

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

BÁRBARA AVELAR FERREIRA BARROS

**ANÁLISE FENOTÍPICA DAS VIAS DE PLURIPOTÊNCIA, TRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESENQUIMAL E FERROPTOSE EM RESPOSTA À
DOXORRUBICINA EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO ENRIQUECIDO DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER**

BELO HORIZONTE

2024

BÁRBARA AVELAR FERREIRA BARROS

**ANÁLISE FENOTÍPICA DAS VIAS DE PLURIPOTÊNCIA, TRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESENQUIMAL E FERROPTOSE EM RESPOSTA À
DOXORRUBICINA EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO ENRIQUECIDO DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Minas Gerais
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Dra. Luciana Maria Silva Lopes

Coorientador:

Dr. Fábio Ribeiro Queiroz

BELO HORIZONTE

2024

- 043 Barros, Bárbara Avelar Ferreira.
Análise fenotípica das vias de pluripotência, transição epitélio-mesenquimal e ferroptose em resposta à doxorrubicina em modelo tridimensional de câncer de mama triplo-negativo enriquecido de células-tronco do câncer [manuscrito] / Bárbara Avelar Ferreira Barros. – 2024.
102 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Dra. Luciana Maria Silva Lopes. Coorientador: Dr. Fábio Ribeiro Queiroz.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.
1. Genética. 2. Neoplasias de Mama Triplo Negativas. 3. Células-Tronco Neoplásicas. 4. Células-Tronco Pluripotentes. I. Lopes, Luciana Maria Silva. II. Queiroz, Fábio Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUINA

BÁRBARA AVELAR FERREIRA BARROS

Às dez horas do dia **15 de outubro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Análise Fenotípica Das Vias De Pluripotência, Transição Epitélio-Mesenquimal e Ferroptose Em Resposta à Doxorrubicina Em Modelo Tridimensional De Câncer De Mama Triplo-Negativo Enriquecido De Células Tronco Do Câncer**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Luciana Maria Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Luciana Maria Silva	Fundação Ezequiel Dias	APROVADA
Dr. Fábio Ribeiro Queiroz	Instituto Mário Penna	APROVADA
Dra. Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	APROVADA
Dra. Pamela Del Carmen Mancha Agresti	Instituto Mario Penna	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de outubro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Dr. Luciana Maria Silva - Orientador

Dr. Fábio Ribeiro Queiroz - Coorientador

Dra. Pamela Del Carmen Mancha Agresti



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Ribeiro Queiroz, Usuário Externo**, em 16/10/2024, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 16/10/2024, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 16/10/2024, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pamela Del Carmen Mancha Agresti, Usuário Externo**, em 31/10/2024, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3634923** e o código CRC **83469D58**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Análise Fenotípica Das Vias De Pluripotência, Transição Eritélio-Mesénquimal e
Ferroptose Em Resposta à Doxorubicina Em Modelo Tridimensional De Câncer De Mama
Triplo-Negativo Enriquecido De Células Tronco Do Câncer"**

Bárbara Avelar Ferreira Barros

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Pamela Del Carmen Mancha Agresti
Instituto Mario Penna

Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG

Prof. Luciana Maria Silva - Orientador
Fundação Ezequiel Dias

Prof. Fábio Ribeiro Queiroz - Coorientador
Instituto Mário Penna

Belo Horizonte, 15 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Ribeiro Queiroz, Usuário Externo**, em 16/10/2024, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 16/10/2024, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



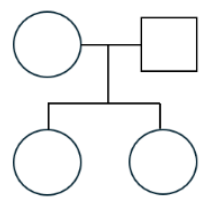
Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 16/10/2024, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pamela Del Carmen Mancha Agresti, Usuário Externo**, em 31/10/2024, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3634945 e o código CRC 86BF0F10.



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe e meu pai, que me apoiaram durante toda a minha trajetória acadêmica, mesmo quando nem mesmo eu sabia onde ela levaria. Agradeço principalmente à minha irmã mais velha, que além de um pilar na minha vida também é um compasso moral, e sei que sem ela não estaria aqui hoje.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Luciana, a quem sempre admirei e nunca imaginei que me aceitaria em seu grupo de estudo. Agradeço a paciência ao me guiar pelos meus erros sem perder o otimismo, e aguentar meus surtos sem me puxar pelos cabelos e agradeço por acreditar mais em mim do que eu acredito em mim mesma. Da mesma forma, agradeço ao meu coorientador Dr. Fábio, com sua gentileza e paciência imensurável. Admiro sua inteligência, didática e aprendi demais na sua presença. A oportunidade que me foi estendida por eles e o carinho pelo qual eles me guiaram durante minha pesquisa foram essenciais para a pessoa que estou me tornando, e eu nunca poderei retribuí-los por tudo o que me fizeram.

Agradeço aos alunos e servidores do SBC, que me receberam com carinho e me ajudaram em todos os passos ao longo do caminho. Agradeço à MOREIRA, Silvia, Frederico, Heloísa, Clau, Ângela e Janete. Agradeço à Júlia que sempre me fez rir, e a Raquel toda manhã me cumprimentava com uma alegria contagiante. Agradeço também à Nathy, Maria Eduarda, Luísa, Amanda, Rodrigo, Dani, Isabela, Lorryne, Victório, Pedro, Laís, Yasmin e Bárbara.

Bianca&Bianca fazem parte do SBC, no entanto, merecem seu próprio parágrafo. Sem elas meu projeto não teria passado do cultivo de células. As duas foram as primeiras pessoas com quem tive contato no laboratório, e não houve uma instância onde elas não estivessem dispostas a me ajudar, não só em questões técnicas como também emocionais, e serei eternamente grata. Lhes admiro muito.

Agradeço à equipe do Mario Penna, que me receberam de braços abertos, sempre foram muito gentis, solícitos e são pessoas que admiro imensamente. Agradeço à Pamela, Letícia, Ramon, Carolina, Nília, Kassiane, Gabrielle, Diogo, Bryan, Rafaela e Thália.

Agradeço às minhas maiores amigas, Ana e Luíza, que na maior parte do tempo não fazem ideia do que está acontecendo, mas me apoiam em tudo e estão sempre lá para rir das minhas tragédias para que eu não acabe chorando.

Agradeço à Anna Carolina e Frederico Soriani por me incentivarem a seguir o mestrado, e ao professor André Klein por adaptar sua classe aos meus problemas de saúde para que eu pudesse completar o semestre.

Da mesma forma, agradeço à minha equipe de médicos à graça que me permitiram e as adaptações que fizeram às suas agendas para que eu pudesse atender palestras, congressos e executar os experimentos possíveis, pois sabiam o quão importante esses eventos são para mim.

Por fim, agradeço à Luna, minha cadela, que apesar de não entender o que eu digo e muito menos se interessar pelo que tenho a dizer, ainda me escuta reclamar e discutir sobre meu projeto enquanto se deita no chão e suspira em tédio. Agradeço a atenção.

RESUMO

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é responsável por 10-20% de todos os diagnósticos de câncer de mama em todo o mundo. É considerado mais agressivo do que outras formas de tumores invasivos da mama devido ao seu fenótipo ER-/PR-/HER2-, que oferece aos pacientes poucas alternativas de tratamento além da quimioterapia e mau prognóstico. As células-tronco do câncer (CSCs) são uma pequena subpopulação do Microambiente Tumoral (EMT), envolvida na diferenciação, migração, auto-renovação e proliferação. São resistentes à indução de morte celular programada, como a ferroptose, pós-quimioterapia e tendem a se expandir após o tratamento, levando à recorrência, metástase e a um fenótipo tumoral mais agressivo. O objetivo desse projeto é compreender os mecanismos pelos quais as CSCs regulam processos biológicos e causam quimiorresistência, por meio do cultivo das linhagens de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 e Hs 578T em cultura tridimensional para a formação de esferoides tumorais enriquecidos com CSC, para análise da expressão gênica por qPCR de diferentes genes de vias de sinalização de pluripotência e morte celular por ferroptose, painel de transição epitélio-mesenquimal, morfologia por Microscopia laser Confocal, imunofenotipagem com os marcadores CD24, CD44 e CD146 e ensaio de peroxidação lipídica por Citometria de Fluxo. O tratamento utilizado para realização dos ensaios foi doxorrubicina IC₅₀ 118µM para MDA-MB-231 e 15,9µM para Hs 578T. Expressão gênica por RT-qPCR com alvos relacionados à pluripotência e desenvolvimento tumoral, ferroptose e autofagia como *OCT4*, *MYC*, *KLF4*, família AKT, *NCOA4*, *GPXR4*, *SLC7A11* e o complexo *ATG5-12* foi realizado em esferoides de MDA-MB 231 e Hs 578T tratados com Doxorrubicina (DOX) e aponta que existe modulação da pluripotência, aumento da progressão tumoral *in vitro* e sensibilização à ferroptose após o tratamento quimioterápico. Um ensaio com painel EMT realizado demonstra perfil mesenquimal dos esferoides após o tratamento com DOX, com regulação positiva de genes como *CDH2*, *COL1A2*, *COL3A1*, *GNG* e *MMPs*. A análise estrutural mostra a organização das células, a presença de CSCs por marcador CD44 e sua tendência de se agrupar nas regiões internas dos esferoides. Avaliação por citometria de fluxo mostra que o tratamento induz a peroxidação lipídica em esferoides da linhagem Hs 578T mas não em MDA-MB-231. Os resultados obtidos demonstram heterogeneidade entre as linhagens de um mesmo subtipo tumoral, e destacando a extrema importância das CSCs no controle e progressão do tumor. Levando em consideração os diversos mecanismos pelos quais o tumor pode evitar morte celular, se torna imprescindível o entendimento de diferentes subpopulações e seus respectivos papéis no microambiente tumoral para aprimoramento dos tratamentos já existentes e desenvolvimento de terapias alternativas.

Palavras-chave: câncer de mama triplo-negativo; células-tronco do câncer; pluripotência.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 10–20% of all breast cancer diagnoses worldwide. It is considered more aggressive than other forms of invasive breast cancer due to its ER-/PR-/HER2- phenotype, which offers patients few treatment alternatives other than chemotherapy and a poor prognosis. Cancer stem cells (CSCs) are a small subpopulation of the tumor microenvironment (TME) involved in differentiation, migration, self-renewal, and thriving. They are resistant to induction of programmed cell death, such as ferroptosis, post-chemotherapy and tend to expand after treatment, leading to recurrence, metastasis, and a more aggressive tumor phenotype. The objective of this project is to understand the mechanisms by which CSCs regulate biological processes and cause chemoresistance, through the cultivation of the triple negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 and Hs 578T in three-dimensional culture for the formation of tumor spheroids enriched with CSC, for analysis of gene expression by qPCR of different genes of pluripotency signaling pathways and cell death by ferroptosis, epithelial-mesenchymal transition panel, morphology by Confocal Laser Microscopy, immunophenotyping with CD24, CD44 and CD146 markers and lipid peroxidation assay by Flow Cytometry. The treatment used to perform the assays was doxorubicin IC₅₀ 118μM for MDA-MB-231 and 15.9μM for Hs 578T. Gene expression by RT-qPCR with targets related to pluripotency and tumor development, ferroptosis and autophagy such as *OCT4*, *MYC*, *KLF4*, *AKT* family, *NCOA4*, *GPXR4*, *SLC7A11* and the *ATG5-ATG12* complex was performed in MDA-MB 231 and Hs 578T spheroids treated with Doxorubicin (DOX) and indicates that there is modulation of pluripotency, increased tumor progression in vitro and sensitization to ferroptosis after chemotherapy treatment. An EMT panel assay performed demonstrates the mesenchymal profile of the spheroids after DOX treatment, with upregulation of genes such as *CDH2*, *COL1A2*, *COL3A1*, *GNG* and *MMPs*. Structural analysis shows the organization of the cells, the presence of CSCs by the CD44 marker and their tendency to cluster in the international regions of the spheroids. Flow cytometry evaluation shows that the treatment induces lipid peroxidation in spheroids of the Hs 578T cell line but not in MDA-MB-231. The results obtained demonstrate heterogeneity among cell lines of the same tumor subtype and highlight the extreme importance of CSCs in tumor control and progression. Considering the various mechanisms by which the tumor can avoid cell death, it is necessary to understand different subpopulations and their respective roles in the tumor microenvironment to improve existing treatments and develop alternative therapies.

Keywords: triple-negative breast cancer; cancer stem cells; pluripotency.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D - Bidimensional

3D – Tridimensional

AHNAK - Nucleoproteína AHNAK

AKT - Quinase Serina/Treonina AKT

AKT1 - Quinase serina/treonina AKT 1

AKT2 - Quinase serina/treonina AKT 2

AKT3 - Quinase serina/treonina AKT 3

ALDH - Aldeído desidrogenase

AMPK - Quinase de Proteína Ativada por AMP

ASIR - Taxa de acidente padronizada por idade

ATG12 - Proteína relacionada à autofagia 12

ATG5 - Proteína relacionada à autofagia 5

ATG7 - Proteína relacionada à autofagia 7

BC - Câncer de mama (breast cancer)

BCSCs - Células-tronco do câncer de mama

BMP1 - Proteína morfogenética óssea 1

BMP2 - Proteína morfogenética óssea 2

BMP7 - Proteína morfogenética óssea 7

BRCA - Proteína de susceptibilidade ao câncer de mama

CALD1 - Proteína de ligação ao calmodulina 1

CAMK2N1 - Inibidor da quinase dependente de cálcio/calmodulina II 1

CAV2 - Caveolina 2

CD - Grupamento de diferenciação (cluster of differentiation)

CD146 - Cluster de Diferenciação 146

CD24 - Cluster de Diferenciação 24

CD44 - Cluster de Diferenciação 44

CDH1 - Cadherina 1

CDH2 - Cadherina 2

cDNA - DNA complementar

COL1A2 - Cadeia alfa 2 do colágeno tipo I

COL3A1 - Cadeia alfa 1 do colágeno tipo III

COL5A2 - Cadeia alfa 2 do colágeno tipo V

CSCs - Células-tronco do câncer (*câncer stem-cell*)

CTNNB1 - Catenina beta 1

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DOX - Doxorubicina

DOX - Doxorubicina

DSC2 - Desmocolina 2

DSP - Desmoplakin

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT - Transição epitélio-mesenquimal

ERBB2 - Fator de crescimento epidérmico tipo 2 (*gene*)

ERBB3 - Receptor tirosina quinase ErbB3

ESC - Células-tronco embrionárias

ESR1 - Receptor de estrogênio 1

ESR1 - Receptor de estrógeno (*gene*)

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

FGFBP1 - Proteína de ligação do fator de crescimento fibroblástico 1

FII - Fator de coagulação II

FN1 - Fibronectina 1

FOXC2 - Fator de transcrição da família Forkhead C2

FZD7 - Receptor da família Frizzled 7

GNG11 - Subunidade gama 11 da proteína G

GPX4 - Glutathione peroxidase 4

GSC - Homeobox Goosecoid

GSK3B - Glicogênio sintase quinase 3 beta

HER-2 - Fator de crescimento epidérmico tipo 2 (proteína)

HMGB1 - Proteína de caixa de alta mobilidade 1

HSPB1 - Proteína de choque térmico beta 1

IARC - Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer)

IC - Concentração máxima que inibe 50% do crescimento celular (*Half maximal inhibitory concentration*)

IGFBP4 - Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina 4

IL1RN - Antagonista do receptor de interleucina 1

INCA - Instituto Nacional do Câncer

International)

ICD - Morte celular imunogênica (*immunogenic cell death*)

iPSCs - células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells*)

ITGAS - Subunidade alfa S da integrina

ITGAV - Subunidade alfa V da integrina

ITGB1 - Subunidade beta 1 da integrina

JAG1 - Ligante Notch canônico Jagged 1

KLF4 - Fator de transcrição KLF 4

KRT14 - Queratina 14

KRT19 - Queratina 19

KRT7 - Queratina 7

MAP1B - Fator de indução de apoptose mitocondrial 1B

MAPK - Quinase Proteica Ativada por Mitógenos

MET - Transição mesenquimal-epitelial

MMP2 - Metaloproteinase de matriz 2

MMP3 - Metaloproteinase de matriz 3

MMP9 - Metaloproteinase de matriz 9

MSN - Moesina

MST1R - Receptor do fator de estimulação de macrófagos 1

mTOR - Alvo Mecânico da Rapamicina

MYC - Proto-oncogene MYC

NANOG - Homeobox NANOG

NCOA - Coativador nuclear

NFE2L2 - Fator nuclear eritroide 2 como 2

NODAL - Nodal

NOTCH - Receptor Notch

NOTCH1 - Receptor Notch 1

NUDT3 - Nucleotídeo hidrolase 3

OCLN - Ocludina

PDGFRB - Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas

PGR - Receptor de progesterona

PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase

PLEK2 - Pleckstrina 2

POU5F1 - Homeobox POU 5F1

PPPDE2 - Domínio da proteína fosfatase 2

PTK2 - Quinase de tirosina 2

PTP4A1 - Fosfatase de tirosina 4A1

PUFA - Ácidos graxos polissaturados

RAB7A - Membro da família RAS *RAB7A*

RAC1 - GTPase pequena da família Rac 1

RGS2 - Regulador da sinalização da proteína G 2

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - espécies de oxigênio reativas

SERPINE1 - Inibidor da serina protease E1

SIP1 - Proteína interativa com Smad 1

SLC3A2 - Transportador de soluto da família 3 membro 2

SLC7A11 - Transportador de soluto da família 7 membro 11

SMAD2 - Membro da família SMAD 2

SNAI1 - Repressor transcricional da família Snail 1

SNAI2 - Repressor transcricional da família Snail 2

SNAI3 - Repressor transcricional da família Snail 3

SOX10 - Fator de transcrição da família SRY-box 10

SOX2 - Fator de transcrição da família SRY-box 2

SOX4 - Fator de transcrição da família SRY-box 4

SPARC - Proteína secretada ácida rica em cisteína

SPP1 - Proteína fosforilada secretada 1

STAT3 - Fator de transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

STEAP1 - Membro da família STEAP 1

TCF3 - Fator de célula T 3

TCF4 - Fator de célula T 4

TFPI2 - Inibidor da via do fator tecidual 2

TGFB1 - Fator de crescimento transformador beta 1

TGFB2 - Fator de crescimento transformador beta 2

TGFB3 - Fator de crescimento transformador beta 3

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta

TIMP1 - Inibidor da metaloproteinase de matriz 1

TMEFF1 - Proteína transmembrana com domínio EGF e dois domínios semelhantes a follistatina 1

TMEM132A - Proteína transmembrana 132A

TNBC - Câncer de mama triplo-negativo (Triple-negative breast cancer)

TNBC - Triple Negative Breast Câncer

TP53 - Proteína de tumor

TSPAN13 - Tetraspanina 13

TWIST1 - Fator de transcrição Twist 1

VCAN - Versicana

VIM - Vimentina

VPS13A - Homólogo VPS13A

WCRF - Fundo Mundial para Pesquisa em Câncer (World Cancer Research Fund)

WGA - Aglutinina do Germem de Trigo

WHO - Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

WNT11 - Membro da família Wnt 11

WNT5A - Membro da família Wnt 5A

WNT5B - Membro da família Wnt 5B

ZEB1 - Homeobox ZEB 1

ZEB2 - Homeobox ZEB 2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Hallmarks, ou “marcas registradas” do câncer.....	23
Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	24
Figura 3: Taxa de mortalidade do câncer entre o sexo feminino em 2022.....	24
Figura 4: Patogênese do câncer de mama.....	26
Figura 5: Classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama.....	27
Figura 6: Capacidade de auto-renovação e diferenciação das células-tronco.....	30
Figura 7: Vias Notch, Wnt, TGF- β e FGF e suas interações com os genes de pluripotência para auto-renovação e diferenciação:.....	33
Figura 8: Transição epitélio-mesenquimal	34
Figura 9: Regulação da via de ferroptose.....	37
Figura 10: Mecanismos de autofagia.....	38
Figura 11: Composição do microambiente tumoral do câncer de mama.....	42
Figura 12: Hs 578T (A) e MDA-MB-231 (B) em monocamada.....	44
Figura 13: Cultivos de esferoides das linhagens Hs 578T e MDA-MB-231 em suspensão.....	53
Figura 14: Progressão de crescimento dos esferoides de TNBC.....	54
Figura 15: Grau de interação dos alvos escolhidos para a qPCR demonstrado pelo software de interações proteicas, STRING.....	55
Figura 16: Expressão dos alvos de pluripotência em esferoides de Hs 578T.....	57
Figura 17: Expressão dos alvos de pluripotência em esferoides de MDA-MB-231.....	58
Figura 18: Expressão gênica relativa do perfil epitélio-mesenquimal de esferoides de Hs 578T.....	60
Figura 19: Expressão gênica relativa do perfil epitélio-mesenquimal de esferoides de MDA-MB-231.....	62
Figura 20: Grau de interação dos alvos escolhidos para a qPCR demonstrado pelo software de interações proteicas, STRING.....	63
Figura 21: Gráfico de expressão relativa dos genes de ferroptose e autofagia de esferoides de Hs 578T.....	64

Figura 22: Expressão relativa dos genes de ferroptose e autofagia de esferoides de MDA-MB-231.....	66
Figura 23: Fotomicrografia de esferoides de Hs 578T.....	71
Figura 24: Fotomicrografia de esferoides de Hs 578T antes e após tratamento com DOX.....	71
Figura 25: Fotomicrografia de células derivadas de esferoides de MDA-MB-231 antes e após tratamento com DOX.....	72
Figura 26: Análise estrutural dos esferoides de TNBC.....	73
Figura 27: Perfil fenotípico de pluripotência em células de TNBC considerando seu perfil diferencial de expressão.....	73
Figura 28: Perfil fenotípico de ferroptose em células de TNBC considerando seu perfil diferencial de expressão.....	74
Figura 29: Perfil fenotípico de EMT em células de TNBC considerando seu perfil diferencial de expressão.....	75
Figura 30: Populações de Hs 578T e MDA-MB-231 no ensaio de caracterização fenotípica por citometria de fluxo.....	87
Figura 31: Populações de Hs 578T e MDA-MB-231 no ensaio de peroxidação lipídica por citometria de fluxo.....	88
Figura 32: Apresentação de poster e publicação de artigo no 68º Congresso Nacional de Genética.....	89
Figura 33: Seleção para o Programa Internacional de Pesquisa em Células-Tronco da Escola de Ciências Avançadas de São Paulo.....	89
Figura 34: Publicação de resumo expandido no II Simpósio de Oncologia Clínico-Laboratorial.....	90
Figura 35: Apresentação de poster e publicação de resumo no Simpósio Internacional de Pesquisa em Células-Tronco promovido pela Sociedade Internacional em Pesquisas em Células-Tronco (ISSCR).....	90
Figura 36: Apresentação de poster e publicação de resumo no XXII Congresso Brasileiro de Biologia Celular.....	91
Figura 37: Apresentação de poster no 69º Congresso Internacional de Genética.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos subtipos tumorais.....	28
Tabela 2: Concentrações utilizadas na marcação para Microscopia.....	46
Tabela 3: Anticorpos e isotipos utilizados na marcação do ensaio de fenotipagem por citometria de fluxo.....	46
Tabela 4: Componentes utilizados no ensaio de peroxidação lipídica.....	47
Tabela 5: Volumes dos reagentes utilizados na síntese de cDNA.....	48
Tabela 6: Ciclagem da qPCR.....	49
Tabela 7: Genes e suas respectivas concentrações utilizados no ensaio de expressão relativa.....	49
Tabela 8: Genes e suas respectivas concentrações utilizados no ensaio de expressão relativa.....	51
Tabela 9: Desenho da placa e genes utilizados no ensaio de expressão relativa para definição do perfil epitélio-mesenquimal dos esferoides.....	52
Tabela 10: Ensaio de citometria de fluxo para caracterização fenotípica da % das subpopulações celulares presentes nos esferoides da linhagem Hs 578T e MDA-MB-231.....	68
Tabela 11: Citometria de fluxo para avaliação de peroxidação lipídica.....	70
Tabela 12: Média de área dos esferoides de TNBC.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Câncer.....	22
1.2 Câncer de mama.....	24
1.2 Câncer de mama triplo-negativo	27
1.3 Células-tronco do câncer	30
1.3.1 Pluripotência.....	31
1.3.2 Transição epitélio-mesenquimal.....	34
1.3.3 Ferroptose	36
1.3.4 Autofagia.....	38
1.4 Doxorrubicina.....	40
1.5 Modelo tridimensional in vitro	41
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVO GERAL	43
2.1 Objetivos específicos	43
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 Cultivo celular	44
3.1.1 Cultivo celular em monocamada.....	44
3.1.2 Cultivo celular tridimensional.....	45
3.2 Tratamento com Doxorrubicina.....	45
3.3 Microscopia à Laser Confocal	45
3.4 Citometria de Fluxo	46
3.4.1 Fenotipagem	46
3.4.2 Peroxidação Lipídica.....	47
3.5 Biologia Molecular	47
3.5.1 Análise de alvos de Pluripotência.....	49
3.5.2 Análise de alvos de Ferroptose	51
3.5.3 Análise dos alvos de Transição Epitélio-mesenquimal.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Cultivo celular.....	53
4.2 Expressão gênica relativa	54
4.2.1 Pluripotência.....	54
4.2.2 Transição epitélio-mesenquimal.....	58

4.2.3 Ferroptose	63
4.3 Citometria de Fluxo.....	67
4.3.1 Fenotipagem	67
4.3.2 Peroxidação Lipídica	69
4.4 Microscopia à laser confocal	70
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6 CONCLUSÃO	75
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS	87
1 Citometria de fluxo.....	87
1.1 Caracterização fenotípica.....	87
1.2 Peroxidação lipídica.....	88
2 Divulgação científica	88
2.1 Certificados	88
2.2 Artigo publicado:.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é um grupo complexo e heterogêneo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células e disseminação para outras partes do corpo. Ele surge de mutações genéticas que interrompem os processos celulares normais, levando a transformações malignas. Globalmente, o câncer representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com a Organização Mundial da Saúde estimando que quase 10 milhões de mortes ocorreram devido ao câncer em 2020 (SUNG *et al.* 2021). Os tipos mais comuns incluem câncer de mama, pulmão, colorretal e próstata, cada um com comportamentos biológicos e estratégias de tratamento distintos.

A patogênese do câncer envolve múltiplos fatores, incluindo predisposições genéticas, influências ambientais e escolhas de estilo de vida. Por exemplo, o uso de tabaco, o consumo excessivo de álcool e a obesidade são fatores de risco bem estabelecidos que contribuem para o desenvolvimento do câncer (BOFFETTA & STRAIF. 2009). Além disso, a interação entre fatores genéticos e epigenéticos influencia significativamente a tumorigênese, tornando o câncer uma doença altamente individualizada (FEARON & VOGELSTEIN, 2013).

O conceito de marcas registradas do câncer foi proposto pela primeira vez por Douglas Hanahan e Robert Weinberg em 2000, e consistem nas principais características que permitem que as células tumorais se proliferem de forma desordenada e mantenham sua sobrevivência no organismo. Essas características descrevem as capacidades biológicas essenciais que as células adquirem durante o desenvolvimento em várias etapas dos tumores humanos, delineando uma estrutura para entender como o câncer surge e progride, como a resistência à morte celular, evasão imune, senescência, capacidades invasivas e metastáticas e sustentação do sinal de proliferação (Figura 1).

Figura 1: Hallmarks, ou “marcas registradas” do câncer, introduzido por Hanahan em 2022



Fonte: adaptado de HANAHAN *et al.* (2022).

No Brasil, houve um aumento expressivo de 20% dos casos de câncer na última década, com previsão de 30 milhões de diagnósticos até 2030. Em sua estimativa para até 2025, o INCA (2022) prevê que os cânceres de mama e próstata representam aproximadamente 15,0% dos novos casos em mulheres e homens, respectivamente, seguidos de câncer de cólon e reto (9,4%), traqueia, brônquio e pulmão (6,7%), intestino (4,4%) e colo do útero (3,5%) (Figura 2). Alguns dos motivos para esse aumento é o aumento da expectativa de vida da população. A melhora dos métodos diagnósticos e maior acesso à saúde pela população também aumenta o número de casos detectados. Outros fatores como o tabagismo, consumo excessivo de álcool, alimentos ultraprocessados e sedentarismo, todos que contribuem para maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias.

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

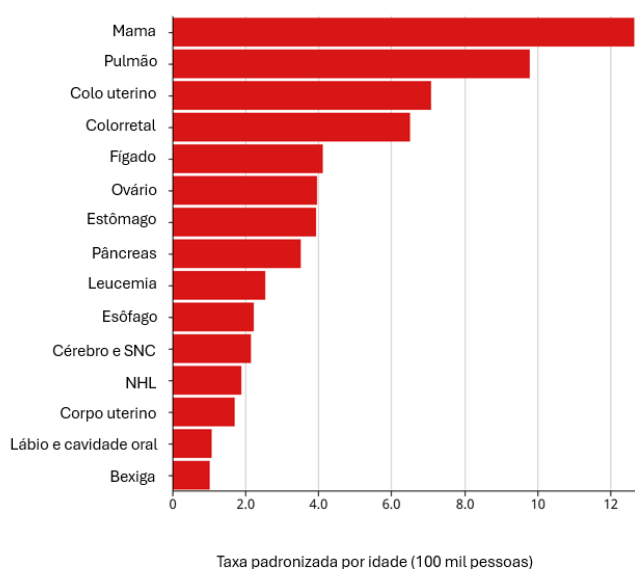
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2022).

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é um dos cânceres mais prevalentes globalmente e o de maior mortalidade dentre o sexo feminino (Figura 3), impactando significativamente a saúde das mulheres. De acordo com o Observatório Global do Câncer, plataforma de rastreamento do WHO, o câncer de mama foi responsável por aproximadamente 2,3 milhões de novos casos e 685.000 mortes em todo o mundo em 2020, tornando-o o câncer mais comumente diagnosticado e a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer entre mulheres.

Figura 3: Taxa de mortalidade do câncer entre o sexo feminino em 2022:



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2024

Taxa padronizada por idade (100 mil pessoas)

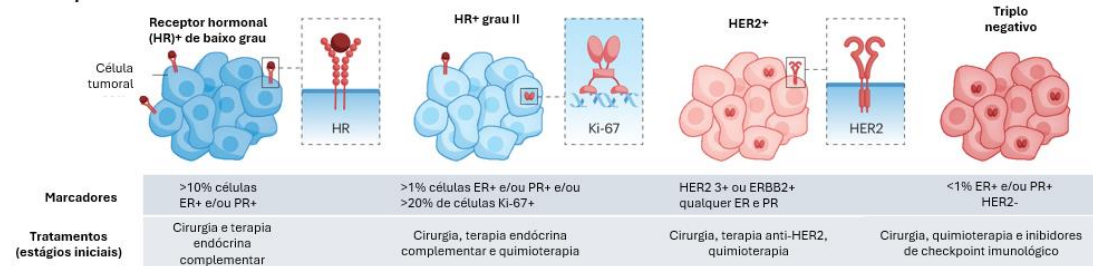
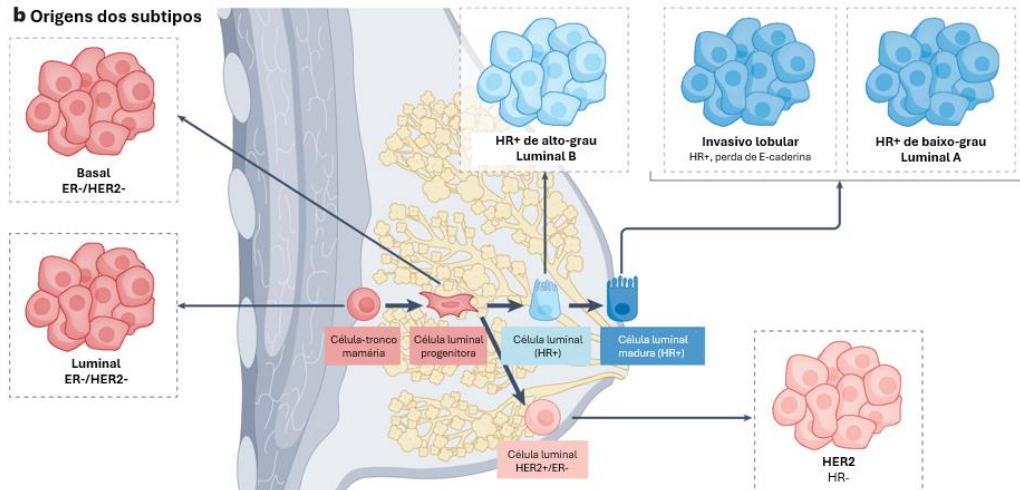
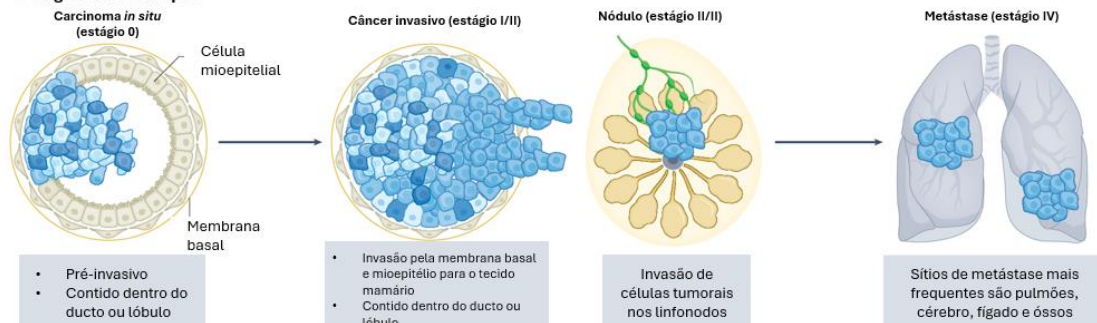
International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Fonte: WHO (2022).

A incidência de câncer de mama varia significativamente por região, com taxas mais altas observadas em países de alta renda em comparação com países de baixa e média renda. Por exemplo, a taxa de incidência padronizada por idade (ASIR) na América do Norte é de cerca de 89 por 100.000 mulheres, enquanto na África é de aproximadamente 25 por 100.000 (BRAY *et al.* 2018). Além disso, fatores como status socioeconômico, acesso a cuidados de saúde e escolhas de estilo de vida contribuem para essas discrepâncias (DAVIS *et al.* 2019; SUNG *et al.* 2021).

A idade é um fator de risco crítico, com a maioria dos casos diagnosticados em mulheres com 50 anos ou mais. No entanto, uma tendência crescente de diagnósticos entre mulheres mais jovens foi observada em várias regiões, levantando preocupações sobre o câncer de mama de início precoce (ANDERSON *et al.* 2019). Além disso, as taxas de sobrevivência também diferem, com taxas de sobrevivência de cinco anos excedendo 90% em países de alta renda, em comparação com taxas mais baixas em regiões menos desenvolvidas (GORDON *et al.* 2020).

Sendo uma doença multifatorial causada por aspectos genéticos, endócrinos, ambientais, reprodutivos e idade avançada, o câncer de mama (Figura 4) é subclassificado em quatro categorias de acordo com sua expressão imuno-histoquímica de receptores de hormônios: o positivo para receptores de estrogênio (ER+), positivo para receptores de progesterona (PR+), positivo para receptores do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2+) e o negativo para os três tipos de receptores, conhecido como triplo-negativo (TNBC).

Figura 4: Classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama.**a Subtipos de câncer de mama****b Origens dos subtipos****c Origens dos subtipos**

Fonte: adaptado de HARRIS *et al.* (2024).

A expressão desses receptores é utilizada como alvo de terapias alternativas e marcadores de diagnóstico e prognóstico, além de estarem relacionados à maior sobrevida e menor taxa de recorrência (ORRANTIA-BORUNDA *et al.* 2022), o que torna o câncer de mama triplo-negativo um subtipo mais agressivo da doença, apresentando prognóstico desfavorável, maior taxa de recorrência e mortalidade e poucas opções de tratamento: quimioterapia à base de fármacos como a Doxorrubicina (DOX) e radioterapia (Figura 5).

Figura 5: classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama.

Subtipos moleculares	Luminal A	Luminal B		HER2+	Triplo-negativo
		(HER2-)	(HER2+)		
Biomarcadores	ER+ PR+ HER2- Ki67low	ER+ PR- HER2- Ki67high	ER+ PR-/± HER2+ Ki67low/high	ER- PR- HER2+ Ki67high	ER- PR- HER2- Ki67high
Incidência (%)	40–50	20–30		15–20	10–20
Grau histológico	Grau I	Grau II		Grau III	Grau III
Prognóstico	Bom	Intermediário		Ruim	Ruim
Tratamentos disponíveis	Endócrina	Endócrina Quimioterapia	Endócrina Quimioterapia Terapia-alvo	Quimioterapia Terapia-alvo	Quimioterapia Inibidores PARP

Fonte: NASCIMENTO, R. G. (2020).

1.3 Câncer de mama triplo-negativo

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) é um subtipo distinto de câncer de mama caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio, receptores de progesterona e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Representando aproximadamente 10-20% de todos os diagnósticos de câncer de mama, o TNBC está associado a um curso clínico mais agressivo e a uma maior probabilidade de recorrência em comparação a outros subtipos de câncer de mama (BIANCHINI *et al.* 2016). A falta de terapias direcionadas para TNBC dificulta as opções de tratamento, levando a uma dependência da quimioterapia como a principal abordagem terapêutica.

Pesquisa por MCCARTHY *et al.* (2021) sugere que mulheres negras e de descendência afriacana tiveram um risco quase três vezes maior, mesmo com um ajuste abrangente para os fatores de risco de câncer de mama em uma população rastreada, uma magnitude que foi observada em estudos anteriores que se ajustaram para menos fatores de risco (CAREY *et al.* 2009; TRIVERS, *et al.* 2009; KWAN *et al.* 2009).

Dificultando ainda mais seu tratamento, o câncer de mama triplo-negativo também é um tumor altamente heterogêneo, podendo ser classificado de acordo com suas características transcriptômicas como basal (BL), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M+) e receptor luminal de andrógeno (LAR), o subtipo mesenquimal apresentando maiores características de células-tronco e

pluripotência, de acordo com o conceito introduzido por LEHMANN em 2011 (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização dos subtipos tumorais.

Subtipo tumoral	Características	Linhagens celulares
Basal	Superexpressão de genes relacionados à proliferação, ciclo celular e reparo de DNA (via ATR-BRCA), vias de sinalização de fatores de crescimento (EGFR, MET, NGF, <i>Wnt</i> , IGF-1R), glicólise e gliconeogênese.	HCC2157
		SUM149PT
		HCC70
		HCC1806
		HCC3153
		MDA-MB-468
Imunomodulatório	Expressão de genes relacionados à processos celulares imunogênicos (CTLA4, IL-2, IL-7, processamento e apresentação de antígenos).	HCC1187
		DU4475
Mesenquimal	Maior expressão de marcadores de CSC, alta motilidade e taxa de diferenciação celular, EMT, sinalização de fatores de crescimento, angiogênese e baixa proliferação.	BT-549
		HS578T
		MDA-MB-157
		SUM159PT
		MDA-MB-231
Receptor Luminal Andrógeno	Padrão de expressão gênica luminal, superexpressão do receptor de andrógeno, subtipo molecular apócrino.	MDA-MB-453
		SUM185PE
		HCC2185
		CAL-148

Fonte: adaptado de YIN, L *et al.* (2020).

A heterogeneidade no TNBC é um fator crítico que influencia sua natureza agressiva e resistência ao tratamento. O TNBC compreende vários subtipos moleculares, cada um exibindo perfis genéticos e comportamentos biológicos distintos (LEHMANN *et al.* 2011). Alterações genéticas, incluindo mutações frequentes em TP53 e BRCA1 e BRCA2, contribuem para uma variabilidade significativa dentro dos tumores, complicando as respostas terapêuticas (MCCARTHY *et al.* 2014). Além disso, a heterogeneidade intratumoral permite diversas populações celulares que podem levar a diferentes taxas de crescimento e potencial metastático (YATES *et al.* 2017). Por exemplo, tumores basais são frequentemente associados a uma maior probabilidade de metástase e pior prognóstico, enquanto tumores luminais podem exibir características de células-tronco cancerígenas. O microambiente tumoral também desempenha um papel crucial, com interações entre células imunes e estromais influenciando ainda mais o comportamento do tumor (PRUNERI *et al.* 2018). Essa complexidade exige estratégias de tratamento personalizadas para atingir efetivamente as características únicas de cada tumor (O'SHAUGHNESSY *et al.* 2013; ZHANG *et al.* 2020).

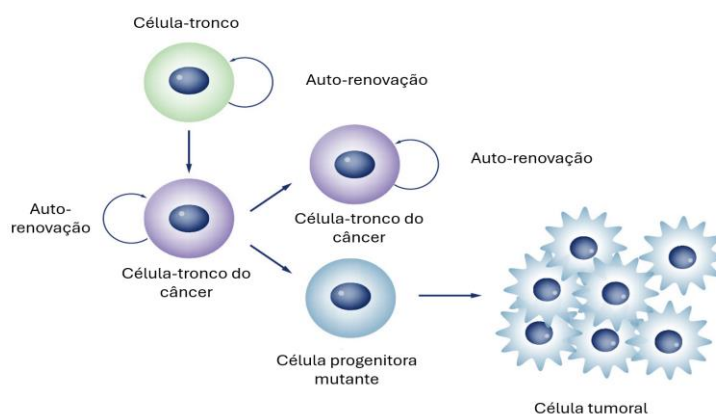
As estratégias de tratamento atuais para o TNBC incluem principalmente a quimioterapia neoadjuvante, que demonstrou eficácia na redução do tamanho do tumor antes da cirurgia. No entanto, apesar das respostas iniciais, muitos pacientes apresentam recidiva. A hipótese das células-tronco do câncer sugere que uma pequena população de células dentro de um tumor possui propriedades semelhantes às do tronco, incluindo capacidades de auto-renovação e diferenciação. Acredita-se que essas CSCs conduzam a tumorigênese, metástase e recorrência, particularmente em cânceres agressivos como o TNBC, o que torna essa subpopulação um alvo de estudo para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (APRIL *et al.* 2015; HU *et al.* 2017; HUI *et al.* 2017).

1.4 Células-tronco do câncer

As células-tronco cancerígenas (CSCs) são uma subpopulação de células tumorais que possuem propriedades únicas, incluindo auto-renovação e a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células dentro do tumor (Figura 6). Este conceito, que surgiu de estudos em células-tronco normais, tem implicações significativas para nossa compreensão da biologia do câncer. Pesquisas indicam que as CSCs são responsáveis pela iniciação, manutenção e recorrência do tumor, contribuindo para a heterogeneidade observada dentro dos tumores. Elas podem escapar de terapias convencionais, levando à resistência ao tratamento e à recidiva da doença, tornando-as um foco crucial na pesquisa do câncer (MARUSYK *et al.* 2012)

Uma das características definidoras das CSCs é sua capacidade de passar por auto-renovação, permitindo que elas reponham a massa tumoral indefinidamente. Estudos identificaram marcadores específicos, como CD44, CD146, CD24 e atividade da aldeído desidrogenase (ALDH), que são comumente associados a CSCs em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, cérebro e colorretal. Esses marcadores ajudam a isolar e caracterizar populações de CSCs, facilitando a pesquisa sobre sua biologia e direcionamento terapêutico. Por exemplo, a presença desses marcadores foi associada a prognósticos e resultados de tratamento mais precários em vários tipos de câncer, ressaltando a relevância clínica das CSCs (GOLDSTEIN *et al.* 2020).

Figura 6: Capacidade de autorrenovação e diferenciação das células-tronco:



Fonte: adaptado de GeneTex (2022).

As CSCs exibem perfis metabólicos distintos em comparação com suas contrapartes diferenciadas. Pesquisas mostraram que as CSCs geralmente dependem da glicólise anaeróbica para produção de energia, um fenômeno conhecido como o Efeito Warburg. Essa adaptação metabólica não apenas apoia sua sobrevivência no microambiente tumoral hipóxico, mas também fornece a energia e os blocos de construção necessários para a rápida divisão celular. Além disso, as CSCs podem modular seu metabolismo em resposta a sinais ambientais, o que contribui para sua resiliência contra quimioterapia e radiação. Entender as vias metabólicas exclusivas das CSCs apresenta oportunidades para o desenvolvimento de terapias direcionadas que podem eliminar seletivamente essas células (BATLLE *et al.* 2017).

O microambiente tumoral desempenha um papel fundamental na manutenção das características das CSCs. Interações com células estromais circundantes, componentes da matriz extracelular e fatores solúveis podem influenciar o comportamento e o destino das CSCs. Além disso, o cenário imunológico dentro do tumor pode apoiar ou dificultar a atividade das CSCs, com alguns estudos sugerindo que mecanismos de evasão imunológica empregados pelas CSCs contribuem para a progressão do tumor. Assim, mirar nas interações entre CSCs e seu microambiente é uma estratégia promissora para melhorar o tratamento do câncer (KRESO *et al.* 2014).

1.3.1 Pluripotência

Pluripotência refere-se à capacidade de uma célula-tronco de se diferenciar em qualquer tipo de célula dos três tecidos extraembrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. Essa propriedade é uma marca registrada das células-tronco embrionárias (ESCs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Entender os mecanismos regulatórios que mantêm a pluripotência é essencial tanto para a biologia do desenvolvimento quanto para a medicina regenerativa. Fatores-chave de transcrição, como os fatores de Yamanaka (*POU5F1/OCT4*, *MYC*, *SOX* e *KLF4*), desempenham papéis críticos na sustentação desse estado (BOYER *et al.* 2005).

Várias vias de sinalização também são cruciais na regulação da pluripotência (Figura 7). A via de sinalização WNT é conhecida por aumentar a expressão de genes associados à pluripotência. Pesquisas indicam que a sinalização WNT ativa a expressão de genes-alvo que promovem a auto-renovação em ESCs, ao mesmo tempo em que inibe os sinais de diferenciação (SATO *et al.* 2004). Da mesma forma, a via de sinalização Nodal, que faz parte da família TGF- β , desempenha um papel essencial na manutenção do estado pluripotente, promovendo a expressão de fatores de pluripotência e desenvolvimento inicial do embrião (GU *et al.* 2008).

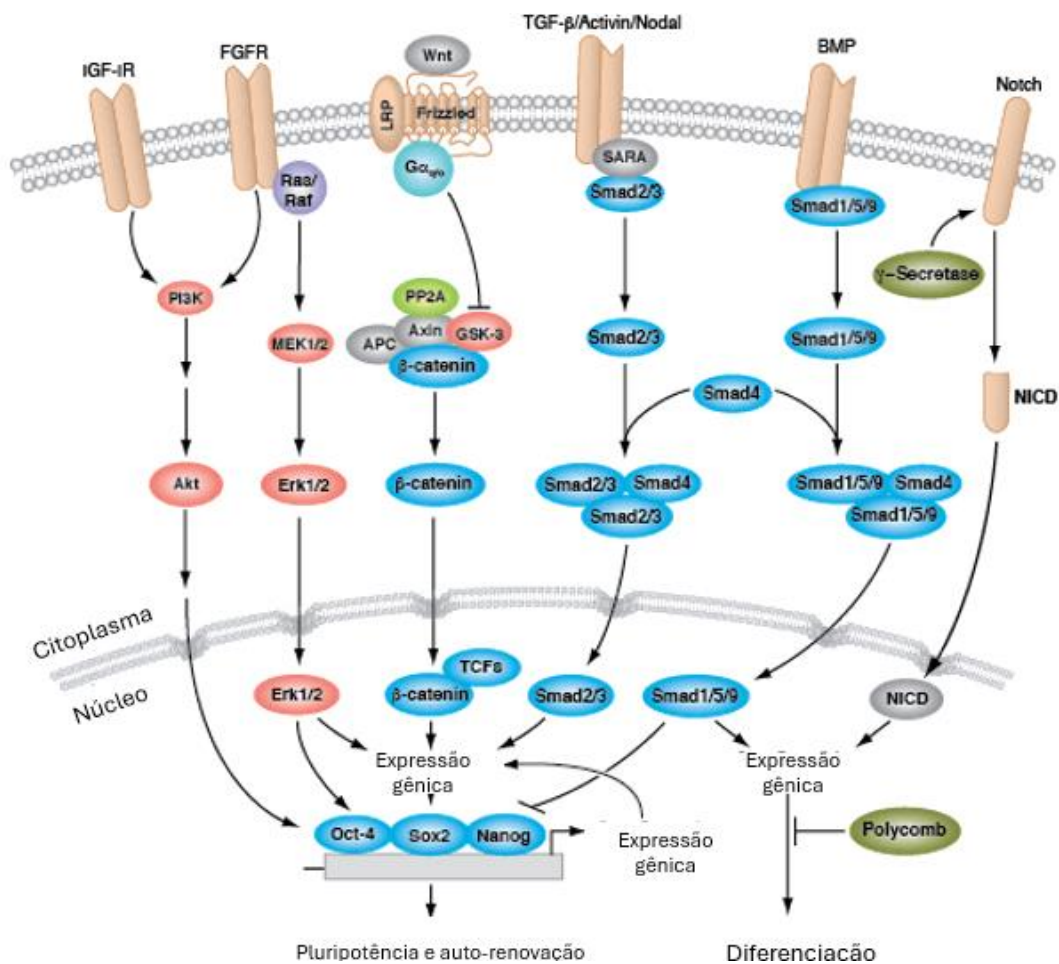
A via FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos) é outro regulador importante da pluripotência. A sinalização FGF interage com a via MAPK para modular a expressão de fatores de transcrição essenciais. Segundo YING *et al.* (2008) o FGF mantém a auto-renovação de ESCs de camundongos e humanos promovendo a atividade de *POU5F1/OCT4* e outros marcadores de pluripotência. Além disso, a via de sinalização NOTCH está implicada na manutenção da pluripotência regulando decisões de destino celular e promovendo a auto-renovação. Estudos mostraram que a sinalização NOTCH pode inibir a diferenciação em ESCs e iPSCs (GONZALEZ *et al.* 2014).

Além dessas vias de sinalização, a regulação epigenética é crucial para manter a pluripotência. Modificações como metilação de DNA e modificações de histonas podem influenciar padrões de expressão gênica essenciais para o estado pluripotente. Pesquisas demonstraram que a interação entre fatores de transcrição e reguladores epigenéticos estabelece um estado pluripotente estável, ao mesmo tempo em que permite a regulação dinâmica necessária para a diferenciação (SMITH *et al.* 2010).

Entender as interações complexas entre essas vias e seu papel na manutenção da pluripotência fornece uma percepção valiosa para aplicações terapêuticas, particularmente na medicina regenerativa. Ao aproveitar esses mecanismos, os pesquisadores visam desenvolver estratégias para diferenciar células-tronco em tipos de células específicos para o tratamento de várias doenças, incluindo distúrbios neurodegenerativos e lesões (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). À medida que o campo avança, a exploração contínua da

pluripotência e suas redes regulatórias será essencial para traduzir a pesquisa básica em aplicações clínicas.

Figura 7: vias Notch, Wnt, TGF- β e FGF e suas interações com os genes de pluripotência para auto-renovação e diferenciação:



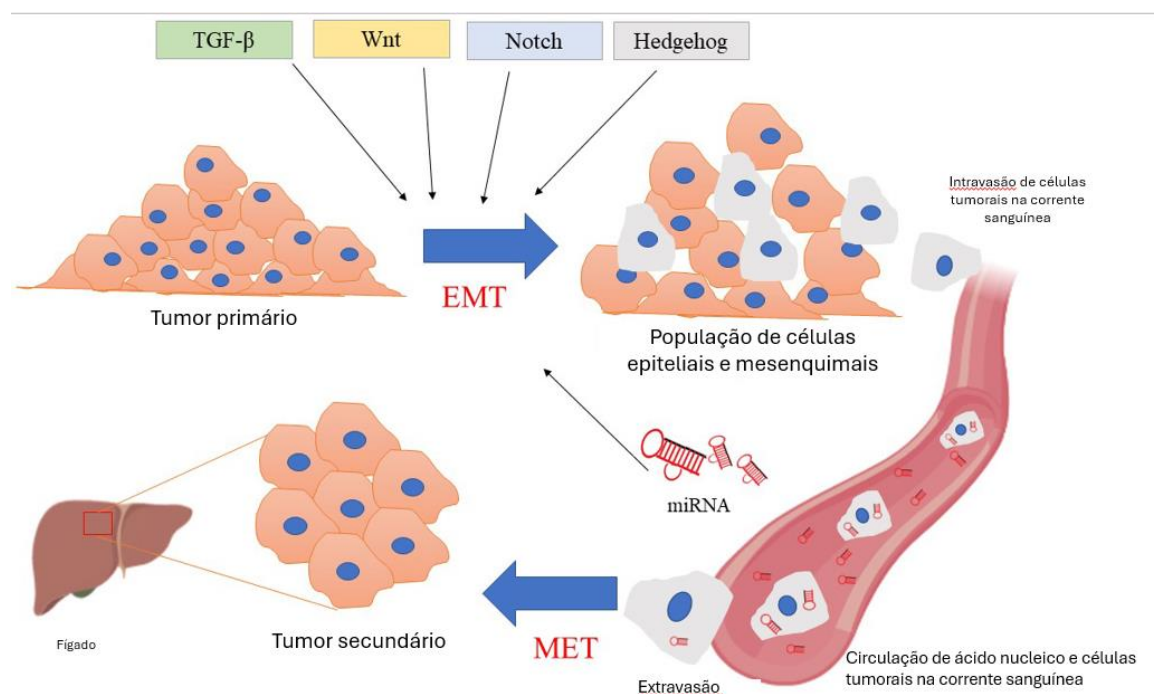
As vias de sinalização predominantes envolvidas na pluripotência e auto-renovação são TGF- β , que sinaliza por meio de Smad2/3/4, e FGFR, que ativa as vias MAPK e Akt. A via Wnt também promove a pluripotência, embora isso possa ocorrer por meio de um mecanismo não canônico envolvendo um equilíbrio entre o ativador transcricional, TCF1, e o repressor, TCF3. A sinalização por meio dessas vias dá suporte ao estado pluripotente, que depende predominantemente de três fatores-chave de transcrição: Oct-4, Sox2 e Nanog. Esses fatores de transcrição ativam a expressão gênica de genes específicos de ESC, regulam sua própria expressão, suprimem genes envolvidos na diferenciação e também servem como marcadores de hESCs. Outros marcadores usados para identificar hESCs são o glicolípido de superfície celular SSEA3/4 e as glicoproteínas TRA-1-60 e TRA-1-81. In vitro, hESCs podem ser induzidas a derivadas das três camadas germinativas primárias, endoderme, mesoderme ou ectoderme, bem como células semelhantes a células germinativas primordiais. Uma das principais vias de sinalização responsáveis por esse

processo é a via BMP, que usa Smad1/5/9 para promover a diferenciação inibindo a expressão de Nanog, bem como ativando a expressão de genes específicos de diferenciação. Notch também desempenha um papel na diferenciação por meio do domínio intracelular notch (NICD). À medida que a diferenciação continua, as células de cada camada germinativa primária se diferenciam ainda mais ao longo de vias específicas de linhagem. Fonte: adaptado de CellSignal (2016).

1.3.2 Transição epitélio-mesenquimal

A transição epitelial para mesenquimal (EMT) é um processo biológico que permite que as células epiteliais adquiram propriedades mesenquimais, incluindo maior motilidade e invasividade (Figura 8). Essa transição é crucial durante o desenvolvimento embrionário e o reparo tecidual, mas também está implicada na progressão e metástase do câncer. A pesquisa estabeleceu uma forte relação entre EMT e CSCs, destacando como esse processo contribui para a natureza agressiva dos tumores (KUMAR *et al.* 2016).

Figura 8: Transição epitélio-mesenquimal.



Uma representação esquemática da Transição Epitelial Mesenquimal. As células cancerígenas se desprendem da membrana basal e se intravasam para os vasos sanguíneos próximos como CTC e viajam através dos vasos sanguíneos para o local secundário em um processo descrito como metástase. Elas se alojam em diferentes órgãos por um processo denominado Transição Epitelial Mesenquimal (MET). Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.* (2016).

A EMT é frequentemente desencadeada por várias vias de sinalização, incluindo as vias TGF- β , Wnt e NOTCH, que são conhecidas por ativar fatores de transcrição importantes, como *Snail*, *Slug* e *ZEB1/2*. Esses fatores promovem a regulação negativa de marcadores epiteliais como E-caderina e regulam positivamente marcadores mesenquimais como N-caderina e vimentina. Estudos mostraram que a ativação dessas vias não apenas facilita a EMT, mas também enriquece a população de CSC dentro dos tumores, contribuindo para o aumento do potencial metastático (HUANG *et al.* 2013).

As CSCs possuem características semelhantes às das células submetidas à EMT, incluindo auto-renovação e a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células. Pesquisas demonstraram que a população de CSC frequentemente exibe características de EMT aprimoradas, levando a um fenótipo tumoral mais agressivo. Por exemplo, no câncer de mama, um subconjunto de células com propriedades de CSC demonstrou expressar níveis mais altos de marcadores de EMT, correlacionando-se com prognóstico ruim e resistência ao tratamento (TANABE *et al.* 2017). Essa relação sugere que direcionar vias relacionadas à EMT pode ser uma estratégia eficaz para erradicar CSCs e melhorar os resultados terapêuticos.

Além disso, o microambiente tumoral desempenha um papel significativo na promoção da EMT e na manutenção de CSCs. A presença de citocinas inflamatórias, componentes da matriz extracelular e condições hipóxicas pode induzir EMT em células tumorais, facilitando a geração de CSCs. Estudos indicam que essa influência microambiental aumenta as propriedades semelhantes a das células tumorais, contribuindo assim para a heterogeneidade do tumor e a resiliência contra terapias convencionais (BREGENZER *et al.* 2022).

Visar a interação entre EMT e CSCs apresenta um caminho promissor para a terapia do câncer. Estratégias que visam inibir as vias de EMT ou especificamente atingir CSCs estão sendo exploradas em ensaios clínicos. Por exemplo, inibidores da sinalização de TGF- β mostraram potencial na redução de populações de CSC e na prevenção de metástase em vários tipos de câncer (LIU *et al.* 2015). À medida que a pesquisa avança, uma melhor compreensão da relação entre EMT e CSCs será crucial para o desenvolvimento de intervenções

terapêuticas eficazes que visem melhorar os resultados dos pacientes com câncer.

1.3.3 Ferroptose

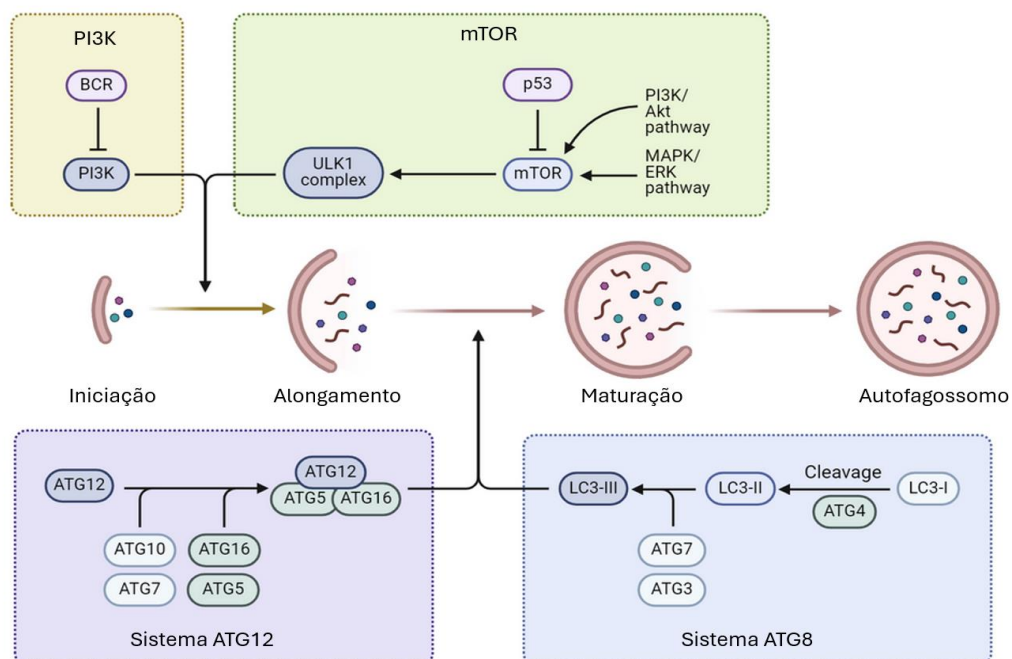
Ferroptose é uma forma de morte celular ferro-dependente distinta de apoptose e caracterizada pelo acúmulo de peróxidos lipídicos. Esse mecanismo é desencadeado por diversos tipos de estresse celular, incluindo estresse oxidativo, metabólico e privação de nutrientes, pois resultam na depleção de antioxidantes celulares, como a glutathiona. Quando os níveis de glutathiona estão baixos, as células se tornam suscetíveis à peroxidação lipídica, a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) dos lipídios da membrana. A enzima lipoxigenase (LOX) catalisa esse processo, utilizando o ferro como cofator para geração de peróxidos lipídicos, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal, e o acúmulo desses produtos leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), desencadeando a morte celular (Figura 9). A ferroptose também está associada à disfunção mitocondrial, incluindo alterações no potencial da membrana mitocondrial e alterações na morfologia mitocondrial, conhecidas por produzir ROS, exacerbando ainda mais a peroxidação lipídica (CAO *et al.* 2016; SHAH *et al.* 2018; OH *et al.* 2022)

Células tumorais apresentam metabolismo alterado e altos níveis de ferro, tornando-as suscetíveis à ferroptose. Essa forma de morte celular pode ser um mecanismo para eliminação de células tumorais sob condições específicas, no entanto, elas podem desenvolver resistência à ferroptose por meio de diversos métodos, como a regulação positiva de sistemas antioxidantes como o *SLC7A11*, gene que codifica uma proteína carreadora de cistina para sua conversão em cisteína e uso na síntese de glutathiona (GSH), um antioxidante que protege as células do estresse oxidativo (CAO *et al.* 2016).

1.3.4 Autofagia

Autofagia é um processo de degradação celular que mantém a homeostase por meio da reciclagem de organelas e proteínas danificadas, e desempenha um papel crítico no metabolismo e sobrevivência celular. Ele se inicia como resultado de diversos estímulos, incluindo privação de nutrientes, hipóxia e estresse oxidativo. Sinais de estresse celular ativam o complexo ULK1, iniciando a formação do autofagossomo. Nessa etapa, o complexo Beclin1-VPS34 é formado, produzindo PI3P, essencial para a nucleação do fagóforo. O fagóforo se expande para formar o autofagossomo, um processo que envolve dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina - complexo *ATG12-ATG5-ATG16L1* e o LC3-II. A seleção de carga é mediada por proteínas adaptadoras como p62/SQSTM1. O autofagossomo se funde com um lisossomo, formando um autolisossomo. Essa fusão é facilitada por proteínas como STX17 e SNAP29. Então, as hidrolases lisossomais degradam o conteúdo autofágico, e as macromoléculas resultantes são recicladas de volta ao citosol (Figura 10) (TEHREEM. 2020)

Figura 10: Mecanismos de autofagia.



Sinais de estresse celular ativam o complexo ULK1, iniciando a formação do autofagossomo. Nessa etapa, o complexo Beclin1-VPS34 é formado, produzindo PI3P, essencial para a nucleação

do fagóforo. O fagóforo se expande para formar o autofagossomo, um processo que envolve dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina - complexo ATG12-ATG5-ATG16L1 e o LC3-II. A seleção de carga é mediada por proteínas adaptadoras como p62/SQSTM1. O autofagossomo se funde com um lisossomo, formando um autolisossomo. Essa fusão é facilitada por proteínas como STX17 e SNAP29. Então, as hidrolases lisossomais degradam o conteúdo autofágico, e as macromoléculas resultantes são recicladas de volta ao citosol. Fonte: adaptado de TEHREEM (2020).

No câncer, a autofagia tem um papel duplo: pode suprimir a iniciação do tumor removendo organelas e proteínas danificadas, mas também pode dar suporte ao crescimento e sobrevivência do tumor sob condições de estresse. Essa dualidade é particularmente significativa quando se considera células-tronco cancerígenas (CSCs), que são conhecidas por sua capacidade de se autorrenovar e impulsionar a tumorigênese (KOUIDHI *et al.* 2018).

KOUIDHI *et al.* (2018) demonstrou que a autofagia é crucial para a manutenção das CSCs. As CSCs geralmente existem em um microambiente tumoral hipóxico e privado de nutrientes, onde a autofagia permite que sobrevivam e proliferem. Por exemplo, estudos mostraram que o aumento da atividade autofágica nas CSCs contribui para sua sobrevivência ao fornecer nutrientes essenciais por meio da quebra de componentes celulares, apoiando assim sua auto-renovação e potencial tumorigênico. Este processo é particularmente evidente em vários tipos de câncer, como mama e glioblastoma, onde a autofagia promove a manutenção de CSC.

Além disso, a autofagia está implicada na resistência de CSCs a terapias convencionais. CSCs frequentemente exibem atividade autofágica aumentada, o que lhes permite sobreviver a tratamentos quimioterápicos que induzem estresse celular. A inibição da autofagia nessas células demonstrou sensibilizá-las à quimioterapia e aumentar a eficácia do tratamento. Por exemplo, pesquisas indicam que a combinação de inibidores de autofagia com agentes quimioterápicos padrão pode reduzir a população de CSC em tumores, levando a melhores resultados terapêuticos (FENG *et al.* 2014).

Em alguns cenários, altos níveis de autofagia podem promover a diferenciação de CSC e diminuir suas propriedades semelhantes a tronco, enquanto em outros, pode manter seu estado indiferenciado. Essa dualidade sugere que o direcionamento terapêutico da autofagia em CSCs requer

consideração cuidadosa do tipo de câncer e do microambiente (GUAN *et al.* 2017). Entender as vias de sinalização envolvidas nessa regulação, incluindo as vias mTOR e AMPK, pode ajudar a desenvolver terapias direcionadas que manipulam processos autofágicos em CSC.

1.5 Doxorrubicina

A doxorrubicina, um antibiótico antraciclínico, é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama. A doxorrubicina intercala-se no DNA, interrompendo a estrutura da dupla hélice e inibindo a replicação e transcrição do DNA por meio da topoisomerase II. Essa ação leva ao acúmulo de espécies de oxigênio reativas (ROS), induzindo à morte celular (GONZALEZ *et al.* 2007).

Apesar de sua eficácia, o uso clínico da doxorrubicina é frequentemente limitado por seus efeitos colaterais associados, particularmente cardiotoxicidade. Esse efeito adverso pode levar a danos cardíacos de longo prazo e restringir a dose cumulativa que os pacientes podem receber com segurança (MINOTTI *et al.* 2004; PRITCHARD *et al.* 2018).

Outro desafio significativo no uso de doxorrubicina para tratamento de câncer de mama é o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Vários mecanismos contribuem para essa resistência, incluindo a regulação positiva de transportadores de efluxo, como a glicoproteína P, que bombeia o medicamento para fora das células cancerígenas, reduzindo assim sua eficácia. Além disso, alterações nas vias de sinalização celular, como a via PI3K/AKT/mTOR, foram implicadas na resistência à doxorrubicina (ZHOU *et al.* 2020).

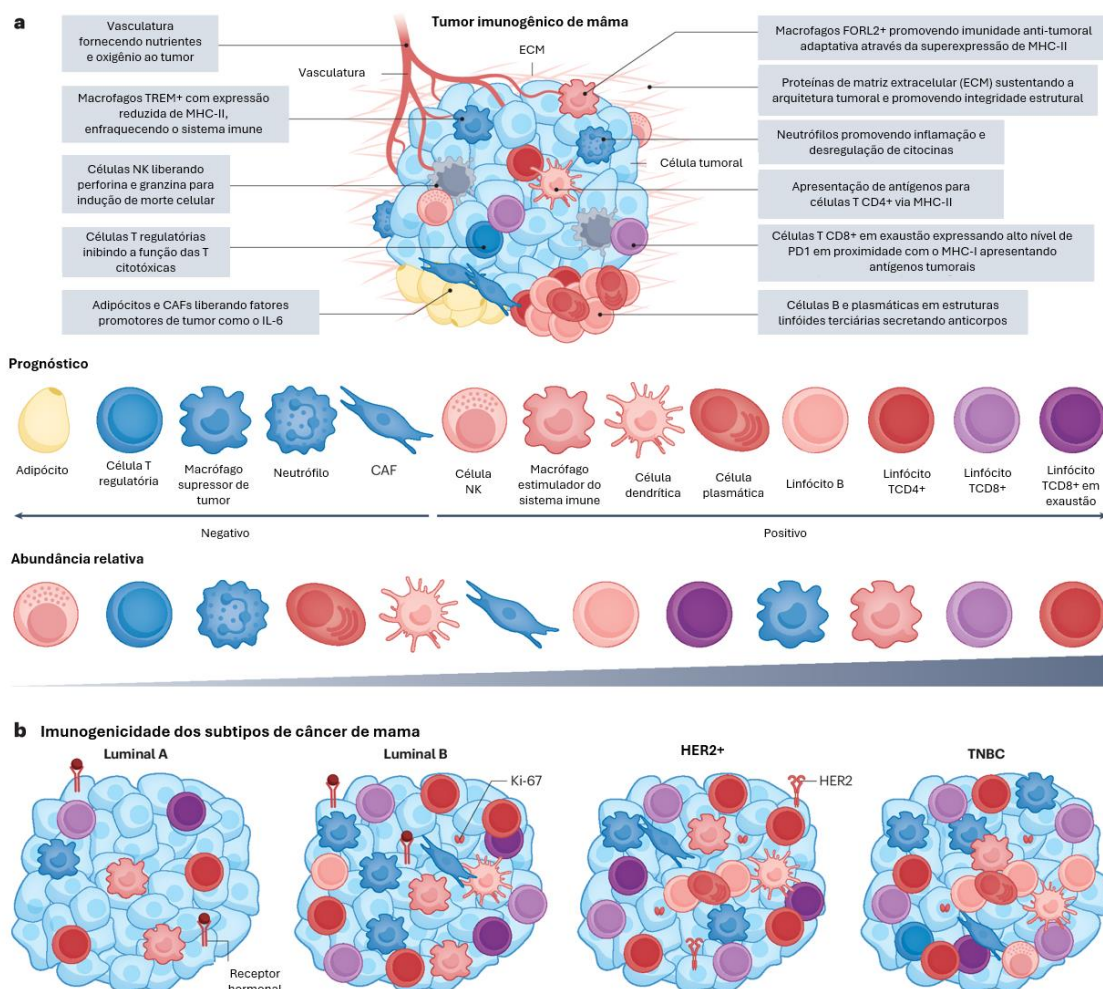
Pesquisas emergentes também destacam o papel do microambiente tumoral em influenciar a eficácia da doxorrubicina. Fatores como hipóxia, inflamação e a presença de fibroblastos associados ao câncer podem afetar a administração e a resistência aos medicamentos. Por exemplo, estudos indicaram que condições hipóxicas podem promover autofagia em células de câncer de mama, aumentando sua sobrevivência durante o tratamento com doxorrubicina (ZHAO *et al.* 2021).

1.6 Modelo tridimensional in vitro

Modelos 3D in vitro de câncer de mama surgiram como ferramentas poderosas para estudar a biologia do tumor, a resposta aos medicamentos e o microambiente do tumor. Ao contrário das culturas 2D tradicionais, que muitas vezes falham em replicar com precisão a arquitetura complexa e as interações encontradas in vivo, os modelos 3D fornecem um ambiente fisiologicamente mais relevante. Esses modelos podem imitar melhor a heterogeneidade dos tumores e a dinâmica celular envolvida na progressão do câncer.

O microambiente tumoral (Figura 11) desempenha um papel crucial na progressão do câncer de mama e na resistência à terapia. Modelos 3D facilitam a investigação de vários fatores microambientais, como hipóxia, gradientes de nutrientes e a presença de células estromais, que podem influenciar o comportamento do tumor e a resposta ao tratamento. Por exemplo, pesquisas usando modelos 3D demonstraram que condições hipóxicas podem alterar a sensibilidade aos medicamentos e promover o comportamento agressivo das células do câncer de mama (KUMAR *et al.* 2019).

Figura 11: Composição do microambiente tumoral do câncer de mama.



A: O microambiente do tumor de mama é altamente complexo e pode levar tanto à promoção quanto à inibição da imunidade antitumoral. Fatores promotores de imunidade levam a um prognóstico positivo e incluem Células não imunes, como fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e adipócitos, podem facilitar a imunidade tumoral por meio da produção de fatores de crescimento e citocinas. **B** Abundância representativa de células imunes no TME nos quatro subtipos de câncer de mama. Embora o câncer de mama triplo-negativo (TNBC) tenha sido classicamente considerado o subtipo mais imunogênico, há evidências demonstrando que os tumores luminal B HR+ amplificados por HER2 e de alto grau contêm uma frequência relativamente alta de TILs exibindo expressão aumentada de ponto de verificação imune em comparação com tumores luminais A, o que é considerado deserto imune. Fonte: adaptado de HARRIS *et al.* (2024).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é responsável por aproximadamente 2,3 milhões de novos casos e 685.000 mortes em todo o mundo em 2020, tornando-o o câncer mais comumente diagnosticado e a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer entre mulheres, além de apresentar uma recidiva de 20% após um

tratamento extremamente agressivo, como é o caso do câncer de mama triplo-negativo.

As células-tronco cancerígenas (CSCs) são uma subpopulação de células tumorais que possuem propriedades únicas de pluripotência, e pesquisas indicam que as CSCs são responsáveis pela iniciação, manutenção e recorrência do tumor, contribuindo para a heterogeneidade observada dentro dos tumores. Elas podem escapar de terapias convencionais, levando à resistência ao tratamento e à recidiva da doença, tornando-as um foco crucial na pesquisa do câncer.

Dessa forma, é imprescindível o estudo dessa população para que haja maior entendimento de seu funcionamento no microambiente tumoral com a finalidade de desenvolver melhores tratamentos para as pacientes.

3 OBJETIVO GERAL

Compreender os mecanismos pelos quais as CSCs regulam processos biológicos e causam quimiorresistência por meio do cultivo tridimensional de esferoides de linhagens de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e Hs 578T enriquecidos de células-tronco do câncer tratadas e não tratadas com o quimioterápico Doxorrubicina.

2.1 Objetivos específicos

- Obter esferoides tumorais a partir das linhagens de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e Hs 578T, cultivados em meio de enriquecimento de células-tronco do câncer;
- Avaliar a expressão gênica de alvos de pluripotência, EMT, ferroptose e autofagia em esferoides enriquecidos de células-tronco do câncer das linhagens de câncer de mama triplo-negativo;
- Analisar a morfologia dos esferoides enriquecidos de células-tronco do câncer das linhagens de câncer de mama triplo-negativo através da Microscopia à Laser Confocal;

- Obter o fenótipo das linhagens de câncer de mama triplo-negativo e analisar o efeito da Doxorrubicina no processo de oxidação lipídica através de Citometria de Fluxo;
- Avaliar os efeitos do quimioterápico Doxorrubicina nas vias de pluripotência e EMT e sua relação com metástase e recidiva do TNBC a partir de sua aplicação em esferoides enriquecidos de células-tronco do câncer das linhagens de câncer de mama triplo-negativo.

3 METODOLOGIA

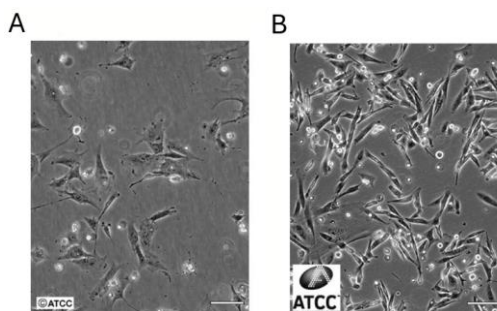
3.1 Cultivo celular

Os ensaios foram realizados utilizando dois modelos de cultura celular: cultura em monocamada (bidimensional) e cultura de esferoides tumorais (tridimensional), conforme descrito a seguir:

3.1.1 Cultivo celular em monocamada

Para execução desse projeto, as linhagens tumorais de carcinoma de mama triplo-negativo Hs 578T (ATCC, cat. #HTB-126) (Figura 12A) e adenocarcinoma de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC, cat. CRM-HTB-26) (Figura 12B) foram cultivadas em monocamada em frasco de adesão com meio DMEM Alta Glicose (Gibco cat. 12100-038) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco cat. 210115-K) e 1 mL de insulina humana (Lovolin e Leibovitz L-15 Medium (Sigma Aldrich cat. L4386) com 10% de soro fetal bovino (Gibco cat. 210115-K), respectivamente. As garrafas foram armazenadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Figura 12: Hs 578T (A) e MDA-MB-231 (B) em monocamada.



Fonte: ATCC.

3.1.2 Cultivo celular tridimensional

Para o cultivo de esferoides tumorais, as células em monocamada passaram por desassociação enzimática por tripsina, respeitando-se o número de passagem e ressuspensas em meio próprio para enriquecimento de células-tronco DMEM/F-12 (Sigma, cat. D0547) suplementado com 0,001% de insulina humana (Novolin, 0,02% de soro de cavalo inativado (GIBCO cat. 16050), 0,02% de EGF (Sigma cat. E1257 e 0,01% de hidrocortisona (Sigma cat. H0135). A ressuspensão celular foi semeada em placas de 96 poços sem aderência na concentração de 1×10^4 células por poço. As placas foram armazenadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

3.2 Tratamento com Doxorrubicina

A Doxorrubicina (Fauldoxo, Libbs, cat 13G0025) foi diluída em 1mL de água milli-Q para a concentração de 10mg/mL. No sétimo dia de cultivo, esferoides de Hs 578T foram tratados com DOX na concentração de 15,9µM por 48 horas e os esferoides de MDA-MB-231 foram tratados na concentração de 118,7µM por 72 horas, de acordo com IC₅₀ determinado por MOREIRA *et al.* (2018) e LOVITT *et al.* (2018) respectivamente.

3.3 Microscopia à Laser Confocal

A análise morfológica foi feita através de Microscopia à Laser Confocal em esferoides de Hs 578T e MDA-MB-231 cultivados em suspensão. Nos ensaios, foram marcados núcleo e membrana celular (Image-IT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit Invitrogen, cat. I34406), que consiste em glicoproteínas da membrana celular com WGA (Invitrogen, cat. W11261) e Hoescht 33342 para marial genético, diluído em Sal de Hank. Células-tronco do câncer foram marcadas com o anticorpo CD44 (BD Biosciences, cat. #560532). Os marcadores foram utilizados nas concentrações listadas na tabela 2.

Tabela 2: Concentrações utilizadas na marcação para Microscopia:

Marcador	Concentração
WGA	5µg/mL
Hoescht 33342	2µM
CD44	1:20

3.4 Citometria de Fluxo

Para caracterização do fenótipo das linhagens utilizadas, assim como a análise da peroxidação lipídica causada pelo efeito da Doxorrubicina nas células, as amostras controle e tratadas foram analisadas no FACSCanto II (BD Bioscience) utilizando o programa FACSDiva 6.1.3. Análise posterior dos dados coletados foi realizada com o software FlowJo.

3.4.1 Fenotipagem

Para o ensaio de fenotipagem por Citometria de Fluxo, os esferoides controle e tratados com doxorrubicina foram desagregados enzimaticamente com a utilização de tripsina, lavados com PBS 1% e incubados com concentração de 2.10^5 células por amostra a 4°C por 20 minutos com os anticorpos listados na tabela 3.

Tabela 3: Anticorpos e isotipos utilizados na marcação do ensaio de fenotipagem por citometria de fluxo:

Anticorpo	Cadeia	Fabricante	Catálogo	Volume (por reação de 100µL)
FITC mouse anti-humano CD24	IgG1	Invitrogen	11024182	5µL
APC rat anti-humano CD44	IgG2b	Invitrogen	2611857	0,3µL
PE mouse anti-humano CD146	IgG1κ	Invitrogen	2284154	5µL

FITC mouse IgG1 isotipo controle	IgG1	Invitrogen	555748	1,25µL
APC rat IgG2b κ isotipo controle	IgG2b	Invitrogen	2476826	0,3 µL
PE mouse IgG1κ isotipo controle	IgG1κ	Invitrogen	2473730	0,625µL

3.4.2 Peroxidação Lipídica

O ensaio de peroxidação lipídica foi realizado com o Image-iT Lipid Peroxidation Kit (Invitrogen, cat. C10445) (Tabela 4). Os esferoides foram tripsinizados e a amostra controle foi incubada com hidroperóxido de cumeno a 37°C por 2 horas, e então, juntamente com a tratada, incubada novamente com o sensor de peroxidação lipídica Image-iT por 30 minutos a 37°C. Todas as amostras foram então lavadas com PBS 1X e ressuspensas em tampão de marcação. O ensaio de peroxidação lipídica por citometria de fluxo se deu pela comparação entre o valor da peroxidação lipídica detectada por sensor em populações celulares tratadas por DOX e por um controle positivo (hidroperóxido de cumeno). Durante a leitura, valores de intensidade mediana da fluorescência normalizada pela amostra sem marcação e relativa ao grupo marcado são atribuídos à cada amostra, e a medição da peroxidação lipídica da amostra se dá pela razão desses dois.

Tabela 4: Componentes utilizados no ensaio de peroxidação lipídica.

Componente	Concentração (por 100 µL de reação)
Sensor de peroxidação lipídica Image-iT	10µM
Hidroperóxido de cumeno	100µM

3.5 Biologia Molecular

Para realização dos ensaios de biologia molecular, o RNA de esferoides controle e tratados das linhagens de Hs 578T e MDA-MB-231 foram extraídos

com o PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, cat. 12183018A). Os esferoides foram extraídos da placa de 96 poços e centrifugados, e o meio foi então descartado. Foram adicionados 300µL de solução de tampão de lise com 1% de 2-betamercaptaetanol preparado no momento do uso e a solução foi agitada em vórtex até a lise do sedimento. A solução foi então transferida para um microtubo RNase free e centrifugada por 2 minutos a 12000g. O lisado foi ressuspendido 10 vezes utilizando uma seringa de calibre 18, centrifugada a 14000g por 5 minutos e transferida para um novo microtubo livre de RNase. 1mL de etanol 70% foi adicionado em cada tubo, que foi então agitado em vortex por mais 30 segundos. A amostra foi transferida para um tubo com coluna e centrifugada a 12000g por 15 segundos. Foi feito o descarte do sobrenadante, a adição de 700µL de tampão de lavagem I e centrifugação a 12000g por 15 segundos. Após processamento da amostra, 500µL de tampão de lavagem II foi adicionado à coluna e centrifugado. Essa etapa se repetiu duas vezes. Após descarte do sobrenadante, a coluna foi centrifugada por 15 segundos a 12000g, e depois por mais 2 minutos para secagem da membrana. A coluna foi então transferida para um microtubo coletor, onde foi adicionado 10µL de água livre de RNase, em seguida de centrifugação a 12000g por 2 minutos para coleta do material genético. O RNA extraído foi quantificado no espectofotometro e foi realizada eletroforese em gel de agarose para verificação de integridade do material.

O tratamento para eliminação de DNA da amostra de RNA realizado com o kit *RNase Free DNase set* (Qiagen, cat. 79254) conforme as instruções do fabricante. Foram acrescentados em um microtubo 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão e 0,2 µL de DNase. O volume foi completado com água livre de RNase para 20 µL. As amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37°C, e em seguida, por 5 minutos a 65°C. O cDNA sintetizado com o *SCRIPT 3.0 Reverse Transcriptase* (Cellco, cat. PRT-102XS), volumes utilizados de acordo com a tabela 5. A concentração para utilização dos primers foi determinada através de ensaios de otimização. As etapas da qPCR foram listadas na tabela 6.

Tabela 5: volumes dos reagentes utilizados na síntese de cDNA.

Reagente	[] Inicial	[] Final	Volume por tubo	Volume para 12 tubos
----------	----------------	-----------	--------------------	-------------------------

Tampão SCRIPT 3.0 RT	5X	1X	4 µL	48 µL
Transcriptase reversa Script 3.0 RT	200 U/ul	100U	0,5 µL	6 µL
Mix dNTP	10 mM	500 µM	1 µL	12 µL
DTT	100 mM	5mM	1 µL	12 µL
Água livre de RNase			2,9 µL	34,8 µL

Tabela 6: ciclagem da qPCR:

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação da polimerase	1	95°C	2 minutos
Desnaturação	40	95°C	15 segundos
Anelamento e extensão		60°C	1 minuto

Os primers utilizados nesse projeto foram desenhados no Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), sintetizados pela Metabion (<https://www.metabion.com>) e seguem a nomenclatura estabelecida pelo HGNC (www.genenames.org).

3.5.1 Análise de alvos de Pluripotência

Os controles endógenos e alvos relacionados à pluripotência, crescimento e proliferação celular analisados por RT-qPCR e suas concentrações estão listados na tabela 7.

Tabela 7: Genes e suas respectivas concentrações utilizados no ensaio de expressão relativa:

Gene	Sequência	Concentração	Anelamento (°C)
<i>POU5F1</i>	FW 5'GGGCTCGAGAAGGATGTGG3'	250FW/250RV	60
	RV 5'TGACGGAGACAGGGGGAA3'		
<i>MYC</i>	FW 5'TTCCCCTACCCTCTCAACGA3'	150FW/200RV	62

RV 5'CTTCTTGTTCTCCTCAGAGTCG3'			
<i>KLF4</i>	FW 5'TTACCAAGAGCTCATGCCACC3'	300FW/200RV	62
RV 5'GTGGTAAGGTTTCTCACCTGTGT3'			
<i>NANOG</i>	FW 5'AACCTCAGCTACAAACAGGTA3'	250FW/250RV	59
RV 5'TCTGCGTCACACCATTGCTA3'			
<i>SOX2</i>	FW 5'GGAGAGTAAGAAACAGCATGG3'	300FW/300RV	60
RV 5'GTGGATGGGATTGGTGTCT3'			
<i>SOX4</i>	FW 5'CAGCAAACCAACAATGCCGA3'	150FW/300RV	59
RV 5'GATCTGCGACCACACCATGA3'			
<i>AKT1</i>	FW 5'GTCATCGAACGCACCTTCCAT3'	150FW/200RV	61
RV 5'AGCTTCAGGTACTCAAACCTCGT3'			
<i>AKT2</i>	FW 5'GAAACACAAGGAAAGGGAACCA3'	250FW/250RV	59
RV 5'TCTTGATGTATTCACCACGCTT3'			
<i>AKT3</i>	FW 5'TGAAGTGGCACACACTCTAACT3'	250FW/250RV	60
RV 5'CCGCTCTCTCGACAAATGGA3'			
<i>CDH1</i>	FW 5'AGCAGAACTAACACACGGGG3'	300FW/300RV	60
RV 5'ACCCACCTCTAAGGCCATCT3'			
<i>HPTR1</i>	FW 5'CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT3'	250FW/250RV	60

RV
5'AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA3'

3.5.2 Análise de alvos de Ferroptose

Os controles endógenos e alvos relacionados à ferroptose e autofagia analisados por RT-qPCR e suas concentrações estão listados na tabela 8.

Tabela 8: Genes e suas respectivas concentrações utilizados no ensaio de expressão relativa:

Gene	Sequência	Concentração	Anelamento (°C)
NCOA	FW 5'ACAGTTGCATAAGCCGTCACC3' RV 5'TGAGCCTGCTGTTGAAGTGTC3'	250FW/250RV	61
SLC3A2	FW 5'CCAACTACCGGGGTGAGAAC3' RV 5'CCGCAATCAAGAGCCTGTCT3'	300FR/200RV	62
SLC7A11	FW 5'TCTCAAAGGAGGTTACCTGC3' RV 5'AGACTCCCCTCAGTAAAGTGAC3'	250FW/200RV	62
GPX4	FW 5'GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC3' RV 5'CCGAACTGGTTACACGGGAA3'	150FW/300RV	62
ATG5	FW 5'AGAAGCTGTTTCGTCCTGTGG3' RV 5'AGGTGTTTCCAACATTGGCTC3'	200FW/300RV	60
ATG7	FW 5'CTGCCAGCTCGCTTAACATTG3'	200FW/300RV	61

		RV		
		5'CTTGTTGAGGAGTACAGGGTTTT3'		
ATG12	FW 5'AGGCAGAAAAGGTTAGGCGT3'	300FW/200RV		60
		RV 5'TGTCCTATGTGCTTGCTCTCC3'		
RAB7A	FW	250FW/200RV		62
	5'GTGTTGCTGAAGGTTATCATCCT3'			
		RV		
		5'GCTCCTATTGTGGCTTTGTACTG3'		
NFE2L2	FW 5'TTCCCGGTCACATCGAGAG3'	300FW/200RV		60
		RV		
		5'TCCTGTTGCATACCGTCTAAATC3'		
HMGB1	FW 5'TATGGCAAAAGCGGACAAGG3'	250FW/250RV		59
		RV 5'CTTCGCAACATCACCAATGGA3'		
HSPB1	FW 5'ACGGTCAAGACCAAGGATGG3'	250FW/200RV		59
		RV 5'AGCGTGTATTTCCGCGTGA3'		
HPTR1	FW 5'CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT3'	250FW/250RV		60
		RV		
		5'AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA3'		

3.5.3 Análise dos alvos de Transição Epitélio-mesenquimal

A análise de genes de transição epitélio-mesenquimal foi realizada com a RT² Profiler™ PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) (Qiagen, cat. 330231), os alvos organizados de acordo com a tabela a seguir 9.

Tabela 9: Desenho da placa e genes utilizados no ensaio de expressão relativa para definição do perfil epitélio-mesenquimal dos esferoides:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	s	12
A	AHNAK	AKT1	BMP1	BMP2	BMP7	CALD1	CAMK2N1	CAV2	CDH1	CDH2	COL1A2	COL3A1
B	COL5AA2	CTNNB1	DSC2	DSP	EGFR	ERBB3	ESR1	FIIR	FGFBP1	FN1	FOXC2	FZD7

C	GNG11	GSC	GSK3B	IGFBP4	ILIRN	UK	ITGAS	ITGAV	ITGB1	JAG1	KRT14	KRT19
D	KRT7	MAPI1B	MMP2	MMP3	MMP9	MSN	MSTIR	NODAL	NOTCH1	NUDT13	OCLN	PDGFRB
E	PLEK2	PPPDE2	PTK2	PTP4AAI	RAC1	RGS2	SERPINE1	SIP1	SMAD2	SNAI1	SNAI2	SNAI3
F	SOX10	SPARC	SPP1	STAT3	STEAP1	TCF3	TCF4	TFPI2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TIMP1
G	TMEFF1	TMEM132A	TSPAN13	TWIST1	VCAN	VIM	VPS13A	WNT11	WNT5A	WNT5B	ZEB1	ZEB2
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLPO	HGDC	NRT	NRT	NRT	NT	NT	NT

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo celular

As linhagens Hs 578T e MDA-MB-231 são classificadas sob o mesmo subtipo de câncer de mama triplo negativo, no entanto, não possuem muitas semelhanças. A Hs 578T é de crescimento lento em monocamada; e em suspensão, a formação dos esferoides acontece nas primeiras 24 horas. Já a MDA-MB-231 apresenta rápido crescimento em monocamada, porém, em suspensão, os esferoides começam a se formar após o terceiro dia de cultivo, quando a formação acontece (Figura 13). Esferoides de MDA-MB-231 possuem tamanho de até 100µm, e os de Hs 578T apresentaram em média 400µm (Figura 14).

Figura 13: Microscopia ótica dos cultivos de esferoides das linhagens Hs 578T e MDA-MB-231 em suspensão.

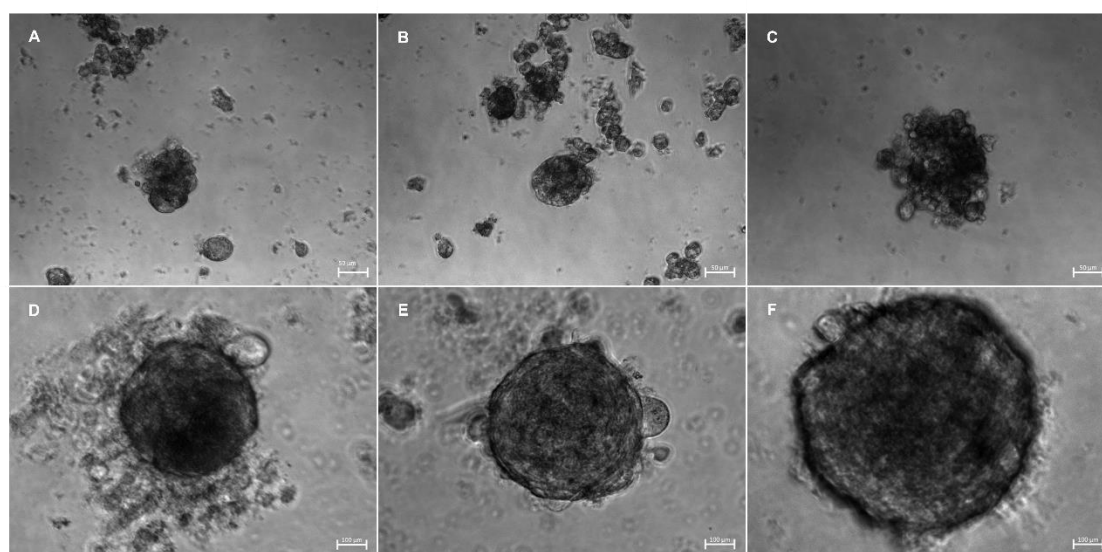


Figura 13: Cultivo de esferoides em suspensão. A: 5° dia de cultivo de MDA-MB-231. B: 10° dia de cultivo de MDA-MB-231. C: 13° dia de cultivo de MDA-MB-231. D: 3° dia de cultivo de Hs 578T. E: 5° dia de cultivo de Hs 578T. F: 7° dia de cultivo de Hs 578T.

Figura 14: Progressão de crescimento dos esferoides de TNBC.

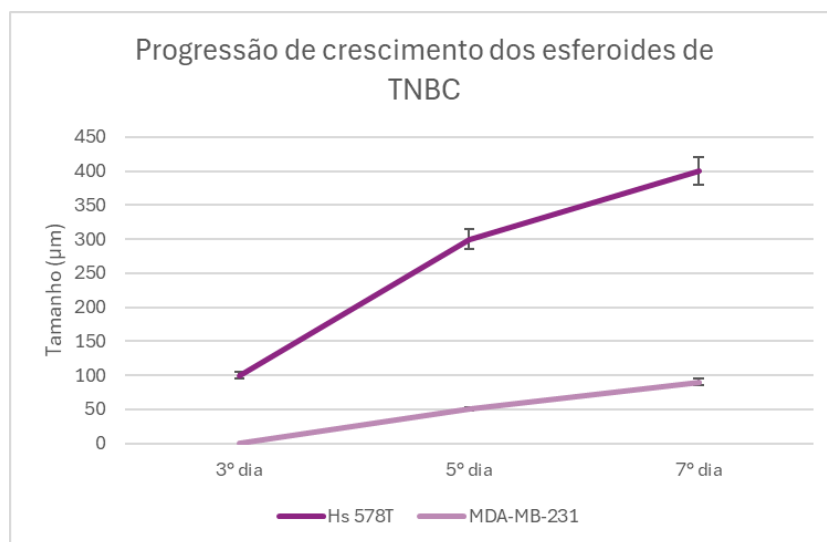


Figura 14: Linha de progressão de crescimento dos esferoides de MDA-MB-231 e Hs 578T.

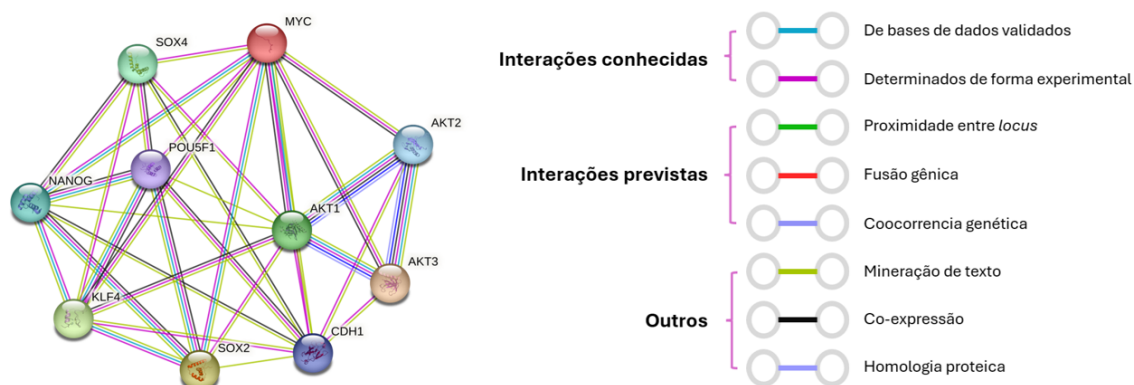
4.2 Expressão gênica relativa

Alvos relacionados às vias de pluripotência e desenvolvimento tumoral escolhidos foram avaliados a partir de seus níveis de interações proteicas por meio do software STRING (<https://string-db.org/>) (Figuras 15 e 20), e sua expressão gênica calculada por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.2.1 Pluripotência

Na figura 15, foi realizado análise STRING para os alvos de pluripotência avaliados nesse trabalho, mostrando o nível de interação entre eles de acordo com a cor das linhas que ligam os alvos.

Figura 15: Grau de interação dos alvos escolhidos para a qPCR demonstrado pelo software de interações proteicas, STRING.



Fonte: STRING.

Células-tronco do câncer de mama (BCSCs) são uma subpopulação de células cancerígenas que (i) expressam fatores de pluripotência, também conhecidos como os Fatores de Yamanaka, incluindo *KLF4*, *MYC*, *OCT4* ou *POU5F1* e *SOX2*; (ii) são caracterizadas por sua capacidade de auto-renovação; e (iii) são necessárias para a formação de tumores secundários recorrentes e/ou metastáticos (YANG *et al.* 2022).

Nos esferoides de Hs 578T (Figura 16) e MDA-MB-231 (Figura 17), pode-se observar que o tratamento com Doxorrubicina exerceu grande efeito na manutenção da pluripotência e auto-renovação das células tronco, regulando negativamente dois dos quatro Fatores de Yamanaka, *POU5F1* e *MYC*. Essa linhagem apresentou regulação positiva de outros genes importantes na pluripotência, o *NANOG*, e *AKT3*.

O fator de transcrição *POU5F1*, comumente referido como *OCT4*, é crucial para a preservação das capacidades de auto-renovação em células-tronco embrionárias (ES). Além disso, ele facilita a manutenção da capacidade de células-tronco embrionárias semelhantes a células-tronco tumorais e contribui para o início, disseminação de tumores e também para a quimiorresistência. Além disso, tumores caracterizados por expressão elevada de *POU5F1* exibiram uma

maior propensão à metástase e uma menor taxa de sobrevida global em comparação com tumores com níveis mais baixos de expressão de *POU5F1* (MOHIUDDIN *et al.* (2020).

NANOG é um fator de transcrição essencial para a manutenção da pluripotência, no entanto, ele não é expresso na maior parte dos tecidos adultos saudáveis (LU *et al.* 2014). NAGATA *et al.* (2016) demonstraram que pacientes de diferentes subtipos de mama com alta expressão desse gene apresentaram menor taxa de sobrevivência global quando comparados ao grupo controle, principalmente em TNBC.

De acordo com JIA *et al.* (2016) em ensaios utilizando nas linhagens de câncer de mama SUM190 e MCF-7 após tratamento com DOX, o fármaco ocasionou perda da habilidade proliferativa tumoral com a regulação negativa da expressão do gene *AKT1*, possivelmente prejudicando a função da via Wnt. Previamente, esse resultado já havia sido reportado por LYKHOVA *et al.* (2023), após exposição das mesmas linhagens à DOX. No entanto, em nosso trabalho com MDA-MB-231 e HS-578T houve regulação positiva dos genes *NANOG* e *AKT3*, ambos associados à resistência à fármacos, metástase e mau prognóstico. Esse resultado vai de encontro ao obtido por BALAHMAR *et al.* (2022), que reportou regulação negativa dos genes após aplicação do mesmo tratamento em esferoides de coriocarcinoma. As diferenças encontradas, mostram a grande heterogeneidade de resposta a quimioterapia encontrada em tumores de mama triplo negativo, mostrando o desafio em se obter modelos representativos de resposta a drogas para essa doença.

Figura 16: Expressão dos alvos de pluripotência em esferoides de Hs 578T.

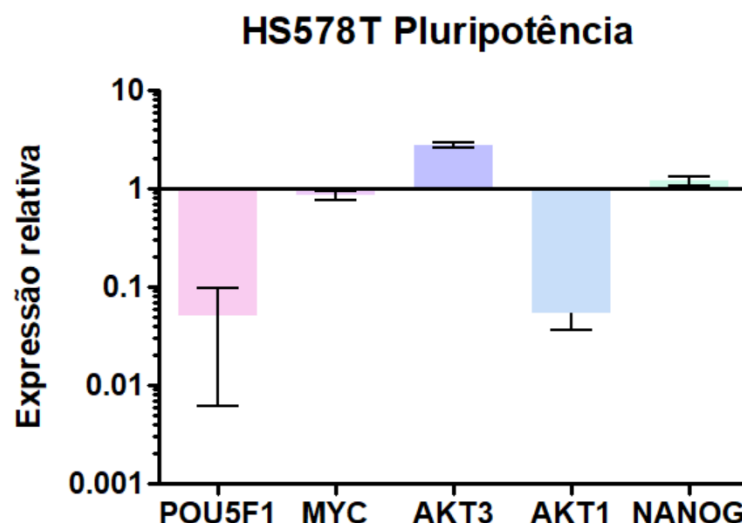


Figura 16: Análise de expressão gênica relativa de alvos de pluripotência em esferoides de Hs 578T tratados com DOX. Significância avaliada por GraphPrism (valor de $p < 0,0001$).

Em esferoides de MDA-MB-231 (Figura 17), houve regulação negativa de todos os genes expressos após a exposição por doxorrubicina.

A hipóxia é um componente do microambiente tumoral que se exacerba após tratamento por um quimioterápico, e que costuma induzir o aumento de CSCs, como foi demonstrado por YANG *et al.* (2022), onde aumento do HIF-1, fator indutor de hipóxia, regulou positivamente os genes *KLF4*, *SOX2*, *NANOG* e *POU5F1* em células de câncer de mama SUM159. Diferente do resultado obtido por YANG, em nosso estudo, o *POU5F1* sofreu regulação negativa e *SOX2*, *KLF4* e *NANOG* não foram expressos. Esse resultado sugere que em nosso modelo para MDA-MB-231 não houve enriquecimento de CSCs.

Em concordância com o resultado apresentado em ambas as linhagens nesse ensaio, MERINO *et al.* (2018) reportou regulação negativa do gene *MYC* em TNBC após tratamento com DOX. Algo que também foi demonstrado por MOREIRA *et al.* (2024), onde *MYC* também estava subexpresso em esferoides de TNBC após tratamento com DOX.

Figura 17: Expressão dos alvos de pluripotência em esferoides de MDA-MB-231.

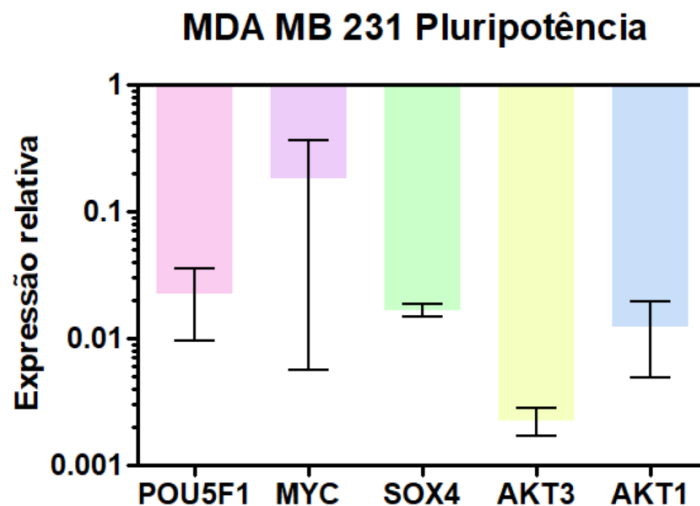


Figura 17: Análise de expressão gênica relativa de alvos de pluripotência em esferoides de MDA-MB-231 tratados com DOX. Significância avaliada por GraphPrism, valor de $p > 0,05$).

Hs 578T e MDA-MB-231 são linhagens de câncer de mama triplo negativo do mesmo subtipo molecular, o mesenquimal, e ainda assim, exibiram perfis completamente diferentes no ensaio de pluripotência quando tratadas com doxorubicina. Enquanto a maior parte dos genes de pluripotência sofreu regulação negativa em ambas as linhagens, na Hs 578T houve regulação positiva de genes associados à resistência quimioterápica, o que é esperado de CSCs, enquanto todos os alvos foram subexpressos em MDA-MB-231.

4.2.2 Transição epitélio-mesenquimal

Para avaliação do perfil mesenquimal dos esferoides tumorais das linhagens de TNBC Hs 578T e MDA-MB-231 após o tratamento com DOX, foi realizado um painel de 84 genes de marcadores epiteliais e mesenquimais (Figuras 18 e 19) para os dois modelos de TNBC.

No ensaio utilizando Hs 578T, o gene mais expresso foi o *TCF3*. Em células de TNBC, a alta expressão desse gene promove características associadas às células-tronco, incluindo a capacidade de formação de esferoides, auto-renovação e de iniciação tumoral, como reportado por SLYPER *et al.* (2013), que correlacionou a alta expressão desse gene à pluripotência mediada pela via Wnt. Esse resultado corresponde com a expressão dos alvos de pluripotência em

esferoides de Hs 578T observados no ensaio anterior. O *TCF3* pode reprimir genes supressores de tumor como p21 e p53, permitindo aumento da proliferação celular e sobrevivência sob estresse oncogênico. Sua expressão aberrante também é relacionada à alta atividade da via NOTCH (PUI, J.C *et al.* 1999; WENG, *et al.* 2004; WANG, Z *et al.* 2010). E assim como observado nesse ensaio, já foi reportado na literatura a regulação positiva do *TCF3* em câncer de próstata em resposta à exposição por DOX (PATEL *et al.* 2012).

Foi observado também nesse ensaio a superexpressão do alvo *NODAL* em Hs 578T que pode indicar aumento da manutenção da pluripotência e, por ser um fator de transcrição da via TGF- β , pode atuar como um supressor tumoral em seu estágio inicial, restringindo a proliferação celular. No entanto, em estágios tardios, desempenha papel importante na inibição da imunidade antitumoral, promovendo a diferenciação de células T regulatórias, aprimorando a motilidade celular e promovendo angiogênese ao mesmo tempo em que facilita a evasão imune. Foi reportado por BONDESTINE *et al.* (2016) que o silenciamento desse gene em TNBC auxilia sua resposta ao tratamento quimioterápico.

Outro gene que apresentou alta expressão foi o *FN1*, que codifica uma proteína de matriz extracelular associada à quimiorresistência. Assim como no nosso estudo, SUN *et al.* (2022) detectou aumento da expressão desse gene após tratamento, e constatou que seu silenciamento conferiu maior sensibilidade à quimioterapia em células de TNBC MDA-MB-231. Esse estudo também demonstrou que a quimiorresistência mediada por *FN1* acontece com o auxílio do *CD44*, uma proteína de membrana presente em CSCs.

Curiosamente, um dos genes de maior expressão nesse ensaio em Hs 578T foi o *OCLN*, que codifica uma proteína de junção de tecido epitelial mais comumente relacionada ao processo contrário ao EMT, o de transição mesenquimal-epitelial (MET) (CHAE *et al.* 2018). A identidade e a plasticidade das células cancerígenas são necessárias em estados de transição, como transição epitélio-mesenquimal (EMT) e também na transição mesenquimal-epitelial (MET), na iniciação, progressão e metástase do tumor primário. Os papéis funcionais de EMT e da MET podem variar com base no tipo de tumor, estado de disseminação e grau de colonização metastática Bakir *et al.* 2021. Durante a EMT, a expressão de proteínas que promovem o contato célula-célula,

como E-caderina, pode ser perdida, e marcadores mesenquimais, como a fibronectina, N-caderina e as metaloproteinases pode ser adquirido, resultando em maior capacidade de migração e invasão celular, sobretudo através da via NFkB (KANG, Y.; MASSAGUE, J. 2004), elucidando assim a regulação positiva dos genes *MMP2*, *MMP9*, *FN1* e *CDH2* encontrado em nossa análise para HS578T, assim como a subexpressão de genes marcadores para características epiteliais, como o *CDH1*, que já foi reportado em outros estudos com o mesmo subtipo de câncer de mama (CHUN *et al.* 2017; PARAMANANTHAM *et al.* 2021) e em que foi demonstrada a associação desses resultados com as vias TGF- β e PI3K/AKT (CHEN *et al.* 2013).

Figura 18: Expressão gênica relativa do perfil epitélio-mesenquimal de esferoides de Hs 578T.

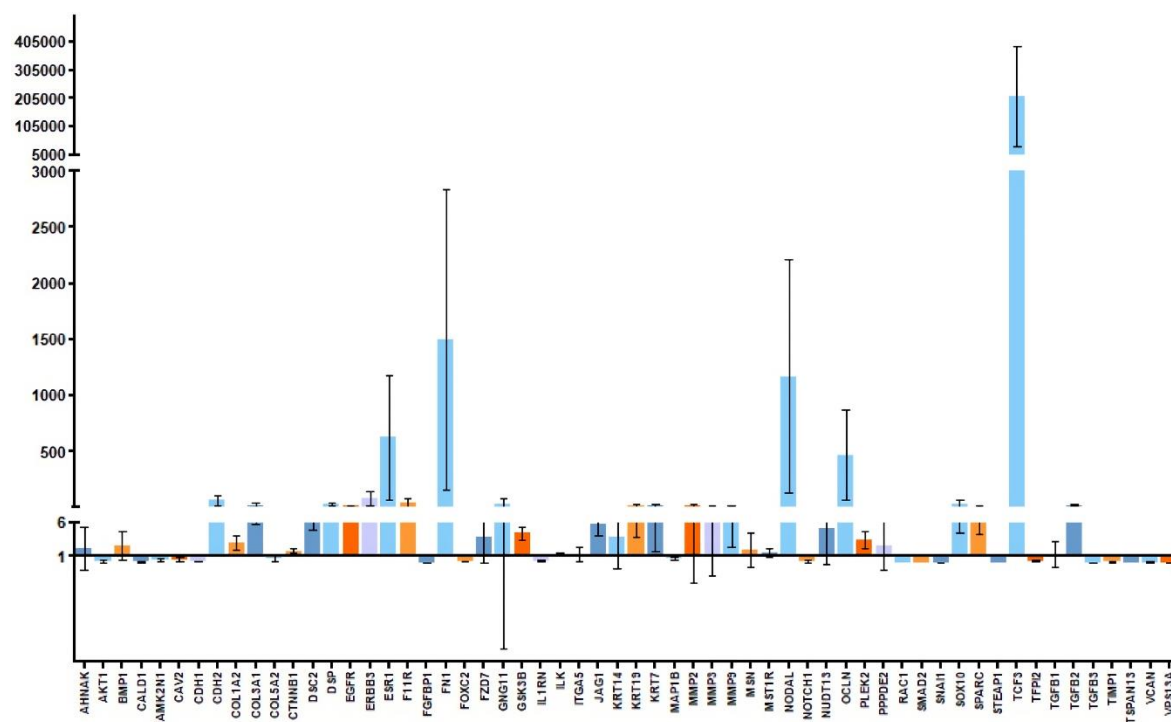


Figura 18: Análise de expressão gênica relativa de genes de EMT em esferoides de Hs 578T tratados com DOX. Significância avaliada por GraphPrism (valor de $p < 0,0001$).

Esferoides de MDA-MB-231 pós-tratamento (Figura 19) apresentaram superexpressão de *SIP1*, proteína associada a um prognóstico ruim e aumento do potencial metastático (VANDAMME *et al.* 2020). Outros resultados importantes nesse ensaio com MDA-MB-231 são o aumento expressivo dos genes *STAT3*, *NOTCH1*, *STEAP1* e *PTK2*.

STAT3 é um gene integral na via JAK/STAT, que pode elevar a taxa de crescimento e a capacidade migratória das células tumorais e induzir resistência à medicamentos. Similar ao resultado obtido nesse ensaio, MOREIRA *et al.* (2018) também observou aumento expressivo de *STAT3* em outra linhagem de TNBC, a BT-549, após tratamento com doxorrubicina. Provando o papel desse gene na regulação da EMT, XIONG *et al.* (2012) demonstrou em células de carcinoma colorretal que o silenciamento do *STAT3* regulou positivamente o marcador epitelial E-caderina e negativamente o marcador mesenquimal N-caderina, e que a superexpressão do *STAT3* reverteu a regulação negativa da N-caderina e expressou positivamente outro marcador mesenquimal, a vimentina. No entanto, diferente do que foi reportado em uma parte desse estudo, nosso ensaio conduzido em MDA-MB-231 apresentou regulação negativa do gene VIM. Outros estudos por JUNK *et al.* (2017) e JIM (2020) relacionaram a quimiorresistência apresentada pela ativação da via JAK/STAT à aquisição de propriedades de CSC pelas células por cooperação do TGF- β /STAT3/SMAD3.

Ainda em relação a propriedades de CSCs, a linhagem MDA-MB-231 apresentou alta expressão do gene NOTCH1, um marcador de CSC promotor de EMT e gene que interage com diversas vias de pluripotência (MOHAMED *et al.* 2019). Em estudo publicado por IBRAHIM *et al.* (2022), é correlacionada a expressão de NOTCH1 com a de OCT4/POU5F1 em carcinoma gástrico, no entanto, diferente do que foi apresentado nesse estudo, a MDA-MB-231 apresentou alta expressão de NOTCH1 e regulação negativa de POU5F1 após tratamento com doxorrubicina, como pode ser observado no ensaio de pluripotência anteriormente mencionado.

Outro gene altamente expresso em MDA-MB-231 é o *STEAP1*, um antígeno de superfície cuja baixa expressão está associada à malignidade e mau prognóstico no câncer de mama (XIE *et al.* 2019). Segundo Xi, a regulação negativa do *STEAP1* em tecidos de câncer de mama aumentou a expressão de marcadores mesenquimais, como *MMP2*, *MMP9*, *MMP13*, *VIM*, e *CDH2*, classificando a ação desse gene como epitelial. Diferente desse artigo, a MDA-MB-231 em nosso estudo, obteve regulação positiva do *STEAP1*, o que indica que a regulação negativa de diversos marcadores mesenquimais como *VIM*, *ZEB2* e *MMP9* seja proveniente da mediação do *STEAP1*.

PTK2, também conhecido como FAK, codifica uma proteína essencial para o controle da adesão celular mediada por integrina, e foi regulada positivamente em MDA-MB-231 após tratamento. Em estudo por LUO *et al.* (2018), a alta expressão desse gene em células de MDA-MB-231 foi associada à perda de adesão e regulação positiva de marcadores de EMT através de interação com a via FAK/PI3K/AKT, envolvida no processo de EMT e na pluripotência.

Hs 578T e MDA-MB-231 são linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo do mesmo subtipo mesenquimal, e de fato, ambas sofreram transição mesenquimal após tratamento. No entanto, as duas apresentaram padrões de expressão diferentes para os genes avaliados.

Figura 19: Expressão gênica relativa do perfil epitélio-mesenquimal de esferoides de MDA-MB-231.

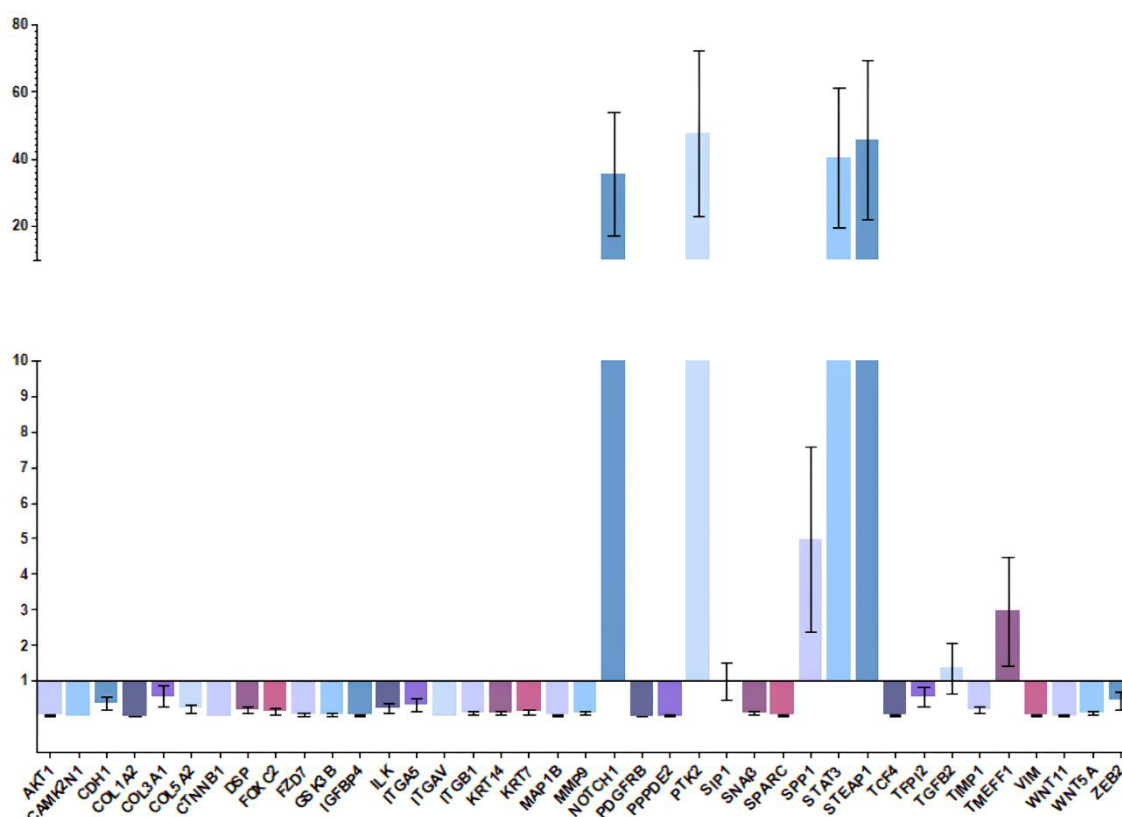


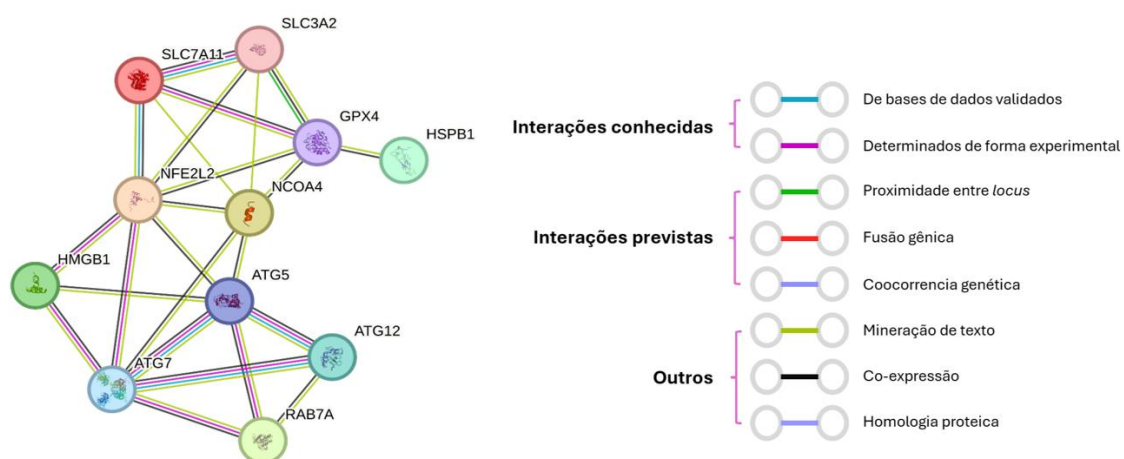
Figura 19: Análise de expressão gênica relativa de genes de EMT em esferoides de MDA-MB-231 tratados com DOX. Significância avaliada por GraphPrism (valor de $p < 0,0001$).

Nesse ensaio foi possível observar a relação intrínseca entre a transição epitélio-mesenquimal e as células tronco do câncer. O processo de EMT induz a aquisição de características de CSCs, e as CSCs, por sua vez, são responsáveis por induzir EMT através de estímulos do microambiente tumoral e manter a resistência aos quimioterápicos (SHIBUE & WEINBERG 2019).

4.2.3 Ferroptose

Análise de expressão gênica foi conduzida em esferoides de Hs 578T e MDA-MB-231 tratados com DOX e comparados com esferoides sem tratamento, utilizando genes de ferroptose e autofagia *GPX4*, *RAB7A*, *SLC3A2*, *SLC7A11*, *HMGB1*, *HSPB1*, *NFL2E2*, *ATG5*, *ATG7* e *ATG12*. O grau de interação desses alvos é mostrado abaixo (Figura 20).

Figura 20: Grau de interação dos alvos escolhidos para a qPCR demonstrado pelo software de interações proteicas, STRING.



Fonte: STRING.

A expressão relativa dos genes avaliados para HS-578T (Figura 21), e para MDA-MB-231 (figura 22), indicam aumento da regulação por ferroptose após tratamento com DOX. No entanto, o ensaio de RT-qPCR em Hs 578T demonstrou regulação positiva do gene *GPX4*, contrastando com o que foi relatado por LIU *et al.* (2022) que atribuiu a indução da ferroptose à regulação negativa do *GPX4* e *SLC7A11* em cardiomiócitos.

O *GPX4* impede o acúmulo de peroxidases lipídicas e, consequentemente, a morte celular ferro-dependente (SUN, X *et al.* 2015; BERSUKER, K *et al.* 2019). O aumento da expressão desse gene, observado em Hs 578T juntamente com a regulação positiva *NFL2E2*, *HSPB1* e *SLC7A11* podem indicar um mecanismo da inibição da ferroptose mesmo com o aumento da expressão de genes como *NCOA4* e *RAB7A* que estão envolvidos no processo de ferrinofagia, que leva a peroxidação lipídica e consequentemente a ferroptose. No trabalho de TAKAHASHI *et al.* (2020), os autores demonstraram usando modelos esferoides de câncer de pulmão que a alta atividade de *NRF2* é necessária para a formação de esferoides

e que a perda de *NRF2* tem efeitos significativos em dois processos distintos durante a formação de esferoides: proliferação e sobrevivência das células internas nos esferoides. Em concordância com o resultado obtido em Hs 578T, MOREIRA *et al.* (2024) também reportou regulação positiva do gene *GPX4* em esferoides da linhagem triplo-negativo BT-549, sugerindo ação de um mecanismo de proteção contra indução à morte ferro-dependente.

A expressão gênica relativa em Hs 578T também mostrou aumento significativo de *HMGB1*, proteína não histona de ligação ao DNA e implicada na replicação, transcrição e reparo do DNA. Solidificando o papel desse gene como um indutor da ferroptose, WU *et al.* (2021) mostrou que a supressão de *HMGB1* confere um papel benéfico à ferroptose induzida pela glicose, oxidação excessiva e inflamação nas células mesangiais. Esse mesmo estudo demonstrou que o papel do *HMGB1* na ferroptose é dependente da expressão do *NFL2E2*, quando células com alta expressão de *HMGB1* apresentaram regulação negativa de *NFL2E2*. Diferente desses achados, o ensaio aqui apresentado demonstrou regulação positiva de ambos os genes (*HMGB1* e *NFL2E2*) na linhagem Hs 578T, em concordância com um estudo recentemente publicado por BOTTONI *et al.* (2024), onde afirmam que células de TNBC forçam a absorção de cistina através da superexpressão de *SLC7A11* a fim de induzir uma resposta ao estress oxidativo mediada pelo *NFE2L2*, que por sua vez induz a transição epitélio-mesenquimal e também um fenótipo pluripotente.

Figura 21: Gráfico de expressão relativa dos genes de ferroptose e autofagia de esferoides de Hs 578T.

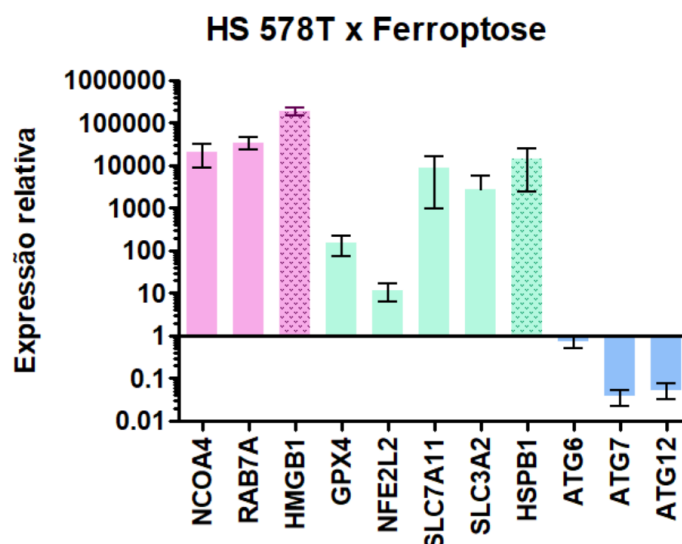


Figura 21: Análise de expressão gênica relativa de genes ferroptose e autofagia em esferoides de Hs 578T tratados com DOX. Significância avaliada por GraphPrism (valor de $p < 0,0001$).

Em concordância com os resultados apresentados no ensaio de RT-qPCR para a linhagem Hs 578T, na avaliação de alvos de ferroptose e autofagia, a regulação negativa do complexo *ATG5-12* também foi encontrado em linhagens e tecido de pacientes de TNBC após tratamento com DOX, como reportado por ZHANG *et al.* (2016) e MOREIRA *et al.* (2024). ZHANG atribuiu a proteção contra processos autofágicos como mecanismo de quimiorresistência mediado por SH3BGLH, proteína mediadora de proliferação, migração, sinalização celular dentro do microambiente tumoral e apoptose.

Nosso ensaio com Hs 578T demonstrou regulação positiva de *RAB7A*, uma proteína recrutadora de lipídeo para o autofagossomo como meio de indução da peroxidação lipídica e *NCOA4*, responsável pela degradação da ferritina (LIU *et al.* 2020). Dessa forma, a superexpressão de ambos em nosso estudo indica ação da ferroptose, como foi demonstrado por WANG *et al.* (2020). No entanto, a Hs 578T também sofreu regulação positiva de *SLC2A3*, uma proteína carreadora de cisteína para manutenção do GSH, conferindo efeito anti-ferroptotico, uma vez que a falta de GSH induz a ferroptose.

A superexpressão do gene *HSPB1* na Hs 578T pode indicar que não há necroptose atuando nesse processo celular, uma vez que esse gene é um regulador da expressão do *RIPK1* e *RIPK2*, indutores de necroptose (WU *et al.* 2019). No entanto, esse gene também age como um antioxidante, juntamente com o *SLC7A11* e *NFE2L2*, como foi estabelecido por YANG *et al.* (2023) em diversos tipos de tumores. *HSPB1* também está associado à quimiorresistência em pacientes com câncer de mama, como constatado no estudo de LIANG *et al.* (2023) que associou à alta expressão desse gene com baixa resposta à fármacos por sua ação protetora contra tipos de morte induzida.

HSPB1 e *HMGB1* também são consideradas moléculas de padrão associado a dano (DAMPs), e sua liberação causa o recrutamento de células dendríticas, o que pode levar à morte celular imunogênica, como demonstrado por TANG *et al.* (2012), AHMED & TAIT. (2020) e LIANG *et al.* (2023).

Esses dados, juntamente com a regulação negativa de todos os genes indutores de autofagia (*ATG5*, *ATG7* e *ATG12*) indicam que o tratamento com DOX suprime autofagia e possivelmente necroptose em Hs 578T, e que o

mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo que leva à ferroptose é mediado pelo *GPX4*.

Em relação aos esferoides de MDA-MB-231 (Figura 22), esse ensaio demonstrou indução de ferroptose pela alta expressão do *NCOA4*, como foi divulgado por HUANG *et al.* 2024 em seu estudo com células de MDA-MB-231. No entanto, nosso experimento também mostrou regulação positiva do gene do *SLC7A11* que, como já mencionado anteriormente, é um mecanismo de proteção da indução da ferroptose. A superexpressão de *HMGB1* em MDA-MB-231, assim como na Hs 578T, também indica indução de ferroptose, porém, diferente da Hs 578T, essa linhagem obteve expressão basal de *NFE2L2*, resultado em concordância com WU *et al.* (2021), que relatou que o *HMGB1* é um regulador do *NFE2L2*.

Figura 22: Expressão relativa dos genes de ferroptose e autofagia de esferoides de MDA-MB-231.

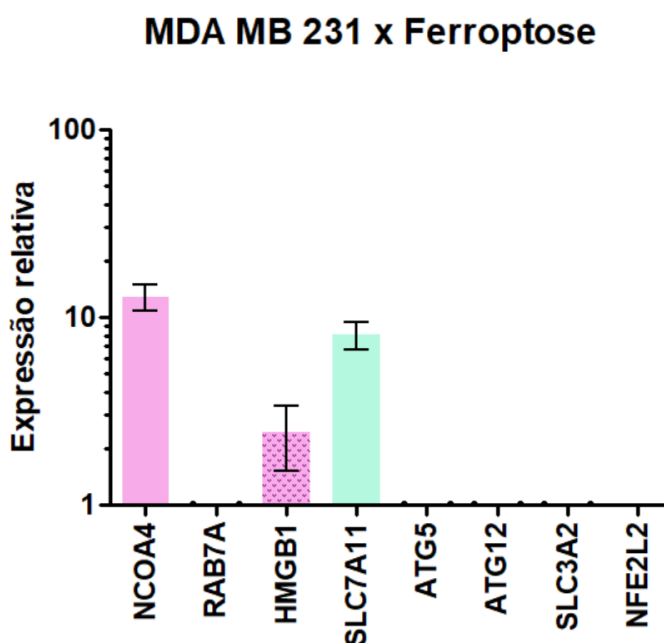


Figura 22: Análise de expressão gênica relativa de genes ferroptose e autofagia em esferoides de MDA-MB-231 tratados com DOX. Significância avaliada por GraphPrism (valor de $p < 0,0001$).

Nesse estudo, a linhagem Hs 578T apresentou maior sensibilização à ferroptose em comparação com a MDA-MB-231, no entanto, ambas as linhagens demonstraram mecanismos protetores contra essa morte celular, possivelmente por interferência de CSCs, uma vez que células pluripotentes possuem níveis mais altos de antioxidantes, como a glutatona, que neutralizam ROS e evitam a ferroptose, parcialmente por mediação do gene *NFE2L2* (ABRAKI *et al.* 2023).

Dessa forma, não foi possível inferir se de fato houve morte celular significativa, seja por ferroptose ou morte celular imunogênica, apenas podemos assumir que as vias de autofagia e necroptose não estão envolvidas nesse processo.

4.3 Citometria de Fluxo

4.3.1 Fenotipagem

Uma das formas de se identificar subpopulações de CSCs é por meio da investigação da expressão de marcadores característicos da superfície celular. O CD44 é considerado um marcador para identificar células-tronco e progenitoras em vários tecidos, incluindo células-tronco hematopoiéticas e células-tronco cancerígenas. Sua expressão está associada à manutenção da condição de tronco e à capacidade de auto-renovação. Esse marcador é frequentemente superexpresso em vários tipos de câncer e está associado à progressão tumoral, metástase e mau prognóstico, uma vez que células tumorais com alta expressão de CD44 frequentemente exibem capacidades migratórias e invasivas aprimoradas (LI *et al.* 2017).

O CD24 é uma proteína de superfície celular amplamente superexpressa em muitos tipos de tecidos tumorais e tem sido útil como um marcador diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de tumores. Por outro lado, algumas CSC apresentaram expressão reduzida de CD24 em comparação com sua progênie. Em combinação com alta expressão de CD44, a regulação negativa de CD24 foi associada a CSC e tumorigênese no câncer de mama. Ao mesmo tempo, sua superexpressão foi significativamente correlacionada com a presença de metástase de linfonodo e estágios patológicos mais avançados (ORTIZ *et al.* 2018).

Cluster de diferenciação 146 (CD146), é uma glicoproteína de membrana integral pertencente à superfamília da imunoglobulina (Ig) que foi originalmente descoberta no melanoma metastático em associação ao prognóstico ruim da doença (TANIURA *et al.* 1991). CD146 é uma molécula de adesão celular ativada por meio de interações homofílicas célula-célula ou heterofílicas célula-matriz extracelular (ECM) (FLANAGAN *et al.* 2012). Além disso, foi demonstrado que o

CD146 media a invasão de células tumorais, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e a metástase no câncer de mama (ZHENG *et al.* 2012)

O ensaio de fenotipagem realizado por citometria de fluxo com os marcadores CD44, CD24 e CD146 (Tabela 10 e Anexo 1.1, Figura 30) demonstrou baixa porcentagem de CSCs em ambas as linhagens, a população predominante consistindo em células CD44⁺/CD24⁻/CD146⁻. Dentre as CSCs, a maior subpopulação registrada foi a CD44⁺/CD24⁻. Resultado também obtivo em outro modelo de cultivo de CSCs, *scaffold* de nanofibra, apresentado por MI & XING (2015).

No câncer de mama, CD44⁺/CD24⁻/baixo de pacientes foram consideradas mais tumorigênicas do que as células CD44⁺/CD24⁺ quando implantadas em camundongos imunodeficientes diabéticos não obesos (NOD)/imunodeficiência combinada grave (SCID) (SHACKLETON *et al.* 2009). O tratamento com DOX não apresentou mudança significativa na porcentagem de subpopulações de câncer de mama, diferente do aumento populacional reportado por MOREIRA *et al.* (2018) pós-tratamento, possivelmente relacionados a diferenças de passagens em que essas amostras foram utilizadas, e as alterações moleculares acarretadas por ela. Outra possibilidade está relacionada à sensibilidade do marcador de citometria utilizado. De qualquer forma, repetições desse ensaio serão conduzidas para confirmação do resultado.

Tabela 10: Ensaio de citometria de fluxo para caracterização fenotípica da % das subpopulações celulares presentes nos esferoides da linhagem Hs 578T e MDA-MB-231.

	Hs 578T		MDA-MB-231	
	CONTROLE	DOX	CONTROLE	DOX
CD44⁺/CD24⁻	3,74	3	0	0,06
CD44⁻/CD24⁺	0,09	0,05	0,01	0,01
CD44⁻/CD24⁻	96,2	97	100	99,9

CD44⁺/CD146⁺	0	0,01	0	0,02
CD44⁺/CD146⁻	3,94	3,07	0	0,04
CD44⁻/CD146⁻	96	96,9	100	99,9
CD44⁻/CD146⁺	0,01	0	0	0

Tabela 10: Caracterização fenotípica das subpopulações de TNBC.

4.3.2 Peroxidação Lipídica

Peroxidação lipídica é a degradação de lipídeos por espécies reativas de oxigênio (ROS), culminando na formação de peróxidos lipídicos. Quando o acúmulo de peróxidos lipídicos é maior que o nível de antioxidantes atuantes na célula, ela pode sofrer indução de morte ferro-dependente, ou ferroptose. (KRUSENSTIERN *et al.* (2023)). O ensaio de peroxidação lipídica por citometria de fluxo se deu pela comparação entre o valor da peroxidação lipídica detectada por sensor em populações celulares tratadas por DOX e por um controle positivo (hidroperóxido de cumeno).

De acordo com resultados registrados na Tabela 11, a linhagem Hs 578T pós-tratamento é a única com um valor (obtido através da razão entre os valores de intensidade de fluorescência) menor que seu controle positivo, dessa forma, podemos inferir que essa é a única a sofrer peroxidação oxidativa significativa após exposição à DOX. Esse resultado é similar ao apresentado por ZHU *et al.* (2023) onde a avaliação de dano mitocondrial, peroxidação lipídica e ferroptose demonstraram que, enquanto outras linhagens celulares TNBC testadas, como a BT-549, MCF-7 E HCC1806 apresentaram alta taxa de peroxidação lipídica e ferroptose, a MDA-MB-231 em nosso estudo teve resultado moderado após tratamento com DOX (Anexo 1.2, Figura 31).

Essa análise também é compatível com a observada na expressão gênica relativa, onde os esferoides de Hs 578T demonstraram maior sensibilização à ferroptose, a notar pela maior expressão relativa de genes relacionados à morte induzida ferro-dependente após tratamento, diferente dos esferoides de MDA-MB-

231 que não apresentaram um aumento tão grande da expressão relativa dos genes de ferroptose.

Tabela 11: Citometria de fluxo para avaliação de peroxidação lipídica.

	Hs 578T	MDA-MB-231
Controle positivo	16,135	8,470
DOX	12,011	10,549

Tabela 11: Citometria de fluxo para avaliação de peroxidase lipídica. Valores (MFI) representados determinados pela razão entre a intensidade mediana da fluorescência normalizada pela amostra sem marcação e relativa ao grupo marcado avaliado.

4.4 Microscopia à laser confocal

A análise morfológica dos esferoides foi feita através de Microscopia Laser Confocal. Células foram marcadas com WGA/488 (verde), Hoechst 33342 (azul) e CD44 (vermelho).

WGA são lectinas que se ligam a ácido siálico e N-acetilglicosamina, demonstrando o perfil de glicosilação celular epitelial dos esferoides, uma vez que células epiteliais apresentam grande quantidade de glicanos que terminam em resíduos de galactose, N-acetilgalactosamina ou N-acetiglicosamina (GONÇALVES, B. O. P. 2019), núcleo em azul marcado com Hoechst e em vermelho células marcadas com CD44, representando as CSCs.

Hoechst 33342 é um corante que se interliga às áreas de grande concentração de Adenina e Timina, e o CD44 é uma glicoproteína de superfície celular associada à um subtipo de células-tronco do câncer que contém *invadopodia*, saliências ricas em actina capazes de degradar a matriz celular em BC. A CD44 permite com que células tumorais invasivas produzam *invadopodia* para promoção da metástase em resposta à estímulos do microambiente tumoral (EDDY *et al.* 2017).

Em um primeiro ensaio realizado apenas com esferoides de Hs 578T sem tratamento (Figura 23), pode-se observar a estrutura bem-organizada do núcleo

das células, além da presença de células WGA+ apenas na região periférica dos esferoides, bem como o agrupamento das células CD44+ no interior dos mesmos.

Figura 23: Fotomicrografia de esferoides de Hs 578T.

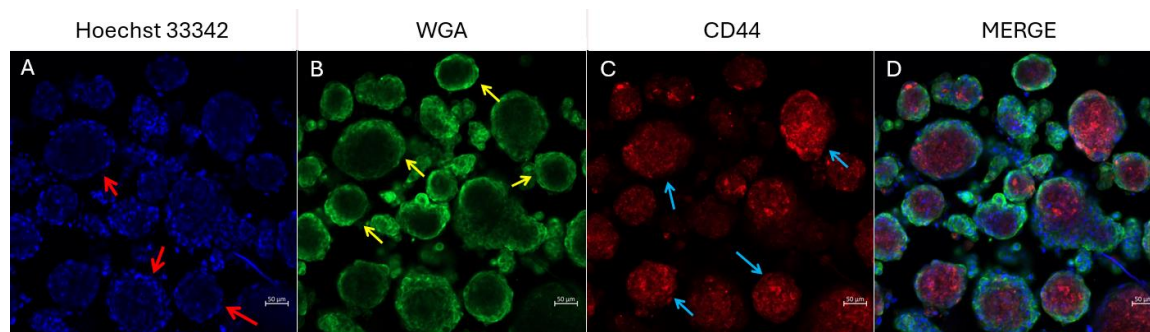


Figura 23: Fotomicrografia de esferoides de Hs 578T. **A:** em azul o núcleo marcado com Hoescht e setas azuis apontando para as estruturas nucleares. **B:** em verde as células WGA+ delimitando a periferia dos esferoides (setas amarelas). **C:** em vermelho as células CD44+ para marcação de CSCs (setas azuis). **D:** junção das marcações.

Em outro ensaio que visou comparar a estrutura morfológica dos esferoides controle e tratado de Hs 578T (Figura 24) e das células provenientes dos esferoides de MDA-MB-231, uma vez que estes se desagregaram durante o processo de lavagem (Figura 25). Em ambos os ensaios, não foi notada nenhuma alteração estrutural visível. No entanto, houve uma diminuição de 56% do tamanho médio dos esferoides de Hs 578T e 79% nas células de MDA-MB-231 (Tabela 12), após tratamento com DOX, fenômeno já observado em ensaio realizado em células e esferoides de MCF-7 e MDA-MB-231 por LOVITT *et al.* (2018).

Figura 24: Fotomicrografia de esferoides de Hs 578T antes e após tratamento com DOX.

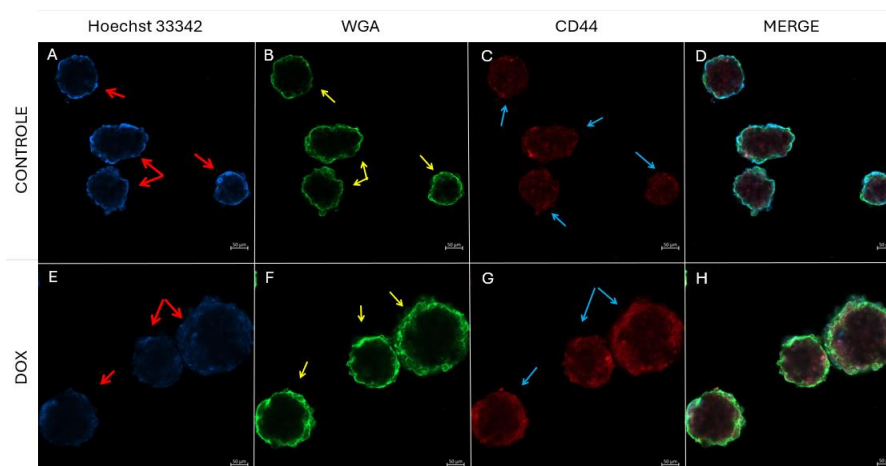


Figura 24: Fotomicrografia de esferoides de Hs 578T antes e após tratamento com DOX. **A e E:** marcação de núcleo com Hoescht. **B e F:** em verde as células WGA+ delimitando a periferia dos esferoides. **C e G:** células CD44+ para marcação de CSCs. **D e H:** junção das marcações.

Figura 25: Fotomicrografia de células derivadas de esferoides de MDA-MB-231 antes e após tratamento com DOX.

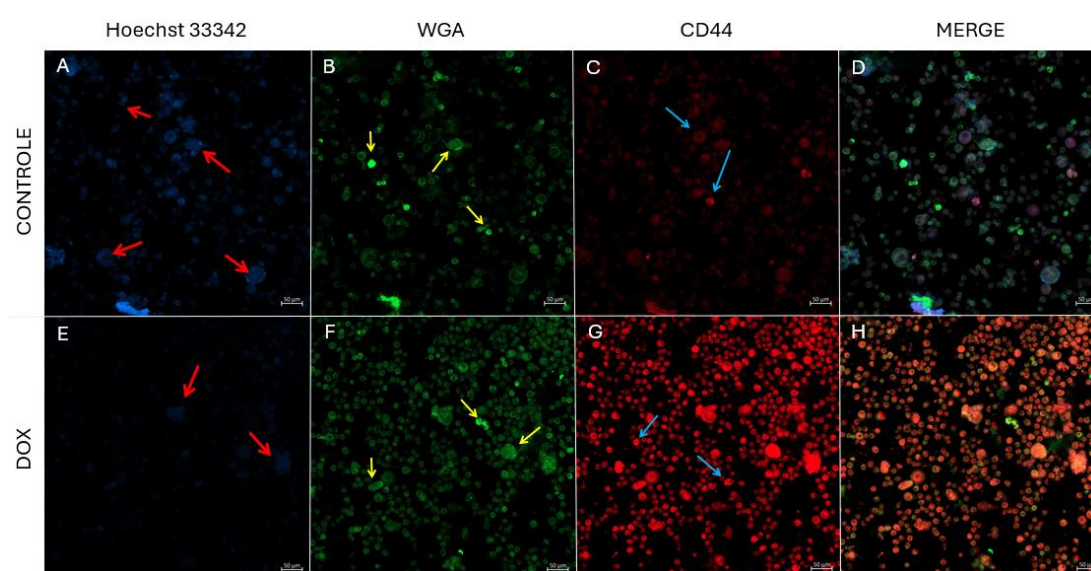


Figura 25: Fotomicrografia de células derivadas de esferoides de MDA-MB-231 antes e após tratamento com DOX. **A e E:** marcação de núcleo com Hoescht. **B e F:** em verde as células WGA+ delimitando a periferia dos esferoides. **C e G:** células CD44+ para marcação de CSCs. **D e H:** junção das marcações.

Tabela 12: Média de área dos esferoides de TNBC.

Hs 578T		MDA-MB-231	
Controle	DOX	Controle	DOX
25.780 μm^2	14.416 μm^2	369,5 μm^2	293 μm^2

Tabela 12: Medição realizada através de ferramenta do programa ZEN 3.7. O valor médio da área foi obtido através da área (μm^2) de 5 esferoides presentes por campo em três campos distintos para cada linhagem antes e após o tratamento. Desvio padrão: +/-3,6.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um modelo esquemático das alterações celulares promovidas pelo tratamento com doxorrubicina foi desenhado para cada linhagem celular, a fim de reunir os achados deste trabalho.

A análise estrutural dos esferoides em Hs 578T demonstrou as células WGA+ na periferia e as CD44+ no interior dos esferoides (Figura 26).

Figura 26: Análise estrutural dos esferoides de TNBC.

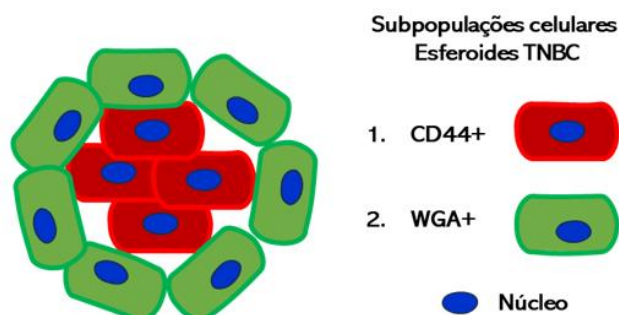


Figura 26: Modelo esquemático estrutural dos esferoides de TNBC.

De acordo com o ensaio de RT-qPCR para avaliação de alvos de pluripotência (Figura 27), esferoides de Hs-578T apresentaram regulação positiva de *NANOG* e *AKT3*, e regulação negativa de *POU5F1*, *MYC* e *AKT1*. Enquanto os esferoides de MDA-MB-231 apresentaram regulação negativa dos genes *POU5F1*, *MYC*, *AKT1*, *AKT3* e *SOX4*. Esses resultados indicam pouca mediação das CSCs, mas a diferença no padrão de expressão em linhagens do mesmo subtipo atesta à heterogeneidade do tumor.

Figura 27: Perfil fenotípico de pluripotência em células de TNBC considerando seu perfil diferencial de expressão.

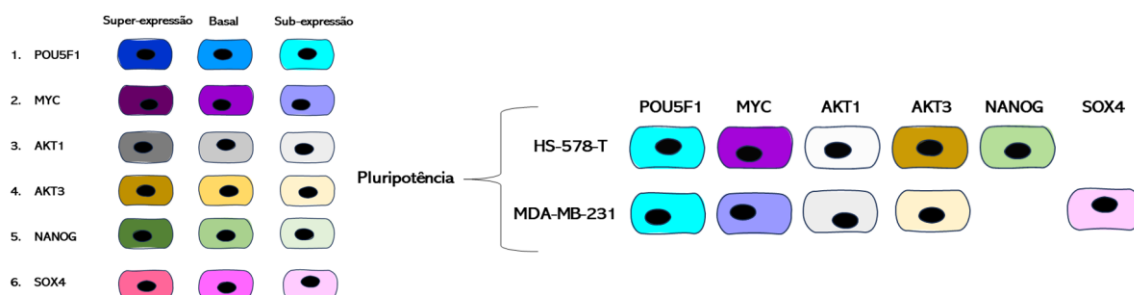


Figura 27: Modelo esquemático do perfil fenotípico de pluripotência em esferoides de TNBC.

Na avaliação do perfil fenotípico com alvos de ferroptose e autofagia (Figura 28), a Hs 578T regulou positivamente os genes *NCOA4*, *SLC7A11*, *RAB7A*, *SLC3A2*, *NFE2L2*, *HMGB1*, *HSPB1* e *GPX4*, e subexpressou *ATG6*, *ATG7* e *ATG2*. Enquanto a MDA-MB-231 regulou positivamente o *NCOA4*, *SLC7A11* e *HMGB1*, enquanto *ATG5*, *ATG12*, *RAB7A*, *SLC3A2*, *NFE2L2* e *HMGB1* apresentaram nível de expressão basal. Isso indica que em ambas as linhagens, houve ação da ferroptose após tratamento com doxorrubicina, no

entanto, houve interferência do processo de ferroptose com a ativação de genes protetores contra o estresse oxidativo mediado pelo *GPX4* e por ação de CSCs.

Figura 28: Perfil fenotípico de ferroptose em células de TNBC considerando seu perfil diferencial de expressão.

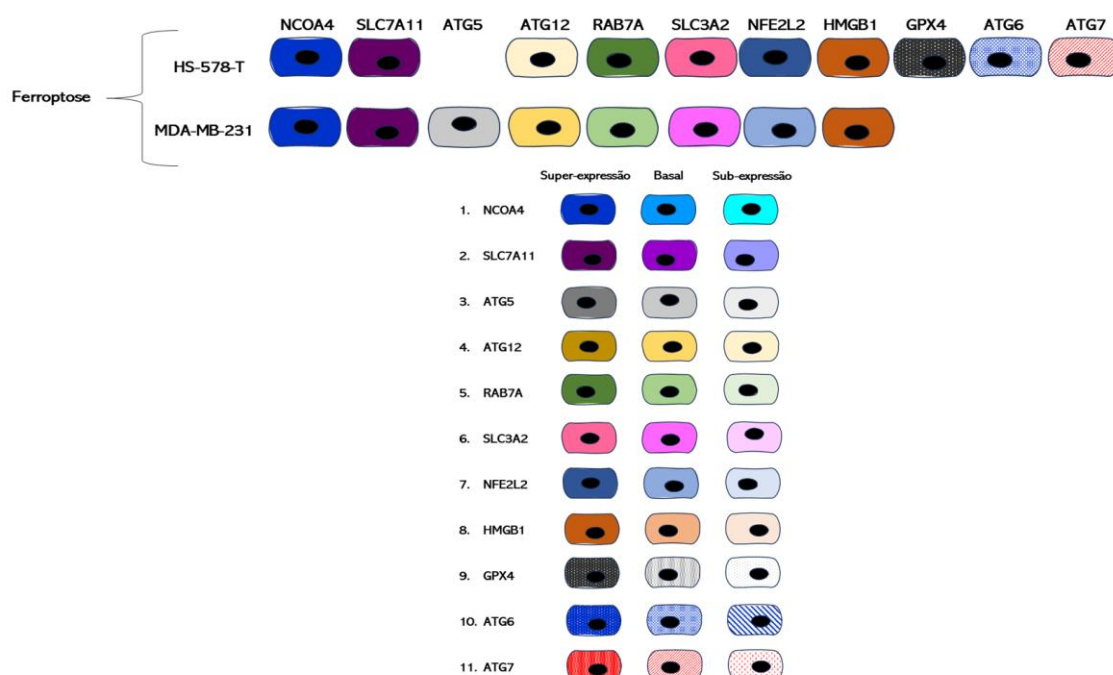


Figura 28: Perfil fenotípico de ferroptose em esferoides de TNBC.

No ensaio para análise da transição epitélio-mesenquimal (Figura 29), demonstrou a indução mesenquimal em ambas as linhagens após exposição por doxorubicina, e com destaque para os genes *TCF3*, *NODAL*, *NOTCH1* e *STAT3*, realçou a intrínseca relação entre o EMT e as CSCs, uma vez que EMT induz a aquisição de propriedades de CSCs por meio de interações com vias de pluripotência, e essas células são responsáveis pela indução do estado mesenquimal através de comunicação com o microambiente tumoral.

Figura 29: Perfil fenotípico de EMT em células de TNBC considerando seu perfil diferencial de expressão.

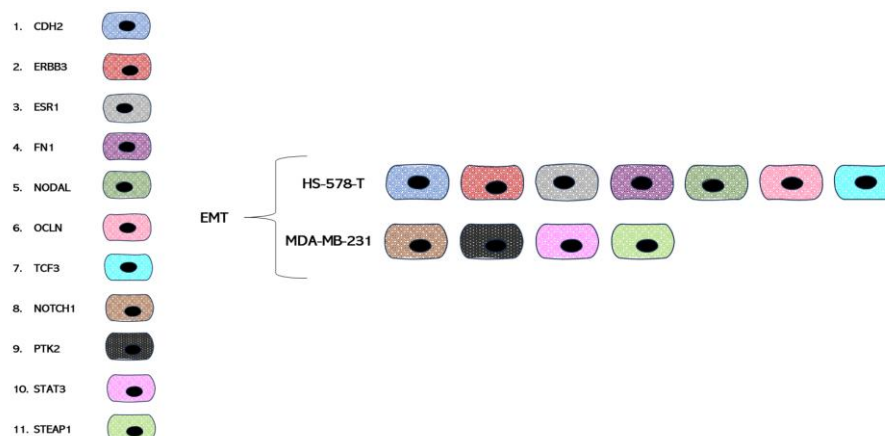


Figura 29: Perfil fenotípico de EMT dos esferoides de TNBC.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, a análise do perfil de expressão gênica dos alvos de ferroptose e autofagia mostraram que o tratamento por DOX induz ferroptose em ambas as linhagens, no entanto, mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo mediados pelo *GPX4* são acionados, especialmente na linhagem Hs 578T. A ação protetiva possivelmente é auxiliada por CSCs, uma vez que células pluripotentes possuem níveis mais altos de antioxidantes, como a glutatona, que neutralizam ROS e evitam a ferroptose, parcialmente por mediação do gene *NFE2L2*. Esse ensaio também indicou que autofagia não está envolvida no processo de morte celular induzida nas duas linhagens de TNBC testadas. A Hs 578T apresentou maior sensibilização à morte programada ferro-dependente, resultado sustentado pelo ensaio de peroxidação lipídica, onde a Hs 578T foi a única linhagem a apresentar alta taxa de peroxidação lipídica, evento imprescindível para a ferroptose. Já a linhagem MDA-MB-231 demonstrou pouca regulação positiva de alguns genes relacionados à ferroptose, e em concordância com esse resultado, peroxidação lipídica não foi detectada no ensaio de citometria de fluxo.

O painel de genes para avaliação da EMT demonstrou o fenômeno de indução da EMT por tratamento com Doxorubicina, possivelmente aumentando a probabilidade de metástase. Além disso, com a regulação positiva de genes como o *TCF3*, *NODAL*, *NOTCH1* e *STAT3* é possível inferir que esse fenômeno

está intrinsicamente relacionado às CSCs, uma vez que promove características associadas às células-tronco, conferindo ao tumor, além da capacidade invasiva e metastática, também a habilidade de auto-renovação, iniciação tumoral e quimiorresistência, como pode ser vista na incidência de tumores secundários após tratamento.

Na análise do perfil gênico em alvos de pluripotência, diversos dos genes expressos se encontraram regulados negativamente após tratamento, especialmente na MDA-MB-231, enquanto na Hs 578T houve regulação positiva de alvos relacionados à resistência quimioterápica e auto-renovação, características de CSC. Ele também atestou a heterogeneidade do tumor até dentro do mesmo subtipo molecular, uma vez que ambas as linhagens desse câncer de mama se encaixam no subtipo triplo-negativo, e no subtipo molecular do triplo-negativo denominado mesenquimal.

No ensaio de caracterização fenotípica por citometria de fluxo, a população de CSCs encontrada na Hs 578T foi extremamente baixa e nula em MDA-MB-231, o que pode explicar a regulação negativa de todos os genes nessa linhagem no ensaio de pluripotência. No entanto, o resultado apresentado no ensaio de fenotipagem foi dúvida, possivelmente por sensibilização do marcador de citometria, e ele será repetido para maior confiabilidade. De toda forma, os ensaios realizados nesse projeto auxiliam na caracterização da subpopulação CD44⁺/CD24⁻/CD146⁻, que constituem a maior parte do tumor triplo-negativo.

O ensaio morfológico demonstrou redução em área dos esferoides e células após tratamento com Doxorrubicina em ambas as, além da organização celular dos esferoides, com células WGA⁺ em sua periferia e CD44⁺ na região interna e hostil, uma vez que essas células são mais resistentes à hipóxia e pobreza nutricional. É possível que sua localização favoreça a comunicação entre as CSCs e outros componentes do microambiente tumoral, facilitando sua modulação.

As respostas variadas que as duas linhagens de TNBC exibiram aos ensaios de expressão gênica para as vias de pluripotência, EMT e ferroptose/autofagia e peroxidação lipídica atestam à heterogeneidade do tumor e demonstram como diferentes vias podem ser ativadas para garantir a

manutenção da pluripotência e sobrevivência celular, com principal ativação de genes associados às vias NOTCH, Wnt e TGF- β .

No geral, maior entendimento dos mecanismos das células-tronco tumorais dentro do microambiente tumoral é essencial para o avanço das estratégias de tratamento, melhorando os resultados dos pacientes e desenvolvendo terapias mais eficazes, adaptadas às complexidades da biologia do câncer de mama triplo-negativo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.; STEPHEN W.G. TAIT. Targeting immunogenic cell death in cancer. **Molecular Oncology**, v. 14, n. 12, p. 2994–3006, 12 nov. 2020.

ANDRIY, M.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323–334, 19 abr. 2012.

APPALARAJU, J.; EYAD, E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–11, 1 jan. 2012.

BALAHMAR, R. M. *et al.* Identification and characterisation of NANOG+/ OCT-4high/SOX2+ doxorubicin-resistant stem-like cells from transformed trophoblastic cell lines. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7054–7065, 11 jan. 2018.

BOTTONI, L. *et al.* NRF2 activation by cysteine as a survival mechanism for triple-negative breast cancer cells. **Oncogene**, v. 43, n. 22, p. 1701–1713, 10 abr. 2024.

BREGENZER, M. *et al.* The Role of the Tumor Microenvironment in CSC Enrichment and Chemoresistance: 3D Co-culture Methods. **Methods in Molecular Biology**, p. 217–245, 17 dez. 2021.

Cancer Stem Cells | GeneTex. Disponível em: <<https://www.genetex.com/Research/Overview/cancer/Cancer-Stem-Cells>>.

Acesso em: 27 out. 2024.

CHAE, Y. K. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 13 fev. 2018.

DAI, E. *et al.* Autophagy-dependent ferroptosis drives tumor-associated macrophage polarization via release and uptake of oncogenic KRAS protein. **Autophagy**, v. 16, n. 11, p. 2069–2083, 10 jan. 2020.

DALTON, S. Signaling networks in human pluripotent stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 2, p. 241–246, 22 out. 2012.

DENIZ ARIK *et al.* Prognostic Significance of CD24 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 2, p. 409–416, 13 out. 2016.

EDDY, R. J. *et al.* Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 8, p. 595–607, ago. 2017.

FANG, X. *et al.* Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 7, p. 2672–2680, 28 jan. 2019.

FLANAGAN, K. *et al.* Laminin-411 Is a Vascular Ligand for MCAM and Facilitates TH17 Cell Entry into the CNS. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40443–e40443, 6 jul. 2012.

GOLDSTEIN, L. J. *et al.* A window-of-opportunity trial of the CXCR1/2 inhibitor reparixin in operable HER-2-negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, 10 jan. 2020.

GONÇALVES, B. O. P, Análise da heterogeneidade celular e participação do fenômeno de transição epitéliomesenquimal (EMT) na carcinogênese e quimioresistência de células de glioblastoma e neuroblastoma. **Dissertação de mestrado**, Programa de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 144p, 2019.

GUENTHER, M. G. Transcriptional Control of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. **Epigenomics**, v. 3, n. 3, p. 323–343, 1 jun. 2011.

HARRIS, M. A. *et al.* Towards targeting the breast cancer immune microenvironment. **Nature reviews. Cancer**, 5 jul. 2024.

HUANG, G. *et al.* Salidroside sensitizes Triple-negative breast cancer to ferroptosis by SCD1-mediated lipogenesis and NCOA4-mediated ferritinophagy. **Journal of Advanced Research**, set. 2024a.

HUANG, G. *et al.* Salidroside sensitizes Triple-negative breast cancer to ferroptosis by SCD1-mediated lipogenesis and NCOA4-mediated ferritinophagy. **Journal of Advanced Research**, 1 set. 2024b.

HUANG, G. *et al.* Salidroside sensitizes Triple-negative breast cancer to ferroptosis by SCD1-mediated lipogenesis and NCOA4-mediated ferritinophagy. **Journal of Advanced Research**, 1 set. 2024c.

IBRAHIM, D. *et al.* Prognostic value of NOTCH1 and OCT4 in gastric carcinoma. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 328–328, 1 jan. 2022.

JAGGUPILLI, A.; ELKORD, E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

JENNIFER YINUO CAO; DIXON, S. J. Mechanisms of ferroptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11-12, p. 2195–2209, 5 abr. 2016.

JIN, W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial–Mesenchymal Transition. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 217–217, 15 jan. 2020.

JULIÁN PIÑEIRO FERNÁNDEZ *et al.* Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4131–4131, 24 ago. 2019.

JUNG, M. *et al.* A Data Integration Approach to Mapping OCT4 Gene Regulatory Networks Operative in Embryonic Stem Cells and Embryonal Carcinoma Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10709–e10709, 20 maio 2010a.

JUNG, M. *et al.* A Data Integration Approach to Mapping OCT4 Gene Regulatory Networks Operative in Embryonic Stem Cells and Embryonal Carcinoma Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10709–e10709, 20 maio 2010b.

JUNK, D. J. *et al.* Oncostatin M promotes cancer cell plasticity through cooperative STAT3-SMAD3 signaling. **Oncogene**, v. 36, n. 28, p. 4001–4013, 13 mar. 2017.

K.G.K. DEEPAK *et al.* Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 153, p. 104683–104683, 9 fev. 2020.

KRISTIANSEN. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 13, 2024.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. **Cell**, v. 176, n. 1-2, p. 11–42, 1 jan. 2019.

LIANG, Y. *et al.* HSPB1 facilitates chemoresistance through inhibiting ferroptotic cancer cell death and regulating NF- κ B signaling pathway in breast cancer. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 7, 15 jul. 2023a.

LIANG, Y. *et al.* HSPB1 facilitates chemoresistance through inhibiting ferroptotic cancer cell death and regulating NF- κ B signaling pathway in breast cancer. **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 7, 15 jul. 2023b.

LIU, J. *et al.* Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation. **Cell chemical biology**, v. 27, n. 4, p. 420–435, 10 mar. 2020a.

LIU, J. *et al.* Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 4, p. 420–435, abr. 2020b.

LIU, X. *et al.* SLC7A11/GPX4 Inactivation-Mediated Ferroptosis Contributes to the Pathogenesis of Triptolide-Induced Cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–16, 16 jun. 2022.

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

LU, X. *et al.* The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. **Oncogene**, v. 33, n. 20, p. 2655–2664, 17 jun. 2013.

LUO, J. *et al.* 14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin $\alpha\beta 3$ and activating FAK/PI3K/AKT signaling. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, 9 fev. 2018.

MI, K.; XING, Z. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit phenotypic reversion in three-dimensional self-assembling peptide RADA16 nanofiber scaffold. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3043–3043, 1 abr. 2015.

MIN, C. *et al.* NF- κ B and epithelial to mesenchymal transition of cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 3, p. 733–744, 5 fev. 2008.

MOHAMED, S. Y. *et al.* The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 50, n. 4, p. 824–837, 23 ago. 2018.

MOHIUDDIN, I. S.; WEI, S.-J.; KANG, M. H. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 4, p. 165432, abr. 2020.

MOREIRA, M. P. *et al.* Spheroid-enriched model of cancer stem cells (CSCs - CD44+/CD24-/CD146-) and CD44-/CD24-/CD146- tumor cells obtained from triple-negative breast cancer cells line as an in vitro model for studies of drug targets and new therapeutic targets. **Depositors**. FUNED, UFMG. BR 10 2022 011155 3. Deposit: July 6, 2022.

MOREIRA, M. P. *et al.* Standard chemotherapy impacts on in vitro cellular heterogeneity in spheroids enriched with cancer stem cells (CSCs) derived from triple-negative breast cancer cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 734, p. 150765–150765, 30 set. 2024.

MOREIRA, M. P. *et al.* STAT3 as a promising chemoresistance biomarker associated with the CD44 +/-high /CD24 -/low /ALDH + BCSCs-like subset of the triple-negative breast cancer (TNBC) cell line. **Experimental Cell Research**, v. 363, n. 2, p. 283–290, 17 jan. 2018.

MYSORE, Y. *et al.* Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) and the Effect of Atorvastatin on it in ARPE-19 cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 2, p. 1523–1536, 22 maio 2024.

NAGATA, T. *et al.* KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. **Breast Cancer**, v. 24, n. 2, p. 326–335, 14 jun. 2016.

NASCIMENTO, R. G. DO; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, 2020.

NG, H.-H.; M. AZIM SURANI. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 490–496, 1 maio 2011.

NIDHI JYOTSANA; TA, K. T.; DELGIORNO, K. E. The Role of Cystine/Glutamate Antiporter SLC7A11/xCT in the Pathophysiology of Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 23 fev. 2022.

OH, S.-J. *et al.* Mitochondrial event as an ultimate step in ferroptosis. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, 8 out. 2022.

OLEKSANDRA LYKHOVA *et al.* Does insulin make breast cancer cells resistant to doxorubicin toxicity? **Naunyn-Schmiedeberg s Archives of Pharmacology**, v. 396, n. 11, p. 3111–3122, 25 maio 2023.

PAN, G.; THOMSON, J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. **Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 42–49, 1 jan. 2007.

PATEL, D.; CHAUDHARY, J. Increased expression of bHLH transcription factor E2A (TCF3) in prostate cancer promotes proliferation and confers resistance to doxorubicin induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, n. 1, p. 146–151, maio 2012.

SHACKLETON, M. *et al.* Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 822–829, 1 set. 2009.

SHAHNAZ BABAEI-ABRAKI; FERESHTEH KARAMALI; MOHAMMAD HOSSEIN NASR-ESFAHANI. Ferroptosis: The functions of Nrf2 in human embryonic stem cells. **Cellular Signalling**, v. 106, p. 110654–110654, 9 mar. 2023.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 611–629, 11 abr. 2017.

SLYPER, M. *et al.* Control of Breast Cancer Growth and Initiation by the Stem Cell–Associated Transcription Factor TCF3. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5613–5624, 31 out. 2012.

SUN, X. *et al.* Suppression of breast cancer-associated bone loss with osteoblast proteomes via Hsp90ab1/moesin-mediated inhibition of TGFβ/FN1/CD44 signaling. **Theranostics**, v. 12, n. 2, p. 929–943, 2022.

SUN, X.; YU, Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 10, p. 1219–1227, 21 set. 2015.

TANG, D. *et al.* PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158–175, 14 ago. 2012.

TANG, D.; KEPP, O.; KROEMER, G. Ferroptosis becomes immunogenic: implications for anticancer treatments. **OncotImmunology**, v. 10, n. 1, 29 dez. 2020.

TANIURA, H. *et al.* Purification and characterization of an 82-kD membrane protein as a neurite outgrowth factor binding protein: possible involvement of NOF binding protein in axonal outgrowth in developing retina. **The Journal of Cell Biology**, v. 112, n. 2, p. 313–322, 15 jan. 1991.

The role of ferroptosis in human diseases. Disponível em: <<https://www.ptglab.com/news/blog/the-role-of-ferroptosis-in-human-diseases/>>. Acesso em: 2 out. 2024.

TSUKASA SHIBUE; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 611–629, 11 abr. 2017.

VANDAMME, N. *et al.* The EMT Transcription Factor ZEB2 Promotes Proliferation of Primary and Metastatic Melanoma While Suppressing an Invasive, Mesenchymal-Like Phenotype. **Cancer Research**, v. 80, n. 14, p. 2983–2995, 15 jul. 2020.

WANG, Z. *et al.* The Role of Notch Signaling Pathway in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) During Development and Tumor Aggressiveness. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 745–751, 24 abr. 2010.

WU, Y. *et al.* HMGB1 regulates ferroptosis through Nrf2 pathway in mesangial cells in response to high glucose. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 2, fev. 2021.

WU, Z. *et al.* Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 8, p. 2996–3005, 4 fev. 2019.

XIE, J. *et al.* STEAP1 Inhibits Breast Cancer Metastasis and Is Associated With Epithelial–Mesenchymal Transition Procession. **Clinical Breast Cancer**, v. 19, n. 1, p. e195–e207, 30 ago. 2018.

XIONG, H. *et al.* Acidosis activates breast cancer ferroptosis through ZFAND5/SLC3A2 signaling axis and elicits M1 macrophage polarization. **Cancer Letters**, v. 587, p. 216732, abr. 2024.

XIONG, H. *et al.* Roles of STAT3 and ZEB1 Proteins in E-cadherin Down-regulation and Human Colorectal Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 8, p. 5819–5832, 29 dez. 2011.

YAN, Y. *et al.* SLC7A11 expression level dictates differential responses to oxidative stress in cancer cells. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, 21 jun. 2023.

YANG, W. *et al.* POU5F1 promotes the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by reducing the ubiquitination level of TRAF6. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 12, 7 dez. 2023.

YANG, W. *et al.* Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 317–331, 1 jan. 2014.

YANG, Y. *et al.* NARF is a hypoxia-induced coactivator for OCT4-mediated breast cancer stem cell specification. **Science Advances**, v. 8, n. 49, 9 dez. 2022.

YIN, L. *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, 9 jun. 2020.

YOUNG, R. Control of the Embryonic Stem Cell State. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 940–954, 1 mar. 2011.

YU, Y. *et al.* Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, 26 jul. 2021.

ZENG, Q. *et al.* CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1127–1132, 30 dez. 2011.

ZHANG, S. *et al.* Adaptor SH3BGRL drives autophagy-mediated chemoresistance through promoting PIK3C3 translation and ATG12 stability in breast cancers. **Autophagy**, v. 18, n. 8, p. 1822–1840, 6 dez. 2021.

ANEXOS

1 Citometria de fluxo

1.1 Caracterização fenotípica

Figura 30: Populações de Hs 578T e MDA-MB-231 no ensaio de caracterização fenotípica por citometria de fluxo.

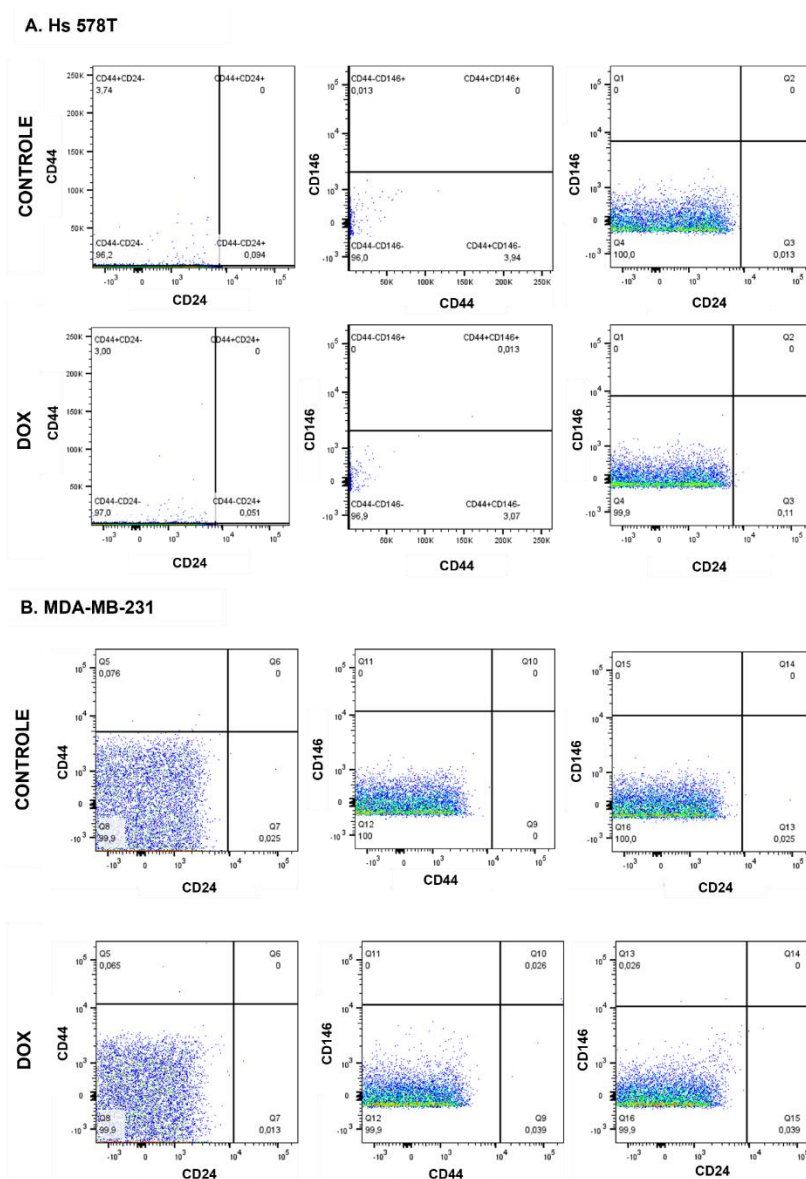


Figura 30: Caracterização fenotípica das subpopulações de Hs 578T **(A)** e MDA-MB-231 **(B)**, utilizando os marcadores de CSCs CD44, CD24 e CD146.

1.2 Peroxidação lipídica

Figura 31: Populações de Hs 578T e MDA-MB-231 no ensaio de peroxidação lipídica por citometria de fluxo.

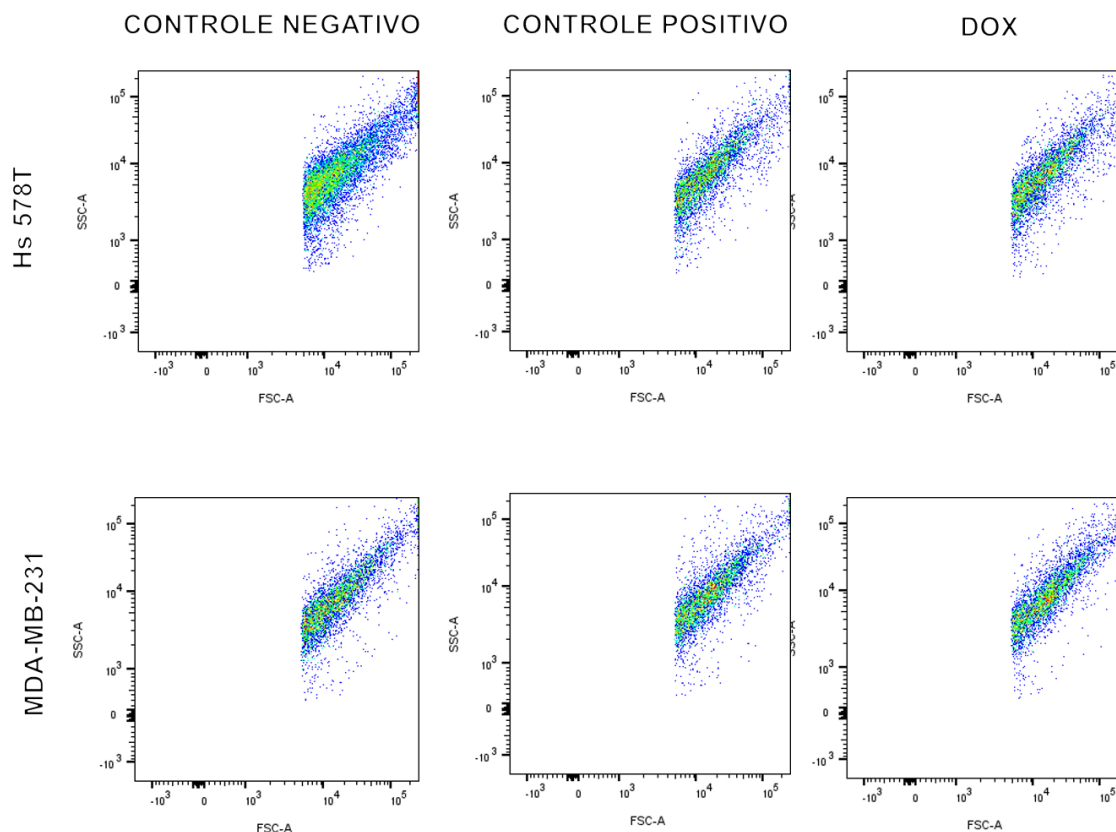


Figura 31: Populações de Hs 578T e MDA-MB-231 no ensaio de peroxidação lipídica por citometria de fluxo. Controle negativo: células de esferoides sem tratamento e marcação, somente para identificação da população, mas que não estão inclusas no cálculo de peroxidação lipídica. Controle positivo: células de esferoides não tratados com DOX que passaram por exposição de hidróxido de cumeno para indução de peroxidação lipídica. DOX: células de esferoides tratadas com doxorrubicina.

2 Divulgação científica

2.1 Certificados

Simpósios e congressos participados durante o mestrado (Figuras 32, 33, 34, 36, 37 e 38) e artigo publicado.

Figura 32: Apresentação de poster e publicação de artigo no 68º Congresso Nacional de Genética.



Figura 32: Certificado de apresentação de poster no Congresso de Genética 2023.

Figura 33: Seleção para o Programa Internacional de Pesquisa em Células-Tronco da Escola de Ciências Avançadas de São Paulo.

Approved application to SPSAS in Stem Cell Biology- Bárbara Barros

9 mensagens

Marimelia Porcionatto <stemcellschool@gmail.com>
Para: barb.avelar@gmail.com

28 de abril de 2023 às 17:34

Dear Bárbara Barros,

On behalf of the São Paulo School of Advanced Science in Stem Cell Biology (<https://www.sbbc.org.br/spsas-stemcellbiology>), we are pleased to inform you that your application was accepted!

We would like to congratulate you on your approval and hope this opportunity will strengthen your research and yield good results for your personal and professional development. You are one of the 100 selected students amongst 165 applicants. Congratulations!

We emphasize this is an event of great relevance for the national and international stem cell biology scene, where the selected candidates can establish contacts and share knowledge with researchers from 18 countries from 5 continents - South America, North America, Africa, Asia, and Europe.

As informed in the call, selected candidates will receive flight tickets, local land transport expenses (airport-hotel) and accommodation with meals.

Regarding accommodation, we remind you that the event will be held in the city of Ribeirão Preto, between the 16th and 24th of September 2023, at the [Hotel Royal Tulip JP Ribeirão Preto](#), where your reservation has already been confirmed.

Figura 33: Carta de aceite para o Programa Internacional de Pesquisa em Células-Tronco.

Figura 34: Publicação de resumo expandido no II Simpósio de Oncologia Clínico-Laboratorial.



Figura 34: Certificado de publicação de resumo expandido no Congresso Brasileiro Online de Oncologia Clínico-Laboratorial.

Figura 35: Apresentação de poster e publicação de resumo no Simpósio Internacional de Pesquisa em Células-Tronco promovido pela Sociedade Internacional em Pesquisas em Células-Tronco (ISSCR).

From Concept to Clinic: Advances in Stem Cell Research
IS SÃO PAULO

Poster Abstracts

701 - B

CHARACTERIZATION OF CD44+ CANCER STEM CELLS AND PLURIPOTENCY MODULATION IN DOXORUBICIN-TREATED CSC-ENRICHED TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER SPHEROIDS IN VITRO

Barros, Barbara Avelar Ferreira¹, Almada, Daniele², Borges, Natalia³, Anjos, Bianca⁴, Moreira, Milene⁵, Queiroz, Fabio⁴, Silva, Luciana²

¹Department of Genetics/ICB, Federal University of Minas Gerais/Ezequiel Dias Foundation, Contagem, Brazil, ²Cell Biology Service, Ezequiel Dias Foundation/University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Department of Genetics, University of Minas Gerais/Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Department of Oncology, Mario Penna Institute, Belo Horizonte, Brazil

Triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 10-20% of all breast cancer diagnoses worldwide. It is considered more aggressive than other forms of invasive breast tumors due to its ER-/PR-/HER2- phenotype, which gives patients few treatment alternatives besides chemotherapy and poor prognosis. Cancer stem cells (CSCs) are a small subpopulation of the Tumor Microenvironment (TME), involved in differentiation, migration, self-renewal and proliferation. They are resistant to chemotherapy and tend to expand after treatment, leading to recurrence,

compared to their counterparts, often leading to the formation of clusters. A qPCR assay performed on DOX-treated BT-549 spheroids displayed that genes related to pluripotency, proliferation and spheroid growth, POU5F1, AKT1 and AKT3 were upregulated, while other pluripotency targets KLF4 and MYC were downregulated. Another qPCR performed on DOX-treated MDA-MB-231 spheroids with the same targets revealed that KLF4, MYC, POU5F1, AKT1, AKT3 and SOX4 were negatively regulated. Further studies are being conducted. We believe that uncovering the main pathways that assist in CSC survival and growth is the key to developing alternative, more effective treatments for TNBC.

Keywords: cancer stem cells, triple-negative breast cancer, pluripotency

Figura 35: Publicação de resumo nos anais do Simpósio Internacional de Pesquisa Células-Tronco.

Figura 36: Apresentação de poster e publicação de resumo no XXII Congresso Brasileiro de Biologia Celular.



Figura 36: Certificado de apresentação de poster no Congresso de Biologia Celular 2024.

Figura 37: Apresentação de poster no 69º Congresso Internacional de Genética

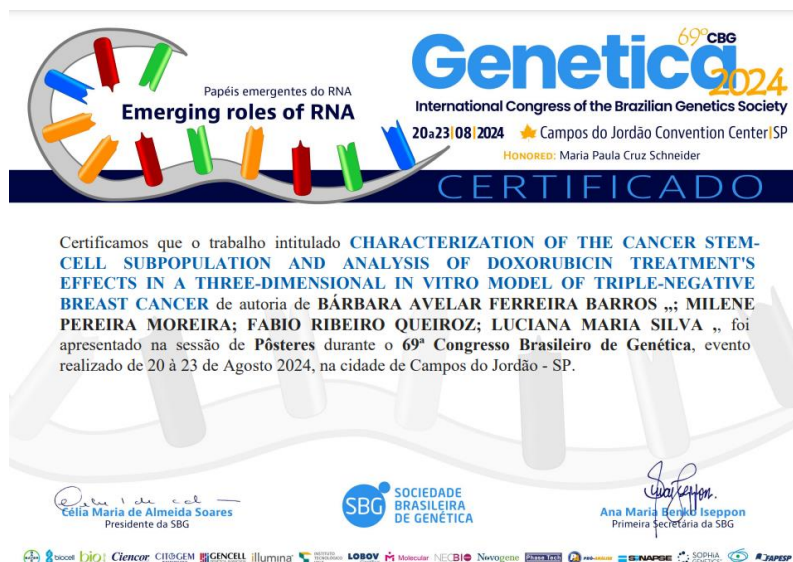


Figura 37: Certificado de apresentação de poster no Congresso Internacional de Genética 2024.

2.2 Artigo publicado:



Standard chemotherapy impacts on *in vitro* cellular heterogeneity in spheroids enriched with cancer stem cells (CSCs) derived from triple-negative breast cancer cell line

Milene Pereira Moreira^{a,*}, Eliza Pereira Franco^a, Bárbara Avelar Ferreira Barros^{a,b}, Bianca Rocha dos Anjos^{a,b}, Daniela de Gouvêa Almada^a, Isabela Nery Tavares Barbosa^a, Letícia da Conceição Braga^a, Geovanni Dantas Cassali^c, Luciana Maria Silva^a

^a Serviço de Biologia Celular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias - Rua Conde Pereira Carneiro 80, Gameleira, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30510-010, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

^c Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Triple-negative breast cancer
Cancer stem cells
Cellular heterogeneity
Chemotherapy
Spheroids
Three-dimensional culture

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer is a heterogeneous disease with high recurrence and mortality, linked to cancer stem cells (CSCs). Our study characterized distinct cell subpopulations and signaling pathways to explore chemoresistance. We observed cellular heterogeneity among and within the cells regarding phenotyping and drug response. In untreated BT-549 cells, we noted plasticity properties in both CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ hybrid cells and CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ epithelial cells, enabling phenotypic conversion into CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like like breast CSCs (BCSCs). Additionally, non-BCSCs may give rise to ALDH⁺ epithelial-like BCSCs. Enriched BCSCs demonstrated the potential to differentiation into CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ cells and exhibited self-renewal capabilities. Similar phenotypic plasticity was not observed in untreated Hs 578T and HMT-3522 S1 cells. BT-549 cells were more resistant to paclitaxel/PTX than to doxorubicin/DOX, a phenomenon potentially linked to the presence of CD24⁺ cells prior to treatment. Under the CSCs-enriched spheroids model, BT-549 demonstrated extreme resistance to DOX, likely due to the enrichment of BCSCs CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ and the tumor cells CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺. Additionally, DOX treatment induced the enrichment of plastic and chemoresistant cells, further exacerbating resistance mechanisms. BT-549 exhibited high heterogeneity, leading to significant alterations in cell subpopulations under BCSCs enrichment, demonstrating increased phenotypic plasticity during EMT. This phenomenon appears to play a major role in DOX resistance, as indicated by the presence of the refractory cells CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ BCSCs EMT-like, CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ tumor cells, and elevated STAT3 expression. Gene expression data from BT-549 CSCs-enriched spheroids suggests that ferroptosis may be occurring via autophagic regulation triggered by RAB7A, highlighting this gene as a potential therapeutic target.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is a highly heterogeneous disease classified into distinct molecular subtypes, each one with unique biological features that lead to differences in response to current therapies and clinical outcomes [1,2]. Triple-negative breast cancer (TNBC), does not benefit from the targeted therapies available nowadays; therefore,

chemotherapy remains the only systemic therapy option [3]. Overall, patients with TNBC tend to have higher rates of relapse and shorter overall survival, often within 3–5 years after diagnosis, compared to those with other types of BC [4].

The TNBC which accounts for 10–20 % of all BC cases, is characterized by significant inter- and intra-tumor heterogeneity [5,6]. Gene expression analysis has identified four TNBC molecular subtypes

* Corresponding author.

E-mail address: milene.moreira@funed.mg.gov.br (M.P. Moreira).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150765>

Received 30 July 2024; Received in revised form 27 September 2024; Accepted 28 September 2024

Available online 30 September 2024

0006-291X/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

-basal-like 1, basal-like 2, mesenchymal and luminal androgen receptor subtype-each displaying unique biological features that significantly impact in chemotherapy responses [7,8]. The cellular heterogeneity of individual tumors, refers as the intra-tumor heterogeneity, can be described in terms of functional differences and distinct phenotypes [9] and has been supported by the cancer stem cells (CSCs) theory [10].

The concept of CSCs proposes a hierarchical cellular organization within tumors, with CSCs at the highest level [11]. CSCs are capable of self-renewal and can generate a variety of highly proliferative progeny, which make up the bulk of the tumor [12]. CSCs represent a small, aggressive subpopulation of cancer stem-like cells implicated in chemoresistance, metastatic spread, and disease relapse [11,13]. The aggressive behavior of TNBC is likely driven by these chemotherapy-resistant cells, known as breast cancer stem cells (BCSCs). CD44⁺/CD24^{low} cells and ALDH⁺ cells are commonly used for the identification of putative BCSCs [14,15]. TNBC is associated with a high mortality rate due to the development of metastatic disease and resistance to current therapies. CD146 has been implicated in the tumor progression of many cancers, and recent work has shown that this molecule promotes BC progression by inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT), making it a potential therapeutic target for TNBC [16].

One model for studying BCSCs is the stem/progenitor cell-enriched assay, a three-dimensional (3D) tumor spheroids culture system. This system allows BCSCs to grow as multicellular non-adherent spheres or tumorspheres [17]. This assay attempts to reproduce tumor cellular hierarchy, encompassing both tumorigenic CSCs and their non-tumorigenic differentiated progeny [18]. The CSCs-enriched spheroids model is a promising platform for screening potential anti-CSCs drugs [19], as well as for assessing the effects of current drugs on this cell subpopulation and associated signaling pathways. The plasticity of CSCs allows them to modulate or evade metabolic and signaling pathways, allowing them to escape death and sustain growth [20]. During BC treatment, different cells types can impact therapeutic outcomes in various ways leading to alterations in the cellular composition of the tumor microenvironment post-treatment [21]. Cellular heterogeneity in tumors is often overlooked, and further research is needed to explore the signaling pathways that affect cell subpopulations and their role in predicting doxorubicin (DOX) chemoresistance. We have previously shown that *STAT3* may be linked to DOX resistance in BCSCs [22], and this gene could be a potential regulator of ferroptosis [23]. This pathway is a form of regulated cell death involving the iron-dependent accumulation of lipid hydroperoxides to lethal levels. Ferroptosis autophagy-dependent cell death represents a promising therapeutic strategy against cancer by targeting highly tumorigenic and treatment-resistant CSCs [24,25]. This pathway may help alleviate treatment resistance to anthracycline-based chemotherapy, although it may also increase toxicity [26]. Understanding how CSCs regulate ferroptosis could lead to novel therapeutic strategies and biomarkers that might help predict responses to therapies and develop personalized treatment approaches.

In that manner, in this study, we evaluated the immunophenotype of two TNBC cell lines (BT-549 and Hs 578T) and the CSCs-enriched spheroids derived from these cells. We used BCSCs markers -CD44, CD24, and ALDH- and an epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker -CD146. Further, the cells were exposed to doxorubicin (DOX) and paclitaxel (PTX) to determine their half maximal inhibitory concentration (IC50). We also assessed the expression of genes related to pluripotency, cell death, and survival after DOX treatment. We intended to characterize distinct cell subpopulations to better understand the cellular heterogeneity associated with the biological mechanisms of chemoresistance.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

BT-549 (ATCC®, HTB-122™) and Hs 578T (ATCC®, HTB-126™) TNBC cell lines, and the HMT-3522 S1 (ECACC, 98102210), a non-malignant breast cell line, were propagated in monolayer according to the manufacturer's instructions. The CSCs-enriched spheroids culture was performed as described by Moreira et al. [22]. Briefly, the cells were cultured on low-attachment plates (Corning, New York, USA) using DMEM/F-12 medium with 20 ng/mL of EGF, 10 µg/mL of bovine insulin, 2 % inactivated horse serum and 0.5 µg/mL of hydrocortisone, all obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) for seven days in a 5 % CO₂ incubator at 37 °C prior to further experiments.

2.2. Cell survival analysis

The effect of DOX and PTX on cell viability was evaluated by MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) colorimetric assay. To titrate the IC50 value of these chemotherapeutic drugs, the cell lines, propagated as monolayer and CSCs-enriched spheroids, were exposed to a range of drug concentrations (0.1562 µM–80.0 µM), increasing the concentration by 2-fold between each point. Cells were treated for 48 h before viability was measured. Untreated cells served as control. Cell survival analysis was performed as described by Moreira et al. [22]. The assays were performed in triplicate across three independent experiments and, the IC50 values were estimated based on the average cell survival data from these experiments for each drug.

The selectivity index (SI) of PTX and DOX was determined to investigate whether their cytotoxic activity was specific to cancer cells. The SI was defined as the ratio of the IC50 value in HMT-3522 S1 cells to the IC50 value in BT-549 or Hs 578T cells. The SI was calculated separately for monolayer cultures and CSCs-enriched spheroids. An SI value greater than three was considered indicative of high selectivity towards cancer cells [27].

2.3. Immunophenotyping analysis

Cell lines and CSCs-enriched spheroids were either left untreated or treated with DOX at its IC50 values for 48 h. The cells were rinsed with PBS and then treated with Trypsin-EDTA (0.25 %/0.5 mM) for 2 min at 37 °C to detach them.

BT-549, Hs 578T, and HMT-3522 S1 cells, along with those dissociated from the CSCs-enriched spheroids, were rinsed with PBS 1X and incubated with the human antibodies CD44 (APC; Immunotools, Friesoythe, Germany), CD24 (FITC; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and CD146 (PE; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The antibodies were used at the concentrations recommended by the manufacturer and diluted in labeling buffer (PBS 1X, 0.1 % sodium azide, and 1 % fetal bovine serum). The incubation was performed in the dark for 20 min at 4 °C. Isotype controls were used to establish the positivity threshold.

ALDEFLUOR™ stem cell identification (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) was conducted to identify ALDH⁺ cells, following the manufacturer's instructions. Cells were incubated at a concentration of 1×10^6 cells/mL for 40 min at 37 °C as directed.

The experiments ($n = 1$ per sample) were performed using the FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed with FACSDiva 6.1.3 software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

2.4. Reverse transcription and gene expression analysis after DOX treatment

Total RNA from both control and BT-549 CSCs-enriched spheroids cells treated with DOX at the IC50 values was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's

instructions. The RNA concentration and the 260/280 absorbance ratio were assessed with a NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Total RNA was treated with RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany) to remove any DNA contaminants. cDNA synthesis was then carried out using Script 3.0 Reverse Transcriptase (Cellco, São Carlos, SP, Brazil), following the manufacturer's instructions. Gene expression analysis was performed using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), according to the manufacturer's instructions. The analysis was performed on the QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and was carried out in duplicate. Two negative controls (with no cDNA and with no transcriptase reverse) were prepared for every set of reactions. The primers used in this study are listed in Table S1. The qPCR cycling conditions were performed as follows: 95 °C for 2 min and 40 cycles of 95 °C for 3 s, annealing temperature for 30 s. Data normalization was made using the average Cq value result obtained from the housekeeping genes *ALAS* and *HPRT1*.

2.5. Data analysis

The IC50 values for DOX and PTX were estimated using Dr Fit, version 1.042 [28]. Statistical analysis was performed with SPSS software, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), with significance determined at $p < 0.05$. Relative quantification (Rq) values for the analyzed genes were calculated using the 2(-Delta Delta C(T)) method [29]. Relative Expression Software Tool (REST© 2009), version 2.0.13 [30] (Qiagen, Hilden, Alemanha), was used to filter out differentially expressed genes. Cell survival, gene expression, and immunophenotype data were plotted using GraphPad Prism - version 5.0, SPSS software, and BioNumerics software - version 7.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), respectively.

3. Results

3.1. Immunophenotyping analysis identifies BCSCs-like subset associated with EMT marker

Table 1 presents the percentages of positive cells obtained from the immunophenotyping of BT-549, Hs 578T, and HMT-3522 S1 cell lines, both cultured as monolayers and as CSCs-enriched spheroids. In BT-549 cells, CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ cells were predominant, while other subsets represented minor and more restricted cell subpopulations. In Hs 578T cells, the main subpopulation consisted of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ cells, followed by CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ cells. For HMT-3522 S1 cells, the majority were CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ cells, with other subsets either being restricted cell subpopulations or not expressed.

Under culture conditions that promote the expansion of BCSCs subpopulations in CSCs-enriched spheroids medium, CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ and CD44⁻/CD24⁺/CD146⁻ cells were highly enriched in BT-549 CSCs-enriched spheroids. Notably, the main subpopulation of BT-549 cells disappeared in CSCs-enriched spheroids. In Hs 578T CSCs-enriched spheroids, there was an enrichment of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ and CD44⁻/CD24⁺/CD146⁻ cells, accompanied by a decrease in CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ cells. The subpopulations observed in HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids remained consistent with those in HMT-3522 S1 cells.

ALDH⁺ cells were present in all cells except Hs 578T (Table 1). However, only BT-549 CSCs-enriched spheroids and HMT-3522 S1 cells showed high ALDH activity, as indicated by the ALDEFLUOR™ assay.

Regarding individual marker expression, the majority of cells were CD24⁻ (except for BT-549); CD44⁺ for all cells; and CD146⁻ (except for BT-549 and Hs 578T).

Table 1

Immunophenotyping of cell lines and their CSCs-enriched spheroids (Percentage)^a.

Phenotype	BT-549	BT-549 CSCs-enriched spheroids	Hs 578T	Hs 578T CSCs-enriched spheroids	HMT-3522 S1	HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids
ALDH ⁺	0.1	6.2	0.0	0.4	3.0	0.1
CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /CD146 ⁻	1.2	45.5	40.7	61.8	90.07	92.50
CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /CD146 ⁺	13.0	11.3	50.5	5.6	9.56	5.70
CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /CD146 ⁻	0.5	0.1	0.5	0.2	0.02	0.91
CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /CD146 ⁺	75.4	0.0	1.2	0.0	0.01	0.03
CD44 ⁻ /CD24 ⁺ /CD146 ⁻	1.2	37.4	7.0	32.3	0.33	0.79
CD44 ⁻ /CD24 ⁺ /CD146 ⁺	3.4	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0
CD44 ⁻ /CD24 ⁺ /CD146 ⁻	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.06
CD44 ⁻ /CD24 ⁺ /CD146 ⁺	5.3	0.0	0.0	0.0	0.01	0.01
CD24 ⁺	87.9	1.6	1.2	0.3	0.0	1.8
CD24 ⁻	12.1	98.4	98.8	99.7	100.0	98.2
CD44 ⁺	90.4	53.1	92.5	57.7	99.5	98.9
CD44 ⁻	9.6	46.9	7.5	42.3	0.5	1.1
CD146 ⁺	98.1	35.3	58.1	8.0	9.7	3.9
CD146 ⁻	1.9	64.7	41.9	92.0	90.3	96.1

^a Percentages represent the proportion of positive cells for each marker (n = 1).

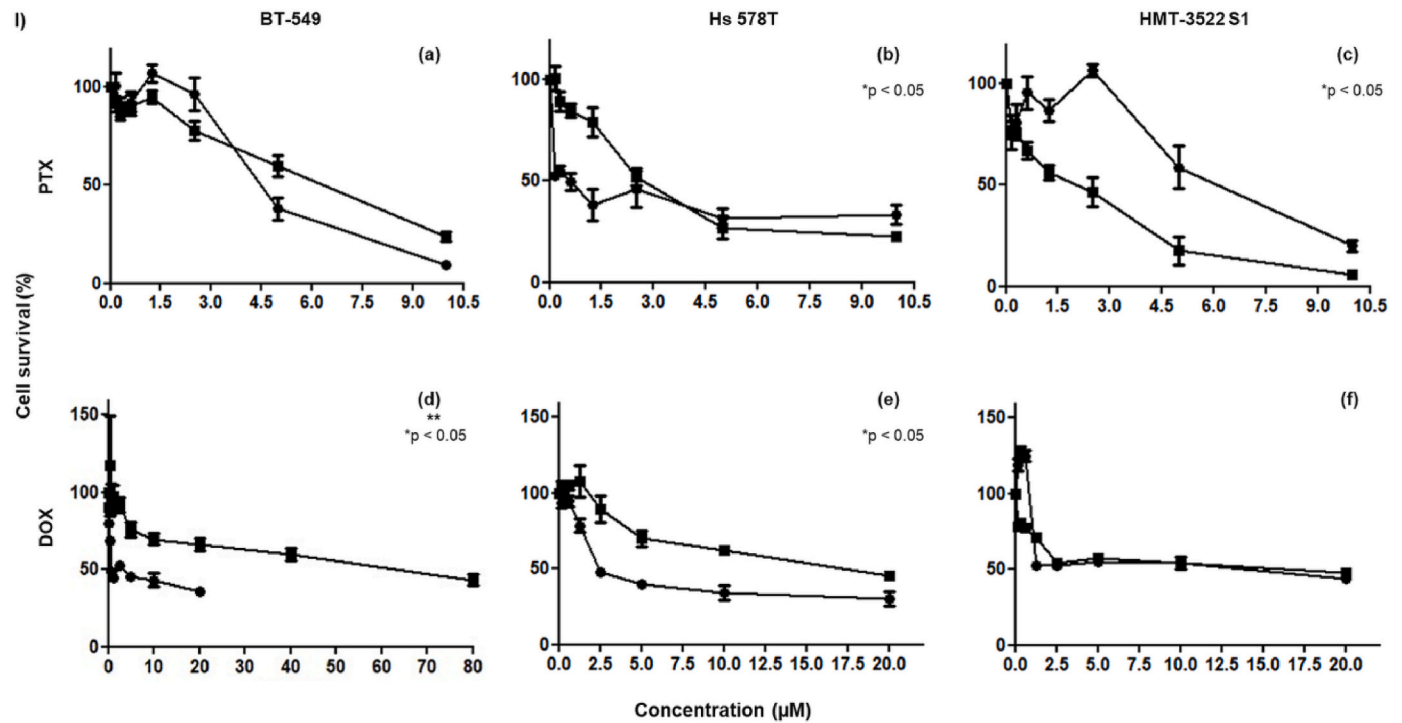
3.2. BCSCs-like subset in TNBC cell lines exhibits high resistance to DOX treatment

Our results demonstrated statistically significant differences in responses to each drug (PTX and DOX) between monolayer and CSCs-enriched spheroids cultures for BT-549, Hs 578T, and HMT-3522 S1 (Fig. 1I a-f). Exceptions were noted for BT-549 treated with PTX (Fig. 1I a) and HMT-3522 S1 treated with DOX (Fig. 1I f). IC50 values for PTX and DOX are shown in Fig. 1II. Statistical analysis revealed a significant difference between culture types (monolayer vs. CSCs-enriched spheroids) only for BT-549 treated with DOX (Fig. 1II).

Drug selectivity analysis indicated that DOX exhibits higher selectivity towards BT-549 and Hs 578T, while PTX showed higher selectivity towards Hs 578T, with SI values greater than 3 (Fig. 2I). The SI values for BT-549 treated with DOX and Hs 578T treated with PTX showed a significant statistical difference between monolayer and CSCs-enriched spheroid cultures (Fig. 2II). However, the IC50 values of DOX and PTX in CSCs-enriched spheroid cultures were highly toxic to HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids (Fig. 2I).

3.3. CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs-like subset and CD44⁻/CD24⁺/CD146⁻ cells showed high enrichment following DOX treatment

Table 2 shows the percentage of positive cells obtained from the immunophenotyping of BT-549 and HMT-3522 S1 cells treated with DOX and cultured as monolayers and CSCs-enriched spheroids. These TNBC cell lines were selected for analysis because DOX treatment showed statistical significance between the culture types (monolayer vs. CSCs-enriched spheroids) in BT-549 (Fig. 1), and HMT-3522 S1 serves as a non-malignant breast cell line control in this study. In BT-549 cells



II) IC50 (μM) mean

CELL LINES	PTX	DOX
BT-549	4.22	0.572**
BT-549 CSCs-spheroids	5.36	55.7**
Hs 578T	0.347	2.39
Hs 578T CSCs-spheroids	2.19	15.9
HMT-3522 S1	5.97	18.8
HMT-3522 S1 CSCs-spheroids	2.4	12.7

Fig. 1. Cell survival analysis of BT-549, Hs 578T, and HMT-3522 S1 cultured in monolayer and as CSCs-enriched spheroids after treatment with PTX and DOX. I) Cells treated with PTX: (a) BT-549; (b) Hs 578T; (c) HMT-3522 S1. Cells treated with DOX: (d) BT-549; (e) Hs 578T; (f) HMT-3522 S1. Monolayer culture is represented by a line with a circle, while CSCs-enriched spheroids culture by a line with a square. *Significant differences between monolayer and CSCs-enriched spheroids culture were indicated by $p < 0.05$ using ANOVA. ** The DOX data for BT-549 were sourced from our previous work, Moreira et al., 2018. II) IC50 (μM) mean values. *Significant differences between monolayer and CSCs-enriched spheroids were indicated by $p < 0.05$ using ANOVA post hoc LSD method ($n = 3$). + The DOX data for BT-549 were sourced from our previous work, Moreira et al., 2018.

treated with DOX, CD44⁺/CD24[−]/CD146[−] cells were the predominant subset, with significant enrichment observed after treatment. This was followed by CD44⁺/CD24[−]/CD146[−] and CD44⁺/CD24⁺/CD146[−] cells. Conversely, CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ cells showed a significance decrease after treatment, with decreases also observed in CD44⁺/CD24[−]/CD146⁺, CD44[−]/CD24⁺/CD146⁺, and CD44[−]/CD24[−]/CD146⁺ cells. In BT-549 CSCs-enriched spheroids treated with DOX, CD44⁺/CD24[−]/CD146[−] cells were the majority, showing enrichment after treatment. CD44⁺/CD24[−]/CD146⁺ cells decreased after treatment, followed by CD44[−]/CD24[−]/CD146⁺ and CD44⁺/CD24⁺/CD146[−] cells.

In HMT-3522 S1 cells after DOX treatment, CD44⁺/CD24[−]/CD146[−] cells remained the predominant subpopulation, although there was a slight decrease in CD44⁺/CD24[−]/CD146⁺ cells. Additionally, CD44[−]/CD24[−]/CD146[−] cells showed increased enrichment. In HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids, CD44⁺/CD24[−]/CD146[−] cells continued to be the main subpopulation after treatment, followed by an enrichment of CD44[−]/CD24[−]/CD146[−] cells, while CD44⁺/CD24[−]/CD146⁺ cells decreased.

Our analysis highlighted broad cell heterogeneity among the

subpopulations, both within and between the cell lines, in monolayer and CSCs-enriched spheroid cultures.

3.4. DOX treatment suggests ferroptosis regulated by autophagy in CSCs-enriched spheroids

Gene expression analysis was conducted on CSCs-enriched spheroids treated with DOX and compared to untreated CSCs-enriched spheroids as controls. A total of twenty-one genes (see Table S1) were analyzed and screened for differential expression using REST© 2009. The results revealed that *KLF4*, *MYC*, *ATG7*, *IL6ST*, *JAK1*, *JAK2*, and *NFKB1* were downregulated, while *POU5F1*, *NCOA4*, *GPX4*, *RAB7A*, *CFLAR*, *AKT1*, *AKT3*, and *RELA* were upregulated (Fig. 3).

4. Discussion

The study and treatment of cancer is complicated by diversity in biological properties such as cellular morphology, proliferation, cell motility, genetic alterations, and metabolism [31]. BCSCs contribute to

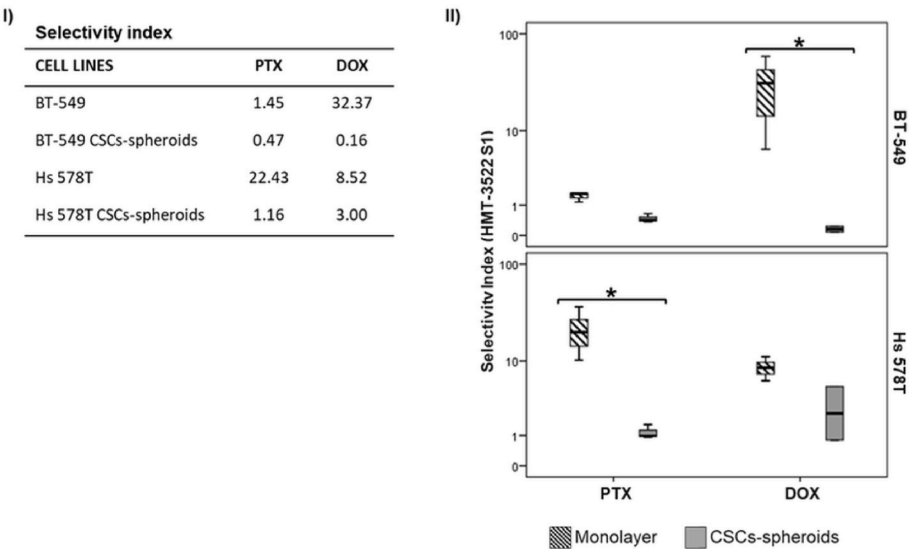


Fig. 2. Statistical box plot analysis of the selectivity index of PTX and DOX for BT-549 and Hs 578T. **I)** The selectivity index was calculated using the means of HMT-3522 S1 and HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids. **II)** Monolayer culture is represented by diagonal black lines, while CSCs-enriched spheroids culture is shown in grey. *Significant differences between monolayer and CSCs-enriched spheroids) were indicated by $p < 0.05$ using ANOVA post hoc LSD method ($n = 3$).

Table 2
1 Immunophenotyping of cell lines and their CSCs-enriched spheroids after DOX treatment (Percentage)^a.

Phenotype	BT-549 DOX- treated	BT-549 CSCs- spheroids DOX- treated	HMT-3522 S1 DOX- treated	HMT-3522 S1 CSCs-spheroids DOX-treated
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁻	57.54	43.48	85.7	92.6
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁺	1.06	0.01	0.1	0.1
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁻	16.46	0.03	0.1	0.4
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁺	0.82	0.0	0.0	0.0
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁻	23.25	56.47	14.0	6.9
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁺	0.02	0.02	0.0	0.0
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁻	0.85	0.0	0.1	0.1
CD44 ⁺ / CD24 ⁺ / CD146 ⁺	0.0	0.0	0.0	0.0

^a Percentages represent the proportion of positive cells for each marker ($n = 1$).

this diversity [32], playing key roles in chemotherapy resistance, disease recurrence, and metastasis [33]. BCSCs exhibit stem cell-like characteristics, including self-renewal and differentiation capabilities, allowing them to generate breast tumors that mirror the heterogeneity of the original tumor [14,15]. Post-chemotherapy the residual BC tumors are enriched with BCSCs [34–36], which are resistant due to factors like quiescence, apoptosis evasion, drug efflux, enhanced DNA repair, self-renewal capabilities, and the hypoxic and inflammatory microenvironment [13]. Liu et al. [37] showed that BCSCs exist in two phenotypic states: (i) the mesenchymal-like characterized as CD44⁺/CD24⁺ cells, mainly quiescent and highly invasive, and (ii) the epithelial-like

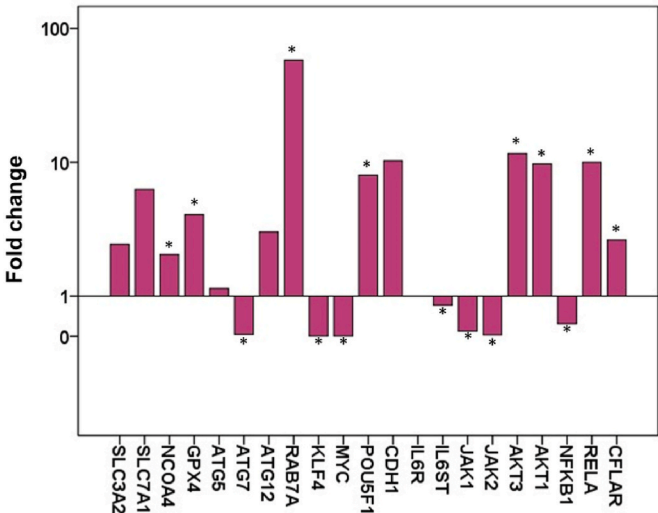


Fig. 3. Relative quantification analysis of CSCs-enriched spheroids after DOX treatment. *Significant differences for each point compared to the control were determined by REST©2009 software. Among the upregulated genes, RAB7A exhibited the highest Rq value.

identified by highly proliferative ALDH⁺ cells. BCSCs display plasticity that allows them to transit between the two states, thus supporting metastatic colonization. In contrast, CD44⁺/CD24⁺ cells are associated with epithelial cells and are largely present in distant metastases [38, 39]. Furthermore, Grosse-Wilde et al. [40] identified that CD44⁺/CD24⁺ cells had both mesenchymal and epithelial features, indicating their plasticity and ability to self-renew. Metastatic disease is the leading cause of death among BC patients [41], and almost all patients with TNBC die of this disease [4]. The key mechanism activated in cancer during metastasis is called epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT imparts mesenchymal/stem cell-like features to epithelial cells and migratory capabilities [42], establishing a strong link between EMT, BCSCs, and drug resistance [11,43]. Conversely, mesenchymal-epithelial transition (MET), trigger the cessation of cell migration, inducing cell adhesion and proliferation at the secondary site for metastatic colonization [44].

BC cells display heterogeneity in terms of the expression of cell surface markers CD44 and CD24. However, their correlation with CD146, an EMT marker [16], has yet to be assessed, to our knowledge. Therefore, to characterize the BCSCs, we used flow cytometry to analyze the expression of CD44, CD24, and CD146, along with ALDH activity. Our results underscore the cellular heterogeneity and phenotypic changes induced by our CSCs spheroid enrichment model. The HMT-3522 S1 cultivated in monolayer showed enrichment of CSCs and little variation when subjected to the spheroid assay. We suggest that what differentiates a malignant tumor from a benign one is not the cellular subpopulation but rather the benign tumor's ability to contain cells and its mechanisms of invasion and metastasis. We designed a schematic representation of tumor heterogeneity based on the percentage of cell subpopulations obtained by immunophenotyping (Fig. 4I). This model is useful to better understanding the differences within and among the cells.

The success of our stem/progenitor cell-enriched assay was evidenced by a significant increase in the BCSCs subpopulation (CD44⁺/CD24⁺) and their capacity to form non-adherent multicellular spheres. However, these enriched BCSCs were mostly CD146⁻, while BCSCs CD146⁺ either decreased or remained unchanged. Remarkably, BT-549 CSCs-enriched spheroids showed enrichment of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ tumor cells.

Grosse-Wilde et al. [40] showed a nearly complete phenotypic conversion from CD44⁺/CD24⁺ epithelial cells to CD44⁺/CD24⁺ mesenchymal cells in a stem/progenitor cell-enriched assay using normal human mammary epithelial immortalized. This plasticity was not observed in CD44⁺/CD24⁺ mesenchymal cells, however this cells was highly enriched in the culture indicating a self-renewal capacity [40]. Further research by another group [43] revealed that CD44⁺/CD24⁺ epithelial cells may not survive in non-adherent conditions but can originate from CD44⁺/CD24⁺ mesenchymal cells in monolayer culture, highlighting the dynamic nature of these cell subpopulations. Our experiments with BT-549 CSCs-enriched spheroids, showed similar phenotypic changes as described by Grosse-Wilde et al. [40], but with a role for CD146. It appears that CD44⁺/CD24⁺ and CD44⁺/CD24⁺ cells only underwent these phenotypic changes when they also expressed CD146. We propose that CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ epithelial tumor cells can undergo EMT to become BCSCs, since it is known that this process can trigger the transformation of non-BCSC into BCSC with CD146 potentially driving EMT and cancer progression [16,45,46].

The BT-549 CSCs-enriched spheroids were the only ones with high ALDH activity. Thus, the presence of BCSCs (CD44⁺/CD24⁺ and ALDH⁺) suggests the greatest tumor-initiating, aggressive, and invasive capacity of this cell line [15,37]. Grosse-Wilde et al. [40] showed that CD44⁺/CD24⁺ hybrid tumor cells and CD44⁺/CD24⁺ epithelial tumor cells produced 7.0 % and 5.7 % ALDH1⁺ progenies, respectively. We propose that these two cells are converting into CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ EMT-like BCSCs and generating ALDH⁺ epithelial-like BCSCs, which can self-renew and differentiate into non-BCSCs, such as CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ tumor cells (Fig. 4II). Furthermore, according to ATCC®, the tumor tissue that originated the BT-549 cell line had locoregional metastasis. This is in agreement with [47], which showed cleavage of CD146 from the cell surface induced by CD44, leading to an increase in soluble CD146 and subsequently invasion of BC cells. In contrast, the minor subpopulations of CD44⁺/CD24⁺ and CD44⁺/CD24⁺ cells present in the Hs 578T, in addition to the lack of ALDH expression, may led to a smaller enrichment of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ EMT-like BCSCs and ALDH⁺ epithelial-like BCSCs observed in this cell. Alternatively, the phenotypic change related to CD44/CD24 may have already occurred in the parental cell line Hs 578T.

Tumor cell heterogeneity has an impact on drug response, so we evaluable the effect of DOX and PTX, commonly used drugs in the chemotherapy of TNBC patients [48]. BT-549 cells, which predominantly express CD24⁺, were the only one more resistant to PTX compared to DOX, consistent with previous findings that CD24⁺ cells are

more resistant to taxanes, and CD24⁻ cells are more resistant to DOX [49]. Significant differences in drug sensitivity were observed only for BT-549 cells, which were 97.4 times more sensitive to DOX in monolayer culture than in CSCs-spheroids. Despite varied sensitivities, all cell lines share a high proportion of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs EMT-like cells, except BT-549 before treatment. Our recent study linked *STAT3* gene upregulation to DOX resistance in BT-549 CSCs-enriched spheroids, showing an 8.89-fold increase in expression after treatment [22].

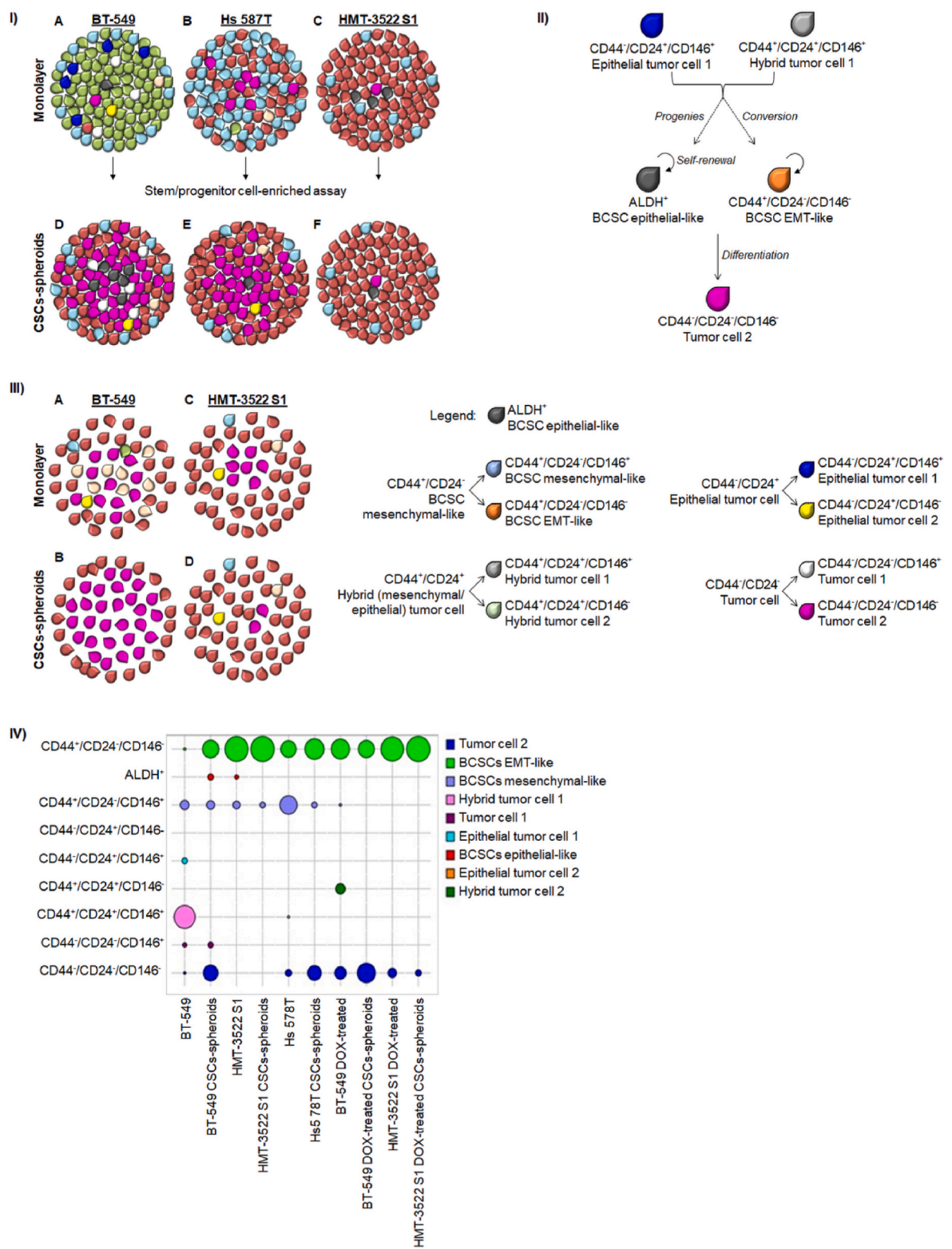
After DOX treatment (Fig. 4.III), BT-549 behaved similarly to BT-549 CSCs-enriched spheroids (untreated), with the near disappearance of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ hybrid tumor cells and enrichment of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs EMT-like and CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ tumor cells. BT-549 CSCs-enriched spheroids DOX-treated also showed enrichment of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ tumor cells. This suggests that chemotherapy promotes the growth of plastic and chemoresistant cells. Nevertheless, the role of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ tumor cells needs further investigation. HMT-3522 S1 and its CSCs-enriched spheroids treated with DOX showed similar profiles to untreated cells, with the main subpopulations remaining CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs EMT-like. It is observed that CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ tumor cells are enriched, while CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ BCSCs mesenchymal-like almost complete disappearance. In this way, after treatment, HMT-3522 S1 cells exhibits a phenotypic profile similar to that of BT-549 CSC-enriched spheroids DOX-treated.

In summary, the immunophenotyping data showed the predominant population in BT-549 consists of CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ hybrid tumor cells. In Hs 578T, the main populations are CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ BCSCs, exhibiting mesenchymal-like characteristics, and CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs, displaying EMT-like features. In HMT-3522 S1, the prevalent subpopulation comprises CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs with EMT-like traits. These findings reinforce the EMT profile of BT-549, as most cells express CD146 while lacking E-cadherin expression [22]. Furthermore, post-treatment with DOX, there is an increase in the prevalence of cell subpopulations CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ BCSCs EMT-like cells and CD44⁺/CD24⁺/CD146⁻ cells (Fig. 4IV).

Analysis of gene expression in BT-549 CSC-enriched spheroids cells after treatment with DOX reveals an upregulation of *GPX4*, the main regulator of ferroptosis [24]. This suggests a decrease in this type of cell death, as *GPX4* protects cell membranes through its activity in lipid repair [50]. Concurrently, upregulation of *NCOA4* suggests potential iron accumulation from ferritin degradation [51], while, the down-regulation of *ATG7* might limit oxidative damage [52], indicating an attenuation in the incidence of ferroptosis.

In a review about lipid metabolism, Maan and collaborators [53] discussed how lipid uptake and *de novo* lipogenesis can be enhanced in cancer cells, favoring tumor growth and metastasis. Furthermore, lipid degradation is necessary for energy generation and biomolecule synthesis. Lipid metabolism by cancer cells results in the increased accumulation of intracellular deposits of lipids on lipid droplets [53]. *RAB7A* promotes lipid droplet degradation (a process known as lipophagy) and lipid peroxidation, which in turn leads to ferroptosis [54]. This data suggests that ferroptosis may be occurring via autophagic regulation triggered by *RAB7A*. Overexpression of *RAB7A*, linked to poor prognosis in pancreatic cancer [55], was observed in our study after DOX treatment, suggesting its potential as a therapeutic target for TNBC.

Yi and collaborators [56] demonstrated that sustained activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway confers protection to cancer cells from ferroptosis in BC cell lines. In BT-549, which harbors a deletion in the *PTEN* gene (COSMIC v99) we observed upregulation of *AKT1* and *AKT3* after DOX treatment in our study. *AKT* activation could be facilitated by the expression of *PD-L1* and embryonic stem cell transcription factors like *POU5F1* (also known as *OCT4*), a gene found to be upregulated in our study. This cascade of events may contribute to the maintenance of BC stemness, as suggested by Almozayn et al. [57]. Sustained activation of the *AKT* pathway has been associated with anoikis resistance [58], a prerequisite of tumor cell metastatic potential [59]. Phosphorylation of *RELA* enhances the expression of *NFKB* target genes, such as *CFLAR*,



(caption on next page)

Fig. 4. Breast cancer cell heterogeneity model*. **I)** Schematic representation of tumor cell heterogeneity. (a) BT-549, (b) Hs 578T (c) HMT-3522 S1, (d) BT-549 CSCs-enriched spheroids, (e) Hs 578T CSCs-enriched spheroids, (f) HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids. Immunophenotyping for BCSCs markers (CD44, CD24, ALDH) and the EMT marker (CD146) is shown. Each color corresponds to a specific cell phenotype (refer to the legend on the right side of the figure). Breast cancer stem cells (BCSCs) were categorized into mesenchymal-like and epithelial-like based on the CD44⁺/CD24⁻ and ALDH⁺ subsets, respectively. Non-BCSCs were categorized as tumor cells (CD44⁺/CD24⁻ subset), epithelial tumor cells (CD44⁺/CD24⁺ subset), and hybrid tumor cells (CD44⁺/CD24⁺ subset), which exhibit both mesenchymal and epithelial characteristics. The presence of CD44 and the absence of CD146 on the cell surface were considered of EMT. **II)** Model of the dynamics of cell subpopulation transitions under the BCSCs-enriched assay in BT-549. The plasticity exhibited by CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ hybrid tumor cells and CD44⁺/CD24⁺/CD146⁺ epithelial tumor cells in the parental cell line facilitates phenotypic conversion into CD44⁺/CD24⁻/CD146⁻ BCSCs EMT-like. Additionally, these non-BCSCs have the capability to produce ALDH⁺ epithelial-like BCSCs. The enriched BCSCs can undergo differentiation into CD44⁺/CD24⁻/CD146⁻ tumor cells and self-renewal. **III)** Schematic representation of tumor cell heterogeneity following DOX treatment. (a) BT-549, (b) BT-549 CSCs-enriched spheroids, (c) HMT-3522 S1, (d) HMT-3522 S1 CSCs-enriched spheroids. Immunophenotyping for BCSCs markers (CD44, CD24) and the EMT marker (CD146) is shown. **IV)** Heterogeneity of cell subpopulations. Each color represents a cell subpopulation present in each cell line before and after treatment with DOX, and the size of the circle indicates the percentage of positive cells. Note: ALDH1 was not analyzed after DOX treatment. *The proposed model of heterogeneity is based on the observed percentages of CD44/CD24/CD146, and ALDH. The distribution of subpopulations is based on literature suggesting that mesenchymal cells are located more internally within the spheroids, while epithelial cells are positioned more externally. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

which suppress anoikis [60,61]. Thus, the upregulation of *AKT1*, *AKT3*, and *RELA* may promote the growth of BCSCs in our spheroid model, as DOX has minimal effects on anoikis-resistant cancer cells [62].

Velaie and colleagues [63] demonstrated that the inhibition of *RELA* (NFKB65) sensitizes MCF-7 cells to DOX treatment by suppressing ABC transporters activity, leading to the accumulation of intracellular DOX and a decrease in the IC50 value. Therefore, the upregulation of *RELA* after DOX treatment in our study may contribute to the significant chemoresistance. Kim et al. [64] also linked elevated *SP1* and *RELA* genes, alongside with reduced levels of *NFKB1* gene with DOX resistance and shorter 5-year distant recurrence-free survival duration in TNBC patients.

The role of *KLF4* appears to be dual, exhibiting context-dependent effects in BC: it may promote progression in low-malignancy primary ductal carcinoma cases but inhibit it in high-malignancy TNBC [65–68]. The downregulation of *KLF4* and *MYC*, a potent oncogenic driver [69,70], in our study suggests mechanisms driving aggressive behavior or progression.

Based on the data presented so far, our CSCs-enriched spheroids model correlates with the mesenchymal-like subtype of TNBC, as described by Jiang et al. (71) and Lehmann et al. (7,8). This subtype is associated with the expression of stem cell-associated genes, loss of epithelial adhesion genes, and activation of the *STAT3* signaling pathway.

5. Conclusion

Until now, no actionable targets have been identified for TNBC treatment, most likely due to the vast heterogeneity of the disease. Thus, cytotoxic chemotherapy remains the mainstay treatment for TNBC patients, resulting in poor survival rates. Drug-induced phenotypic plasticity, where BCSCs arise from the conversion of non-BCSCs conferring resistance to treatment. Recent studies have primarily evaluated tumor cells as a single unit, which fails to accurately represent the distinct roles played by each cell type, as demonstrated by our findings. Our research highlights the cellular heterogeneity both among and within the BT-549 and Hs 578T TNBC cell lines, impacting phenotyping and drug response. BT-549 cells showed pronounced heterogeneity and phenotypic plasticity under BCSC enrichment conditions. DOX treatment further promoted the growth of chemoresistant cells, underscoring its role in DOX resistance. Understanding this heterogeneity and BCSCs resistance through single-cell analysis could lead to more effective treatments and better survival rates for TNBC patients.

Our previous work linked *STAT3* to DOX resistance in BCSCs, suggesting it as a potential therapeutic target. In this study, we identified a non-BCSCs tumor cell subtype (CD44⁺/CD24⁻/CD146⁻) alongside the BCSCs subpopulation (CD44⁺/CD24⁻/CD146⁻) in CSCs-enriched spheroids model after treatment with DOX, potentially contributing to chemoresistance. Additionally, there are indications that these non-BCSC

tumor cells, through phenotypic conversion associated with the induction of EMT, may give rise to new BCSCs, complicating treatment efficacy.

Gene expression data suggest that ferroptosis, regulated by autophagy and triggered by *RAB7A* following DOX treatment, may play a role in BT-549 CSCs-enriched spheroids. *RAB7A*'s significant overexpression highlights it as a potential therapeutic target. We believe that detecting the cellular composition of the tumor microenvironment holds potential for predicting the effectiveness of BC treatments and optimizing combination therapies. In essence, these discoveries could unveil new therapeutic targets and strategies tailored to TNBC, ultimately improving patient outcomes.

Funding

This work was financially supported through grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant numbers APQ-02344-18 and APQ-01857-21], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CRedit authorship contribution statement

Milene Pereira Moreira: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis. **Eliza Pereira Franco:** Methodology. **Bárbara Avelar Ferreira Barros:** Methodology. **Bianca Rocha dos Anjos:** Methodology. **Daniela de Gouvêa Almada:** Methodology. **Isabela Nery Tavares Barbosa:** Methodology. **Leticia da Conceição Braga:** Supervision. **Geovanni Dantas Cassali:** Supervision. **Luciana Maria Silva:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the author(s) used ChatGPT 3.5 in order to improve readability and language of the work. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Milene Pereira Moreira has patent #BR 10 2022 011155 3 pending to no. Luciana Maria Silva has patent #BR 10 2022 011155 3 pending to no. Eliza Pereira Franco has patent #BR 10 2022 011155 3 pending to no. Leticia da Conceicao Braga has patent #BR 10 2022 011155 3 pending to no. Geovanni Dantas Cassali has patent #BR 10 2022 011155

3 pending to No. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Not applicable.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150765>.

References

- [1] C.M. Perou, et al., Molecular portraits of human breast tumours. [Letter], *Nature* 406 (august) (2000) 747–752.
- [2] T. Sorlie, et al., Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (19) (2001) 10869–10874.
- [3] B.D. Lehmann, J.A. Pietenpol, Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer Brian, *Breast* 24 (2) (2015) 1–11. S36–S40.
- [4] R. Dent, et al., Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence, *Clin. Cancer Res.* 13 (15) (2007) 4429–4434.
- [5] V.G. Abramson, B.D. Lehmann, T.J. Ballinger, Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy, *Cancer* 121 (1) (2015) 8–16.
- [6] G. Palma, et al., Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments, *Oncotarget* 6 (29) (2015) 26560–26574.
- [7] B.D. Lehmann, et al., Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection, *PLoS One* 11 (6) (2016) e0157368.
- [8] B.D.B. Lehmann, et al., Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies, *J. Clin. Invest.* 121 (7) (2011) 2750–2767.
- [9] M. Tellez-Gabriel, B. Ory, F. Lamoureux, M.F. Heymann, D. Heymann, Tumour heterogeneity: the key advantages of single-cell analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (12) (2016).
- [10] N.A. Fonseca, A. Filipa, V. Moura, S. Simões, J. Nuno, The cancer stem cell phenotype as a determinant factor of the heterotypic nature of breast tumors, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 113 (2017) 111–121.
- [11] A. Camero, Y. Garcia-Mayea, C. Mir, J. Lorente, I.T. Rubio, M.E. Lleonart, The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy, *Cancer Treat Rev.* 49 (2016) 25–36.
- [12] D.R. Pattabimaran, R.A. Weinberg, Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (7) (2014) 497–512.
- [13] J. Zhao, Cancer stem cells and chemoresistance: the smartest survives the raid, *Pharmacol. Ther.* 160 (2016) 145–158.
- [14] M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, M.F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (7) (2003) 3983–3988.
- [15] C. Ginestier, et al., ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome, *Cell Stem Cell* 1 (5) (2007) 555–567.
- [16] Q. Zeng, et al., CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (4) (2012) 1127–1132.
- [17] D. Ponti, et al., Isolation and in Vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties, vol. 13, 2005, pp. 5506–5512.
- [18] T. Ishiguro, H. Ohata, A. Sato, K. Yamawaki, T. Enomoto, K. Okamoto, Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications, *Cancer Sci.* 108 (3) (2017) 283–289.
- [19] C.-H. Lee, C.-C. Yu, B.-Y. Wang, W.-W. Chang, Tumorsphere as an effective *in vitro* platform for screening anti-cancer stem cell drugs, *Oncotarget* 7 (2) (2016) 1215–1226.
- [20] J.J. Loh, S. Ma, Hallmarks of cancer stemness, *Cell Stem Cell* 31 (5) (2024) 617–639.
- [21] T. Dou, et al., The cellular composition of the tumor microenvironment is an important marker for predicting therapeutic efficacy in breast cancer, *Front. Immunol.* 15 (February) (2024) 1–18.
- [22] M.P. Moreira, L. da Conceição Braga, G.D. Cassali, L.M. Silva, STAT3 as a promising chemoresistance biomarker associated with the CD44^{+/high}/CD24^{-/low}/ALDH⁺ BCSGs-like subset of the triple-negative breast cancer (TNBC) cell line, *Exp. Cell Res.* 363 (2) (2018).
- [23] S. Ouyang, et al., Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer, *Redox Biol.* 52 (January) (2022) 102317.
- [24] B.R. Stockwell, Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications, *Cell* 185 (14) (2022) 2401–2421.
- [25] E. Cosialls, et al., mTOR inhibition suppresses salinomycin-induced ferroptosis in breast cancer stem cells by ironing out mitochondrial dysfunctions, *Cell Death Dis.* 14 (11) (2023).
- [26] J. Zhao, N. Zhang, X. Ma, M. Li, H. Feng, The dual role of ferroptosis in anthracycline-based chemotherapy includes reducing resistance and increasing toxicity, *Cell Death Dis.* 9 (1) (2023) 1–12.
- [27] W. Mahavorasirikul, V. Viyanant, W. Chaijaroenkul, A. Itharat, K. Na-Bangchang, Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro, *BMC Compl. Alternative Med.* 10 (55) (2010) 2–8.
- [28] G.Y. Di Veroli, et al., An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–11.
- [29] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- [30] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (9) (2002) e36.
- [31] V. Almendro, A. Marusyk, K. Polyak, Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer, *Annu. Rev. Pathol.* 8 (1) (2013) 277–302.
- [32] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells: current status and evolving complexities, *Cell Stem Cell* 10 (6) (2012) 717–728.
- [33] M. Luo, M. Brooke, M.S. Wicha, Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance, *Curr. Pharmaceut. Des.* 21 (10) (2015) 1301–1310.
- [34] C.J. Creighton, et al., Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (33) (2009) 13820–13825.
- [35] D. Jia, et al., Cardamonin reduces chemotherapy-enriched breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo 7 (1) (2015) 2015–2016.
- [36] R. Sun, et al., Nanoparticle-facilitated autophagy inhibition promotes the efficacy of chemotherapeutics against breast cancer stem cells, *Biomaterials* 103 (2016) 44–55.
- [37] S. Liu, et al., Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts, *Stem Cell Rep.* 2 (1) (2014) 78–91.
- [38] M. Shipitsin, et al., Molecular definition of breast tumor heterogeneity, *Cancer Cell* 11 (3) (2007) 259–273.
- [39] S.Y. Park, H.E. Lee, H. Li, M. Shipitsin, R. Gelman, K. Polyak, Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 16 (3) (2010) 876–887.
- [40] A. Grosse-Wilde, et al., Stemness of the hybrid epithelial/mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival, *PLoS One* 10 (5) (2015) 1–28.
- [41] P. Mallini, T. Lennard, J. Kirby, A. Meeson, Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance, *Cancer Treat Rev.* 40 (3) (2014) 341–348.
- [42] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (3) (2014) 178–196.
- [43] S.A. Mani, et al., The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, *Cell* 133 (4) (2008) 704–715.
- [44] N.P.A.D. Gunasinghe, A. Wells, E.W. Thompson, H.J. Hugo, Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 31 (3–4) (2012) 469–478.
- [45] A.-M. Imbert, C. Garulli, E. Choquet, M. Koubi, M. Aurrand-Lions, C. Chabannon, CD146 expression in human breast cancer cell lines induces phenotypic and functional changes observed in epithelial to mesenchymal transition, *PLoS One* 7 (8) (2012) e43752.
- [46] G. Zabouo, et al., CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines, *Breast Cancer Res.* 11 (1) (2009) R1.
- [47] A. Ouhitit, M.E. Abdraboh, A.D. Hollenbach, H. Zayed, M.H.G. Raj, CD146, a novel target of CD44-signaling, suppresses breast tumor cell invasion, *Cell Commun. Signal.* 15 (1) (2017) 1–10.
- [48] A.S. Coates, et al., Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: st GallenInternational expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015, *Ann. Oncol.* 26 (8) (2015) 1533–1546.
- [49] X. Deng, et al., CD24 Expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer, *Oncotarget* 8 (24) (2017) 38294–38308.
- [50] W.S. Yang, B.R. Stockwell, Ferroptosis: death by lipid peroxidation, *Trends Cell Biol.* 26 (3) (Mar. 2016) 165–176.
- [51] M.Q. Del Rey, J.D. Mancias, NCOA4-mediated ferritinophagy: a potential link to neurodegeneration, *Front. Neurosci.* 13 (March) (2019) 1–7.
- [52] W. Hou, et al., Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin, *Autophagy* 12 (8) (2016) 1425–1428.
- [53] M. Maan, J.M. Peters, M. Dutta, A.D. Patterson, Lipid metabolism and lipophagy in cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504 (3) (Oct. 2018) 582–589.
- [54] Y. Bai, et al., Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508 (4) (2019) 997–1003.
- [55] Q. Liu, et al., High RAS-related protein Rab-7a (RAB7A) expression is a poor prognostic factor in pancreatic adenocarcinoma, *Sci. Rep.* 12 (1) (2022) 1–14.
- [56] J. Yi, J. Zhu, J. Wu, C.B. Thompson, X. Jiang, Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117 (49) (2020) 31189–31197.
- [57] S. Almozayn, et al., PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation, *Int. J. Cancer* 141 (7) (2017) 1402–1412.
- [58] M.I. Vitolo, et al., Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells, *Cancer Res.* 69 (21) (2009) 8275–8283.

- [59] Y. Dai, et al., Anoikis resistance—protagonists of breast cancer cells survive and metastasize after ECM detachment, *Cell Commun. Signal.* 21 (1) (2023) 1–24.
- [60] I.A. Mawji, et al., Critical role for fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein in anoikis resistance and distant tumor formation, *J. Natl. Cancer Inst.* 99 (10) (2007) 811–822.
- [61] S.H. Park, P. Riley, S.M. Frisch, Regulation of anoikis by deleted in breast cancer-1 (DBC1) through NF- κ B, *Apoptosis* 18 (8) (Aug. 2013) 949–962.
- [62] H. Lee, S. Park, J. Bin Kim, J. Kim, H. Kim, Entrapped doxorubicin nanoparticles for the treatment of metastatic anoikis-resistant cancer cells, *Cancer Lett.* 332 (1) (2013) 110–119.
- [63] K. Velaei, N. Samadi, S. Soltani, B. Barazvan, J. Soleimani Rad, NF κ Bp65 transcription factor modulates resistance to doxorubicin through ABC transporters in breast cancer, *Breast Cancer* 24 (4) (Jul. 2016) 552–561.
- [64] J.Y. Kim, et al., The relationship between nuclear factor (NF)- κ B family gene expression and prognosis in triple-negative breast cancer (TNBC) patients receiving adjuvant doxorubicin treatment, *Sci. Rep.* 6 (February) (2016) 1–11.
- [65] A.Y. Pandya, et al., Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (8) (2004) 2709–2719.
- [66] J.L. Yori, et al., Krüppel-like factor 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer, *Neoplasia* 13 (7) (2011) 601–610.
- [67] T. Nagata, et al., KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer, *Breast Cancer* 24 (2) (2017) 326–335.
- [68] M.S. Roberts, et al., KLF4 defines the efficacy of the epidermal growth factor receptor inhibitor, erlotinib, in triple-negative breast cancer cells by repressing the EGFR gene, *Breast Cancer Res.* 22 (1) (2020) 1–14.
- [69] C. Lourenco, et al., MYC protein interactors in gene transcription and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 21 (9) (2021) 579–591.
- [70] R. Dhanasekaran, A. Deutzmann, W.D. Mahauad-Fernandez, A.S. Hansen, A. M. Gouw, D.W. Felsner, The MYC oncogene — the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 19 (1) (2022) 23–36.