosis Effects of *Arctium Lappa* Root Extract and Doxorubicin on MCF7 and MDA-MB-231 Cell Lines. **Asian Pac J Cancer Prev**, 18, n. 3, p. 795-802, Mar 1 2017.

GHOSH, S.; PRASAD, M.; KUNDU, K.; COHEN, L. *et al.* Tumor Tissue Explant Culture of Patient-Derived Xenograft as Potential Prioritization Tool for Targeted Therapy. **Front Oncol**, 9, p. 17, 2019.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. **Future Oncol**, 9, n. 11, p. 1623-1636, Nov 2013.

GILLET, J. P.; CALCAGNO, A. M.; VARMA, S.; MARINO, M. *et al.* Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 46, p. 18708-18713, Nov 15 2011.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 48, p. 463-474, 2012.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A. S.; GELBER, R. D. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol**, 24, n. 9, p. 2206-2223, Sep 2013.

GOLIWAS, K. F.; RICHTER, J. R.; PRUITT, H. C.; ARAYSI, L. M. *et al.* Methods to Evaluate Cell Growth, Viability, and Response to Treatment in a Tissue Engineered Breast Cancer Model. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 14167, 2017/10/26 2017.

GOMEZ CASTELLANOS, J. R.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)--a global ethnopharmacological commodity? **J Ethnopharmacol**, 121, n. 1, p. 1-13, Jan 12 2009.

GONG, X.; LIN, C.; CHENG, J.; SU, J. *et al.* Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. **PLoS One**, 10, n. 6, p. e0130348, 2015.

GROEBE, K.; MUELLER-KLIESER, W. Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters. **Eur Biophys J**, 19, n. 4, p. 169-181, 1991.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharm Sin B**, 5, n. 5, p. 402-418, Sep 2015.

HALFTER, K.; DITSCH, N.; KOLBERG, H. C.; FISCHER, H. *et al.* Prospective cohort study using the breast cancer spheroid model as a predictor for response to neoadjuvant therapy--the SpheroNEO study. **BMC Cancer**, 15, p. 519, Jul 15 2015.

HALFTER, K.; HOFFMANN, O.; DITSCH, N.; AHNE, M. *et al.* Testing chemotherapy efficacy in HER2 negative breast cancer using patient-derived spheroids. **J Transl Med**, 14, n. 1, p. 112, May 3 2016.

HALFTER, K.; MAYER, B. Bringing 3D tumor models to the clinic - predictive value for personalized medicine. **Biotechnol J**, 12, n. 2, Feb 2017.

HAM, S. L.; JOSHI, R.; THAKURI, P. S.; TAVANA, H. Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. **Exp Biol Med (Maywood)**, 241, n. 9, p. 939-954, May 2016.

HAMMOND, E.; KHURANA, A.; SHRIDHAR, V.; DREDGE, K. The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. **Front Oncol**, 4, p. 195, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HAZAN, R. B.; PHILLIPS, G. R.; QIAO, R. F.; NORTON, L. *et al.* Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. **J Cell Biol**, 148, n. 4, p. 779-790, Feb 21 2000.

HEERBOTH, S.; HOUSMAN, G.; LEARY, M.; LONGACRE, M. *et al.* EMT and tumor metastasis. **Clin Transl Med**, 4, p. 6, 2015.

HEIMES, A. S.; SCHMIDT, M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, 28, n. 1, p. 1-5, Jan 2019.

HENSON, D. E.; RIES, L.; FREEDMAN, L. S.; CARRIAGA, M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. **Cancer**, 68, n. 10, p. 2142-2149, Nov 15 1991.

HERNANDEZ-AYA, L. F.; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Adjuvant systemic therapies in breast cancer. **Surg Clin North Am**, 93, n. 2, p. 473-491, Apr 2013.

HIGGINS, M. J.; BASELGA, J. Targeted therapies for breast cancer. **J Clin Invest**, 121, n. 10, p. 3797-3803, Oct 2011.

HONGISTO, V.; JERNSTROM, S.; FEY, V.; MPINDI, J. P. *et al.* High-throughput 3D screening reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e77232, 2013.

HONN, K. V.; TANG, D. G.; GROSSI, I.; DUNIEC, Z. M. *et al.* Tumor cell-derived 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces microvascular endothelial cell retraction. **Cancer Res**, 54, n. 2, p. 565-574, Jan 15 1994.

HOWES, A. L.; RICHARDSON, R. D.; FINLAY, D.; VUORI, K. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. **PLoS One**, 9, n. 9, p. e108283, 2014.

HUANG, R. Y.; GUILFORD, P.; THIERY, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Sci**, 125, n. Pt 19, p. 4417-4422, Oct 1 2012.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, 110, n. 6, p. 673-687, Sep 20 2002.

ILINA, O.; CAMPANELLO, L.; GRITSENKO, P. G.; VULLINGS, M. *et al.* Intravital microscopy of collective invasion plasticity in breast cancer. **Dis Model Mech**, 11, n. 9, Aug 23 2018.

IMAMURA, Y.; MUKOHARA, T.; SHIMONO, Y.; FUNAKOSHI, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncol Rep**, 33, n. 4, p. 1837-1843, Apr 2015.

INCA. **Estimate 2018: Cancer Incidence in Brazil** 2018. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/rbc/n_64/v01/pdf/15-review-estimate-2018-cancer-incidence-in-brazil.pdf.

INCA. **Tipos de câncer - Câncer de mama**. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.

INGRAM, M.; TECHY, G. B.; SAROUFEEM, R.; YAZAN, O. *et al.* Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 33, n. 6, p. 459-466, Jun 1997.

ISHIDA, Y.; AGATA, Y.; SHIBAHARA, K.; HONJO, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **Embo j**, 11, n. 11, p. 3887-3895, Nov 1992.

IVSHINA, A. V.; GEORGE, J.; SENKO, O.; MOW, B. *et al.* Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. **Cancer Res**, 66, n. 21, p. 10292-10301, Nov 1 2006.

IWATSUKI, M.; MIMORI, K.; YOKOBORI, T.; ISHI, H. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Sci**, 101, n. 2, p. 293-299, Feb 2010.

JANDA, E.; LEHMANN, K.; KILLISCH, I.; JECHLINGER, M. *et al.* Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. **J Cell Biol**, 156, n. 2, p. 299-313, Jan 21 2002.

JEON, Y. J.; BANG, W.; SHIN, J. C.; PARK, S. M. *et al.* Downregulation of Sp1 is involved in beta-lapachone-induced cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, 46, n. 6, p. 2606-2612, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, 119, n. 6, p. 1420-1428, Jun 2009.

KAREKLA, E.; LIAO, W.-J.; SHARP, B.; PUGH, J. *et al.* Ex Vivo Explant Cultures of Non-Small Cell Lung Carcinoma Enable Evaluation of Primary Tumor Responses to Anticancer Therapy. **Cancer Research**, 77, p. canres.1121.2016, 02/15 2017.

KAWAGUCHI, T.; NAKAMURA, K. Analysis of the lodgement and extravasation of tumor cells in experimental models of hematogenous metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, 5, n. 2, p. 77-94, 1986.

KAWAUCHI, T. Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. **Int J Mol Sci**, 13, n. 4, p. 4564-4590, 2012.

KEE, J. Y.; HAN, Y. H.; KIM, D. S.; MUN, J. G. *et al.* beta-Lapachone suppresses the lung metastasis of melanoma via the MAPK signaling pathway. **PLoS One**, 12, n. 5, p. e0176937, 2017.

KEE, J. Y.; HAN, Y. H.; PARK, J.; KIM, D. S. *et al.* beta-Lapachone Inhibits Lung Metastasis of Colorectal Cancer by Inducing Apoptosis of CT26 Cells. **Integr Cancer Ther**, 16, n. 4, p. 585-596, Dec 2017.

KHALIL, A. A.; ILINA, O.; GRITSENKO, P. G.; BULT, P. *et al.* Collective invasion in ductal and lobular breast cancer associates with distant metastasis. **Clin Exp Metastasis**, 34, n. 6-7, p. 421-429, Oct 2017.

KHONG, H. T.; DREISBACH, L.; KINDLER, H. L.; TRENT, D. F. *et al.* A phase 2 study of ARQ 501 in combination with gemcitabine in adult patients with treatment naïve, unresectable pancreatic adenocarcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 25, n. 18_suppl, p. 15017-15017, 2007/06/20 2007.

KIM, D. W.; CHO, J. Y. NQO1 is Required for beta-Lapachone-Mediated Downregulation of Breast-Cancer Stem-Cell Activity. **Int J Mol Sci**, 19, n. 12, Nov 30 2018.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Semin Cancer Biol**, 15, n. 5, p. 378-386, Oct 2005.

KOLEINI, N.; KARDAMI, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Oncotarget**, 8, n. 28, p. 46663-46680, Jul 11 2017.

KRAMER, N.; WALZL, A.; UNGER, C.; ROSNER, M. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. **Mutat Res**, 752, n. 1, p. 10-24, Jan-Mar 2013.

KRATZ, J.; SPRACKLING, C.; FAVREAU, P.; KARIM, M. *et al.* Patient-derived colorectal cancer spheroids for single cell characterization of intratumor heterogeneity in response to EGFR inhibition. **Journal of Clinical Oncology**, 37, p. 569-569, 02/01 2019.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochem Pharmacol**, 60, n. 9, p. 1367-1379, Nov 1 2000.

KSIAZKIEWICZ, M.; GOTTFRIED, E.; KREUTZ, M.; MACK, M. *et al.* Importance of CCL2-CCR2A/2B signaling for monocyte migration into spheroids of breast cancer-derived fibroblasts. **Immunobiology**, 215, n. 9-10, p. 737-747, Sep-Oct 2010.

KUNJITHAPATHAM, R.; KARTHIKEYAN, S.; GESCHWIND, J. F.; KIESERMAN, E. *et al.* Reversal of anchorage-independent multicellular spheroid into a monolayer mimics a metastatic model. **Sci Rep**, 4, p. 6816, Oct 29 2014.

KUNZ-SCHUGHART, L. A.; FREYER, J. P.; HOFSTAEDTER, F.; EBNER, R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. **J Biomol Screen**, 9, n. 4, p. 273-285, Jun 2004.

KUNZ-SCHUGHART, L. A.; KREUTZ, M.; KNUECHEL, R. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. **Int J Exp Pathol**, 79, n. 1, p. 1-23, Feb 1998.

KUPERWASSER, C.; CHAVARRIA, T.; WU, M.; MAGRANE, G. *et al.* Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 14, p. 4966-4971, Apr 6 2004.

LABARBERA, D. V.; REID, B. G.; YOO, B. H. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, 7, n. 9, p. 819-830, Sep 2012.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, 168, n. 4, p. 670-691, Feb 9 2017.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 3, p. 178-196, Mar 2014.

LANGLEY, R. R.; FIDLER, I. J. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. **Int J Cancer**, 128, n. 11, p. 2527-2535, Jun 1 2011.

LEACH, D. R.; KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. **Science**, 271, n. 5256, p. 1734-1736, Mar 22 1996.

LEE, E.; SONG, H. G.; CHEN, C. S. Biomimetic on-a-chip platforms for studying cancer metastasis. **Curr Opin Chem Eng**, 11, p. 20-27, Feb 2016.

LEE, E. Y.; LEE, W. H.; KAETZEL, C. S.; PARRY, G. *et al.* Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82, n. 5, p. 1419-1423, Mar 1985.

LEE, J. I.; CHOI, D. Y.; CHUNG, H. S.; SEO, H. G. *et al.* beta-lapachone induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells by modulation of Bcl-2 family and activation of caspases. **Exp Oncol**, 28, n. 1, p. 30-35, Mar 2006.

LEE, J. M.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; LEE, N.; PARSANIAN, L. C. *et al.* A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. **Lab Invest**, 93, n. 5, p. 528-542, May 2013.

LEHUEDE, C.; DUPUY, F.; RABINOVITCH, R.; JONES, R. G. *et al.* Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. **Cancer Res**, 76, n. 18, p. 5201-5208, Sep 15 2016.

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **J Biol Chem**, 268, n. 30, p. 22463-22468, Oct 25 1993.

LI, C. J.; WANG, C.; PARDEE, A. B. Induction of apoptosis by beta-lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Res**, 55, n. 17, p. 3712-3715, Sep 1 1995.

LI, M. L.; AGGELER, J.; FARSON, D. A.; HATIER, C. *et al.* Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84, n. 1, p. 136-140, 1987.

LI, Q.; MA, Z.; LIU, Y.; KAN, X. *et al.* Low doses of paclitaxel enhance liver metastasis of breast cancer cells in the mouse model. **Febs j**, 283, n. 15, p. 2836-2852, Aug 2016.

LI, Q. Q.; XU, J. D.; WANG, W. J.; CAO, X. X. *et al.* Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. **Clin Cancer Res**, 15, n. 8, p. 2657-2665, Apr 15 2009.

LI, X.; LU, Y.; LIANG, K.; LIU, B. *et al.* Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, 7, n. 5, p. R589, 2005/05/24 2005.

LI, Z.; ZHANG, Y.; JIN, T.; MEN, J. *et al.* NQO1 protein expression predicts poor prognosis of non-small cell lung cancers. **BMC Cancer**, 15, p. 207, Mar 31 2015.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnol J**, 3, n. 9-10, p. 1172-1184, Oct 2008.

LIU, C. L.; CHEN, M. J.; LIN, J. C.; LIN, C. H. *et al.* Doxorubicin Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells through the Upregulation of the RhoA/MLC Pathway. **J Breast Cancer**, 22, n. 2, p. 185-195, Jun 2019.

LIU, X.; FAN, D. The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. **Curr Pharm Des**, 21, n. 10, p. 1279-1291, 2015.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. **J Cancer Res Clin Oncol**, 141, n. 5, p. 951-959, May 2015.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. **BMC Cancer**, 18, n. 1, p. 41, Jan 6 2018.

LV, D.; HU, Z.; LU, L.; LU, H. *et al.* Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. **Oncol Lett**, 14, n. 6, p. 6999-7010, Dec 2017.

MADAJEWSKI, B.; BOATMAN, M. A.; CHAKRABARTI, G.; BOOTHMAN, D. A. *et al.* Depleting Tumor-NQO1 Potentiates Anoikis and Inhibits Growth of NSCLC. **Mol Cancer Res**, 14, n. 1, p. 14-25, Jan 2016.

MADHUSUDAN, S.; FOSTER, M.; MUTHURAMALINGAM, S. R.; BRAYBROOKE, J. P. *et al.* A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. **Clin Cancer Res**, 10, n. 19, p. 6528-6534, Oct 1 2004.

MADSEN, C. D.; SAHAI, E. Cancer dissemination--lessons from leukocytes. **Dev Cell**, 19, n. 1, p. 13-26, Jul 20 2010.

MARJANOVIC, N. D.; WEINBERG, R. A.; CHAFFER, C. L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. **Clin Chem**, 59, n. 1, p. 168-179, Jan 2013.

MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. **Anticancer Agents Med Chem**, 10, n. 10, p. 753-768, Dec 2010.

MCSHERRY, E. A.; DONATELLO, S.; HOPKINS, A. M.; MCDONNELL, S. Molecular basis of invasion in breast cancer. **Cell Mol Life Sci**, 64, n. 24, p. 3201-3218, Dec 2007.

MEHTA, G.; HSIAO, A. Y.; INGRAM, M.; LUKER, G. D. *et al.* Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **J Control Release**, 164, n. 2, p. 192-204, Dec 10 2012.

MENDES, D.; ALVES, C.; AFONSO, N.; CARDOSO, F. *et al.* The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer – a systematic review. **Breast Cancer Research**, 17, n. 1, 2015.

MIRAB, F.; KANG, Y. J.; MAJD, S. Preparation and characterization of size-controlled glioma spheroids using agarose hydrogel microwells. **PLoS One**, 14, n. 1, p. e0211078, 2019.

MOREL, A. P.; LIEVRE, M.; THOMAS, C.; HINKAL, G. *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. **PLoS One**, 3, n. 8, p. e2888, Aug 6 2008.

MORENO-BUENO, G.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. **Oncogene**, 27, n. 55, p. 6958-6969, Nov 24 2008.

MOSAAD, E.; CHAMBERS, K.; FUTREGA, K.; CLEMENTS, J. *et al.* The Microwell-mesh: A high-throughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform. **Scientific Reports**, 8, 12/01 2018.

MS. **Câncer de mama: sintomas, tratamentos, causas e prevenção.** 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-mama>.

MS/INCA. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil.** 2015.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410, n. 6824, p. 50-56, Mar 1 2001.

NAGI, C.; GUTTMAN, M.; JAFFER, S.; QIAO, R. *et al.* N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. **Breast Cancer Res Treat**, 94, n. 3, p. 225-235, Dec 2005.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacol Ther**, 163, p. 94-108, Jul 2016.

NUNES, A. S.; BARROS, A. S.; COSTA, E. C.; MOREIRA, A. F. *et al.* 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, 116, n. 1, p. 206-226, 2019.

OMIDI, Y.; BARAR, J. Targeting tumor microenvironment: crossing tumor interstitial fluid by multifunctional nanomedicines. **Bioimpacts**, 4, n. 2, p. 55-67, 2014.

ONCOGUIA. **Sinais e Sintomas do Câncer de Mama.** 2017a. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-mama/1383/34/>.

ONCOGUIA. **Tipos de câncer de mama.** 2017b. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer-de-mama/1382/34/>.

ONCUL, S.; ERCAN, A. Discrimination of the Effects of Doxorubicin on Two Different Breast Cancer Cell Lines on Account of Multidrug Resistance and Apoptosis. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 79, 01/01 2017.

OXMANN, D.; HELD-FEINDT, J.; STARK, A. M.; HATTERMANN, K. *et al.* Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. **Oncogene**, 27, n. 25, p. 3567-3575, Jun 5 2008.

PAGET, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. **The Lancet**, 133, n. 3421, p. 571-573, 1889/03/23/ 1889.

PAOLI, P.; GIANNONI, E.; CHIARUGI, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochim Biophys Acta**, 1833, n. 12, p. 3481-3498, Dec 2013.

PARK, E. J.; MIN, K. J.; LEE, T. J.; YOO, Y. H. *et al.* beta-Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. **Cell Death Dis**, 5, p. e1230, May 15 2014.

PATANAPHAN, V.; SALAZAR, O. M.; RISCO, R. Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis. **South Med J**, 81, n. 9, p. 1109-1112, Sep 1988.

PAULLIN, T.; POWELL, C.; MENZIE, C.; HILL, R. *et al.* Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses. **PLoS One**, 12, n. 8, p. e0182930, 2017.

PEINADO, H.; MARIN, F.; CUBILLO, E.; STARK, H. J. *et al.* Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. **J Cell Sci**, 117, n. Pt 13, p. 2827-2839, Jun 1 2004.

PILCO-FERRETO, N.; CALAF, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **Int J Oncol**, 49, n. 2, p. 753-762, Aug 2016.

- PINK, J. J.; WUERZBERGER-DAVIS, S.; TAGLIARINO, C.; PLANCHON, S. M. *et al.* Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during beta-lapachone-mediated apoptosis. **Exp Cell Res**, 255, n. 2, p. 144-155, Mar 15 2000.
- PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W. G. *et al.* beta-Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Exp Cell Res**, 267, n. 1, p. 95-106, Jul 1 2001.
- QIAN, C. N.; MEI, Y.; ZHANG, J. Cancer metastasis: issues and challenges. **Chin J Cancer**, 36, n. 1, p. 38, Apr 3 2017.
- RADISKY, E. S.; RADISKY, D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 15, n. 2, p. 201-212, Jun 2010.
- RANKIN, E. B.; GIACCIA, A. J. Hypoxic control of metastasis. **Science**, 352, n. 6282, p. 175-180, Apr 8 2016.
- REDDY, S. B.; WILLIAMSON, S. K. Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells. **Expert Opin Investig Drugs**, 18, n. 1, p. 77-87, Jan 2009.
- RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **J Cancer Res Ther**, 10, n. 4, p. 853-858, Oct-Dec 2014.
- ROSSI, M. I.; BARROS, A. P.; BAPTISTA, L. S.; GARZONI, L. R. *et al.* Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration. **Braz J Med Biol Res**, 38, n. 10, p. 1455-1462, Oct 2005.
- RUAN, K.; SONG, G.; OUYANG, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. **J Cell Biochem**, 107, n. 6, p. 1053-1062, Aug 15 2009.
- SAKAMOTO, S.; KYPRIANOU, N. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. **Mol Aspects Med**, 31, n. 2, p. 205-214, Apr 2010.

SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci**, 68, n. 18, p. 3033-3046, Sep 2011.

SCHMID, P.; ADAMS, S.; RUGO, H. S.; SCHNEEWEISS, A. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. **N Engl J Med**, 379, n. 22, p. 2108-2121, Nov 29 2018.

SERRA, K. P.; RAMALHO, S.; TORRESAN, R.; VASSALLO, J. *et al.* [The new classification of breast cancers: finding the luminal A]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 36, n. 12, p. 575-580, Dec 2014.

SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. **Crit Rev Oncog**, 18, n. 1-2, p. 43-73, 2013.

SHABO, I.; STAL, O.; OLSSON, H.; DORE, S. *et al.* Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. **Int J Cancer**, 123, n. 4, p. 780-786, Aug 15 2008.

SIEGEL, D.; ROSS, D. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. **Free Radic Biol Med**, 29, n. 3-4, p. 246-253, Aug 2000.

SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. **Biochemical Pharmacology**, 83, n. 8, p. 1033-1040, 2012.

SIM/MS; INCA. **Atlas de Mortalidade por Câncer**. 2017. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>.

SLEEBOOM, J. J. F.; ESLAMI AMIRABADI, H.; NAIR, P.; SAHLGREN, C. M. *et al.* Metastasis in context: modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. **Dis Model Mech**, 11, n. 3, Mar 16 2018.

SMITH, L.; WATSON, M. B.; KANE, S. L.; DREW, P. J. *et al.* The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. **Molecular Cancer Therapeutics**, 5, n. 8, p. 2115, 2006.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nat Rev Cancer**, 16, n. 4, p. 201-218, Apr 2016.

STREULI, C. H.; BAILEY, N.; BISSELL, M. J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. **J Cell Biol**, 115, n. 5, p. 1383-1395, Dec 1991.

SWAIN, S. M.; KIM, S. B.; CORTES, J.; RO, J. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. **Lancet Oncol**, 14, n. 6, p. 461-471, May 2013.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J Pharm Pharmacol**, 65, n. 2, p. 157-170, Feb 2013.

TALKENBERGER, K.; CAVALCANTI-ADAM, E. A.; VOSS-BOHME, A.; DEUTSCH, A. Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 9237, Aug 23 2017.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, 2, n. 6, p. 442-454, Jun 2002.

THORN, C.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T. *et al.* Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, 21, p. 440–446, 07/01 2011.

TIMMINS, N. E.; HARDING, F. J.; SMART, C.; BROWN, M. A. *et al.* Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. **Cell Tissue Res**, 320, n. 1, p. 207-210, Apr 2005.

TSAI, H. F.; TRUBELJA, A.; SHEN, A. Q.; BAO, G. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment. **J R Soc Interface**, 14, n. 131, Jun 2017.

TSENG, H.; GAGE, J. A.; SHEN, T.; HAISLER, W. L. *et al.* A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. **Sci Rep**, 5, p. 13987, Sep 14 2015.

TURLEY, E. A.; VEISEH, M.; RADISKY, D. C.; BISSELL, M. J. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? **Nat Clin Pract Oncol**, 5, n. 5, p. 280-290, May 2008.

UICC, I. U. A. C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 2009.

VAZQUEZ, S. M.; MLADOVAN, A.; GARBOVESKY, C.; BALDI, A. *et al.* Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. **J Cell Physiol**, 199, n. 3, p. 460-469, Jun 2004.

VESUNA, F.; VAN DIEST, P.; CHEN, J. H.; RAMAN, V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 367, n. 2, p. 235-241, Mar 7 2008.

VIDI, P. A.; BISSELL, M. J.; LELIEVRE, S. A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. **Methods Mol Biol**, 945, p. 193-219, 2013.

VINCI, M.; BOX, C.; ECCLES, S. A. Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. **J Vis Exp**, n. 99, p. e52686, May 1 2015.

VINCI, M.; GOWAN, S.; BOXALL, F.; PATTERSON, L. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC biology**, 10, p. 29, 03/22 2012.

VON GISE, A.; PU, W. T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. **Circ Res**, 110, n. 12, p. 1628-1645, Jun 8 2012.

VYAS, D.; LAPUT, G.; VYAS, A. K. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. **Onco Targets Ther**, 7, p. 1015-1023, 2014.

WANG, F.; HANSEN, R. K.; RADISKY, D.; YONEDA, T. *et al.* Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. **J Natl Cancer Inst**, 94, n. 19, p. 1494-1503, Oct 2 2002.

WANG, F. T.; SUN, W.; ZHANG, J. T.; FAN, Y. Z. Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer. **Oncol Lett**, 17, n. 3, p. 3055-3065, Mar 2019.

WANG, R.; LV, Q.; MENG, W.; TAN, Q. *et al.* Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. **J Thorac Dis**, 6, n. 6, p. 829-837, Jun 2014.

WANG, Y.; MIRZA, S.; WU, S.; ZENG, J. *et al.* 3D hydrogel breast cancer models for studying the effects of hypoxia on epithelial to mesenchymal transition. **Oncotarget**, 9, 08/14 2018.

WANG, Y.; ZHOU, B. P. Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis. **Cancer Hallm**, 1, n. 1, p. 38-49, Mar 2013.

WEBER, C. E.; LI, N. Y.; WAI, P. Y.; KUO, P. C. Epithelial-mesenchymal transition, TGF-beta, and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. **J Burn Care Res**, 33, n. 3, p. 311-318, May-Jun 2012.

WEIGELT, B.; BISSELL, M. J. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. **Semin Cancer Biol**, 18, n. 5, p. 311-321, Oct 2008.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat Rev Cancer**, 5, n. 8, p. 591-602, Aug 2005.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, 17, n. 1, p. 1-15, Jan 2015.

WERUTSKY, G.; NUNES, P.; BARRIOS, C. Locally advanced breast cancer in Brazil: current status and future perspectives. **ecancermedicalsecience**, 13, 2019.

WHATLEY, B. R.; LI, X.; ZHANG, N.; WEN, X. Magnetic-directed patterning of cell spheroids. **J Biomed Mater Res A**, 102, n. 5, p. 1537-1547, May 2014.

WHO. **Early diagnosis and screening - Breast cancer**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.

WINER, A.; ADAMS, S.; MIGNATTI, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. **Mol Cancer Ther**, 17, n. 6, p. 1147-1155, Jun 2018.

WOO, H. J.; CHOI, Y. H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **Int J Oncol**, 26, n. 4, p. 1017-1023, Apr 2005.

WOO, H. J.; PARK, K. Y.; RHU, C. H.; LEE, W. H. *et al.* Beta-lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **J Med Food**, 9, n. 2, p. 161-168, Summer 2006.

WU, G.; LU, J.-J.; GUO, J.-J.; HUANG, M. *et al.* Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells. **Pharmacological reports : PR**, 65, p. 453-459, 03/01 2013.

WUERZBERGER, S. M.; PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; BYERS, K. L. *et al.* Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. **Cancer Res**, 58, n. 9, p. 1876-1885, May 1 1998.

XU, H.; LIU, W.; ZHANG, X. Z.; HOU, L. *et al.* [Development of three-dimensional breast cancer cell culture drug resistance model]. **Sheng Li Xue Bao**, 68, n. 2, p. 179-184, Apr 25 2016.

XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnol Adv**, 32, n. 7, p. 1256-1268, Nov 15 2014.

YANG, R. Y.; KIZER, D.; WU, H.; VOLCKOVA, E. *et al.* Synthetic methods for the preparation of ARQ 501 (beta-Lapachone) human blood metabolites. **Bioorg Med Chem**, 16, n. 10, p. 5635-5643, May 15 2008.

YANG, Y.; ZHANG, Y.; WU, Q.; CUI, X. *et al.* Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. **J Exp Clin Cancer Res**, 33, p. 14, Feb 5 2014.

YANG, Y.; ZHOU, X.; XU, M.; PIAO, J. *et al.* beta-lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 2681, Jun 2 2017.

YANG, Y.; ZHU, G.; DONG, B.; PIAO, J. *et al.* The NQO1/PKLR axis promotes lymph node metastasis and breast cancer progression by modulating glycolytic reprogramming. **Cancer Lett**, 453, p. 170-183, Jul 1 2019.

YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World J Clin Oncol**, 5, n. 3, p. 412-424, Aug 10 2014.

YILDIZ-OZTURK, E.; GULCE-IZ, S.; ANIL, M.; YESIL-CELIK TAS, O. Cytotoxic responses of carnosic acid and doxorubicin on breast cancer cells in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture. **Cytotechnology**, 69, n. 2, p. 337-347, Apr 2017.

YILMAZER, A. Evaluation of cancer stemness in breast cancer and glioblastoma spheroids in vitro. **3 Biotech**, 8, n. 9, p. 390, Sep 2018.

YIP, C.; BHOO-PATHY, N.; DANIEL, J.; FOO, Y. *et al.* Roles of Ki67 in Breast Cancer - Important for Management? **Asian Pac J Cancer Prev**, 17, n. 3, p. 1077-1082, 2016.

YOSHIDA, K.; SOLDATI, T. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. **J Cell Sci**, 119, n. Pt 18, p. 3833-3844, Sep 15 2006.

YU, H. Y.; KIM, S. O.; JIN, C. Y.; KIM, G. Y. *et al.* beta-lapachone-Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma AGS Cells Is Caspase-Dependent and Regulated by the PI3K/Akt Pathway. **Biomol Ther (Seoul)**, 22, n. 3, p. 184-192, May 2014.

ZHANG, F.; QI, X.; WANG, X.; WEI, D. *et al.* Structural basis of the therapeutic anti-PD-L1 antibody atezolizumab. **Oncotarget**, 8, n. 52, p. 90215-90224, Oct 27 2017.

ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Front Med**, 12, n. 4, p. 361-373, Aug 2018.

ZHANG, Z.; WANG, H.; DING, Q.; XING, Y. *et al.* Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer. **PLoS One**, 13, n. 3, p. e0194016, 2018.

ZHAO, M.; DING, X. F.; SHEN, J. Y.; ZHANG, X. P. *et al.* Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinical practice. **J Zhejiang Univ Sci B**, 18, n. 1, p. 15-26, Jan. 2017.

ZHONG, Z. F.; TAN, W.; TIAN, K.; YU, H. *et al.* Combined effects of furanodiene and doxorubicin on the migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. **Oncol Rep**, 37, n. 4, p. 2016-2024, Apr 2017.

ZOLLO, M.; DI DATO, V.; SPANO, D.; DE MARTINO, D. *et al.* Targeting monocyte chemotactic protein-1 synthesis with bindarit induces tumor regression in prostate and breast cancer animal models. **Clin Exp Metastasis**, 29, n. 6, p. 585-601, Aug 2012.