

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LETICIA ARAUJO GODINHO

**EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Bidens pilosa* SOBRE MARCADORES
DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM LINHAGENS CELULARES DE
CÂNCER DE MAMA**

**PATOS DE MINAS- MG
JUNHO DE 2021**

LETICIA ARAUJO GODINHO

**EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Bidens pilosa* SOBRE MARCADORES
DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM LINHAGENS CELULARES DE
CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof(a). Dr(a). Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS- MG

JUNHO DE 2021

LETICIA ARAUJO GODINHO

Efeito do extrato metanólico de *Bidens pilosa* sobre marcadores de transição epitélio-mesenquimal em linhagens celulares de câncer de mama

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

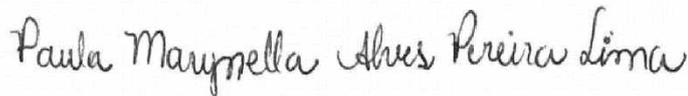
Banca examinadora:



Prof(a). Dr(a). Thaise Gonçalves de Araújo - IBTEC
Presidente



Dr(a). Lara Vecchi – INGEB
Membro



Me. Paula Marynella Alves Pereira Lima - IBTEC
Membro

Patos de Minas – MG, 7 de junho de 2021.

*“Walk on! Walk on!
What you got, they can't deny it
Can't sell it, or buy it
Walk on! Walk on!
You stay safe tonight”*

Walk On – U2

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus amados pais Maria Márcia e Voriqes que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me dando forças. As minhas amigas Thalia e Carina por todos os momentos que compartilhamos na UFU e aos professores e pesquisadores do campus de Patos, em especial a Prof(a). Dr(a). Thaise.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por abençoar minha vida, meus caminhos e me fortalecer durante todos esses anos.

Aos meus pais que nunca me deixaram faltar nada, principalmente amor, carinho e compreensão. Vocês são tudo que tenho de melhor e sem vocês eu nada seria. Obrigada por me amarem incondicionalmente. Amo muito vocês!

A toda minha família que também me apoiaram nessa jornada. Ao meu irmão Leandro e pelo melhor presente que ele me deu – Lana.

A minha amada sobrinha Lana por ser uma criança tão inteligente, esperta, carinhosa e alegre. Obrigada por ter me alegrado desde sua chegada, por todas nossas risadas e brincadeiras, espero que quando estiver grandinha leia esse texto e saiba o quanto a titia te ama.

As minhas melhores amigas que tive o prazer em conhecer na graduação, Thalia e Carina. Agradeço por todos os nossos momentos juntas, as inúmeras conversas e risadas, conselhos e ajudas nas matérias e apresentações de seminário. Sem a amizade de vocês eu não teria chegado até aqui.

A Prof(a). Dr(a). Thaise por se a melhor orientadora da vida. Obrigada, por todos seus ensinamentos, paciência e dedicação comigo. Espero algum dia ser uma profissional/cientista/pessoa excelente, responsável e que ama o que faz como você.

Aos cientistas que tanto admiro e tanto me ajudaram nos experimentos, Isabella, Carina, Douglas Cardoso e Douglas Alexander. Esse trabalho não seria concluído sem vocês.

A todos os professores, servidores e técnicos da UFU – Patos, em especial a Prof(a). Dr(a). Terezinha, os Profs. Drs. Gilvan, Aulus, Marcos e Guilherme por suas aulas maravilhosas e enriquecedoras.

A Dr(a). Lara Vecchi e a Me. Paula Marynella por terem aceito participarem da minha defesa.

Aos meus amigos de Patos que pude compartilhar experiências e ideias, especialmente Gabriel, Sabrina, Brayan e Isabela.

Ao Douglas Alexander por ser meu companheiro e amigo. Sou grata por compartilhar suas ideias, ensinamentos, sonhos e desejos comigo.

As mulheres e cientistas incríveis Natalia, Ana Carla e Isadora. Obrigada por fazerem minhas noites no trabalho mais divertidas e menos estressantes.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e não foram citados aqui, sou imensamente grata!

RESUMO

O câncer de mama (CaM) é uma doença heterogênea com ampla complexidade biológica e molecular, o que dificulta seu tratamento seguro e eficaz. É um problema de saúde pública com um número ascendente de mortes em todo o mundo. Produtos naturais são fontes promissoras de medicamentos com reduzida toxicidade e com diversos mecanismos de ação. *Bidens pilosa* é uma espécie vegetal com atividades farmacológicas relevantes como anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante e antitumoral e, no presente estudo, objetivou-se avaliar seu efeito sobre células de CaM. O extrato metanólico (ExM) da parte aérea de *B. pilosa* foi utilizado no tratamento de linhagens tumorais mamárias T47D, MCF-7, MDA-MB-231 e de uma não tumoral MCF10A. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 e 48 horas de incubação com o ExM nas concentrações finais de 0,0078125; 0,015625; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 µg/µL. Na concentração de 0,125 µg/µL (P<0,0001) observou-se significativa citotoxicidade nas três linhagens tumorais, sendo que a linhagem mais agressiva triplo-negativa (MDA-MB-231) exibiu uma viabilidade celular três vezes menor que a não tumorigênica. Além disso, os valores de IC50 foram superiores para a linhagem não tumorigênica, demonstrando seletividade do ExM para células tumorais. Ensaio de qPCR para a quantificação diferencial dos genes *CDHI*, *VIM* e *CK18* evidenciaram que o extrato não interfere no mecanismo de transição epitélio-mesenquimal. Os resultados apresentam uma atividade promissora do extrato, o que subsidia estudos adicionais para a obtenção de seu composto majoritário e para elucidar quais vias biológicas são afetadas no CaM para que, assim, possam ser sugeridas novas alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: Câncer de mama. Triplo-negativo. *Bidens pilosa*. Resposta citotóxica.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a heterogeneous disease with wide biological and molecular complexity, which makes its safe and effective treatment difficult. It is a public health problem with an increasing number of deaths worldwide. Natural products are promising sources of drugs with reduced toxicity and with different mechanisms of action. Bidens pilosa is a plant species with relevant pharmacological activities such as anti-inflammatory, hepatoprotective, antioxidant and anti-tumor and, in the present study, we aimed to evaluate its effect on breast tumor cells. The methanolic extract (ExM) from the aerial part of B. pilosa was used to treat breast tumor cell lines T47D, MCF-7, MDA-MB-231 and a non-tumoral cell line MCF10A. Cytotoxicity was assessed by the MTT assay after 24 and 48 hours of incubation with ExM at final concentrations of 0.0078125; 0.015625; 0.03125; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. At a concentration of 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($P < 0.0001$), significant cytotoxicity was observed in the three tumor strains, with the most aggressive triple-negative cell line (MDA-MB-231) exhibiting a cell viability three times lower than the non-tumorigenic one. In addition, the IC₅₀ values were higher for the non-tumorigenic strain, demonstrating selectivity of ExM for tumor cells. qPCR assays for the differential quantification of the CDH1, VIM and CK18 genes showed that the extract does not modulate the epithelial-mesenchymal transition mechanism. The results demonstrate a promising activity of the extract, which supports additional studies to obtain its major compound and to elucidate which biological pathways are affected in the BC. Hence, new therapeutic strategies may be suggested.

Keywords: *Breast cancer. Triple negative. Bidens pilosa. Cytotoxic response.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX: BCL2 Associado a Regulação de Apoptose
B2M: Beta-2-Microglobulina
bFGF: Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BRCA1: Gene 1 de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama
BRCA2: Gene 2 de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama
CaM: Câncer de Mama
CDH1: E-Caderina
cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CK18: Citoqueratina 18
CMTN: Câncer de Mama Triplo-Negativo
DEPC: Dietil Pirocarbonato
DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EMT: Transição Epitélio Mesenquimal
ER: Receptor de Estrogênio
ExM: Extrato Metanólico
FBS: Soro Fetal Bovino
GC-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
IC50: Concentração Inibitória Média
L15: Meio Leibovitz
MEC: Matriz Extracelular
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MLV-RT: Enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murino de Moloney
mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro/RNA mensageiro
MTT: (3-(4,5-dimetil-tiazol) -2,5-difenil brometo de tetrazólico)
NF-κB: Fator Nuclear kappa B
PARP: [poli (ADP-ribose) polimerase]
pb: pares de base
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PNs: Produtos Naturais
PR: Receptor de Progesterona
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA: Ácido Ribonucleico
RNase: Ribonuclease
RPMI: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
RT: Transcrição Reversa
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
TBE: Tris/Borato/EDTA
TME: Micro-ambiente Tumoral
TN: Triplo-Negativo
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VIM: Vimentina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Aspectos gerais do câncer.....	10
1.2 O Câncer de Mama	11
1.3 Diagnóstico	13
1.4 Prognóstico	14
1.5 Tratamento	15
1.6 O Câncer de Mama Triplo Negativo e a Transição Epitélio Mesenquimal.....	17
1.7 Produtos Naturais para o tratamento do CMTN	20
1.8 <i>Bidens pilosa</i>	22
2 OBJETIVOS.....	24
Objetivo Geral.....	24
Objetivos específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Cultivo celular.....	25
3.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT	25
3.3 Extração de RNA	26
3.4 Transcrição Reversa.....	26
3.5 Quantificação Transcricional Relativa por PCR em Tempo Real	27
3.6 Análises Estatísticas.....	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Ensaios de citotoxicidade.....	28
4.2 Perfil de expressão dos genes relacionados à EMT	30
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer

Câncer é o nome atribuído ao conjunto de doenças caracterizadas por danos moleculares traduzidos em células proliferativas, com a malignidade definida por sua capacidade de se estabelecer em outros tecidos do organismo, fato conhecido como metástase. O tumor maligno se diferencia por promover a invasão tecidual e rápidas mitoses anormais no tecido de origem, o qual possui poucos sinais de inibição do crescimento celular. Por outro lado, o tumor benigno apresenta mitoses organizadas com uma taxa de crescimento celular lento e não invasivo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; INCA, 2018; JORDE, 2004).

A classificação dos tumores é baseada no tecido em que se originam. Em tecidos epiteliais são denominados carcinomas; no conjuntivo sarcomas; no tecido linfático linfomas; e gliomas e leucemias em células do sistema nervoso e em órgãos do sistema hematopoiético, respectivamente (JORDE, 2004). Os eventos responsáveis pelo seu surgimento são complexos e de difícil caracterização. Entretanto, já se encontram descritos alguns fatores de risco, incluindo traços genéticos e fontes externas, como exposição a agentes físicos (radiação ionizante ou ultravioleta), a produtos químicos (arsênio, amianto) e a agentes biológicos (alguns vírus, bactérias e parasitos). A idade, com o decorrente comprometimento das atividades celulares e a ausência de hábitos saudáveis, como o consumo de bebidas alcoólicas, uso de drogas, dieta desequilibrada e sedentarismo, também se mostram preponderantes para o desenvolvimento da doença (OPAS/OMS, 2018).

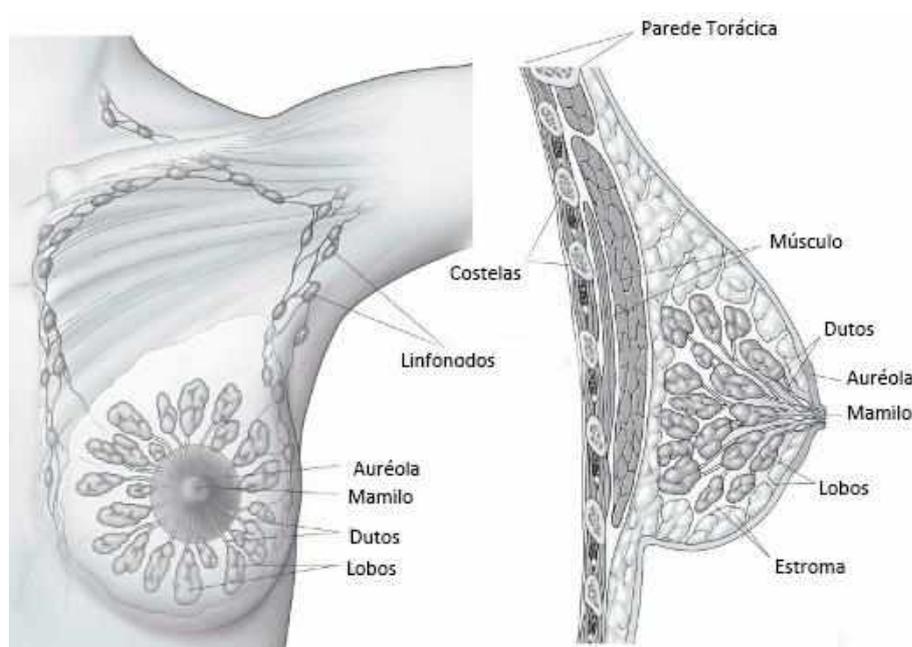
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 8,8 milhões de pessoas morrem por câncer a cada ano, superando doenças infecciosas como AIDS, malária e tuberculose. Os números são alarmantes e evidenciam a necessidade de se descobrir novas alternativas diagnósticas e terapêuticas que aumentem a sobrevivência dos pacientes. Com o incentivo a tecnologias mais acessíveis, menos tóxicas e mais efetivas, a OMS pretende reduzir as mortes por câncer em 25% até 2025. Os países com baixa e média renda são os que apresentam os maiores índices de mortalidade, sendo que dois terços dos óbitos ocorrem nesses locais (ONU, 2017).

Nesse cenário se destaca o Câncer de Mama (CaM). Segundo estimativas da IARC (*International Agency for Research on Cancer*), mais de dois milhões de mulheres de todas as faixas etárias sofrem de CaM em todo o mundo. Desse total, cerca de 600.000 morrem pela doença (IARC, 2018). No Brasil, dados epidemiológicos estimam 66.280 novos casos para cada ano do triênio 2020-2022. Anualmente, 18.000 óbitos são registrados e, portanto, o CaM é considerado o segundo maior em número de mortes, depois do câncer de pulmão (IARC, 2018; INCA 2020).

1.2 O Câncer de Mama

A mama é uma glândula cuja principal função é a produção de leite, sendo dividida em quadrantes - superiores internos e externos e inferiores internos e externos. É composta por tecido epitelial, elementos parenquimatosos e estroma. Trata-se de um órgão externo constituído por auréola e papila, sendo que nesta convergem os ductos lactíferos. A unidade funcional da mama é composta pelos lobos mamários (de 15 a 20), os quais são subdivididos em 20 a 40 lóbulos que se unem em ductos terminais (PANDYA/MOORE, 2011). O tecido adiposo, presente entre os lóbulos, é responsável pelo preenchimento das mamas, podendo variar em volume conforme a nutrição e idade de cada mulher (MS/INCA, 2002).

Figura 1. Anatomia da mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).



Diversos fatores de risco estão relacionados com o desenvolvimento do CaM destacando-se: (i) histórico familiar e predisposição genética, especialmente mutações herdadas nos genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* (MAMON et al., 2003). Essas alterações aumentam a probabilidade de desenvolvimento da doença em 3% antes dos 30 anos e de 50% a 80% depois dos 70 anos (HA et al., 2017; AMENDOLA/VIEIRA, 2005); (ii) idade avançada (YIXAO FENG et al., 2018); (iii) estímulo hormonal (menarca precoce e menopausa tardia); (iv) obesidade na pós-menopausa, uma vez que o tecido adiposo conduz a uma maior concentração de estrógeno livre (FELDEN/FIGUEIREDO, 2011) e (v) nuliparidade (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2018). O aleitamento materno tem sido associado a uma menor chance de se desenvolver tumores de mama e ovário. Devido à amamentação, há um período de amenorreia, alterando a exposição a hormônios. Ainda, as células do tecido mamário que possuem mutações acumuladas podem sofrer morte celular e serem eliminadas no final da lactação (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2018).

Tumores mamários são mais comuns em mulheres e, raramente, detectados em homens (cerca de 1% dos casos) (INCA, 2014). A mais recente classificação histológica do CaM foi publicada em 2012 pela Classificação de Tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS). Destacam-se o carcinoma ductal invasivo (responsável por cerca de 70% a 80% dos casos), seguido pelo carcinoma lobular invasivo (correspondendo de 5 a 15% dos diagnósticos) (PINHO, 2017). O carcinoma ductal e lobular *in situ* são consideradas lesões precursoras. Há também outros tumores de mama menos prevalentes como carcinoma secretor, papilar invasivo, sebáceo, de células acinares, mucoepidermoide, oncocítico, rico em lipídeos, de células claras rico em glicogênio e tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos (GOBBI, 2012).

A natureza heterogênea do CaM pode ser observada clínica e histopatologicamente. Além disso, as lesões também são subdivididas conforme seu padrão de expressão gênica, sendo definidos quatro subgrupos principais: o Luminal A, que expressa os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), sendo negativo para a expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2); o Luminal B, que pode expressar ER e/ou PR e a amplificação de HER-2 pode ou não estar presente, ainda apresenta maior índice mitótico ($ki67 > 14\%$); o HER-2 enriquecido, que é caracterizado pela amplificação de HER-2 e negativo para os receptores hormonais e, por fim, o subtipo triplo-negativo (TN) (FLEMBAN; QUALTROUGH, 2015; EIRIKSSON et al., 2020).

O CaM TN (CMTN) é um subtipo molecular bastante heterogêneo, representando cerca de 15% a 20% dos diagnósticos e considerado o de pior prognóstico (ZHAO et al., 2020). É caracterizado por não expressar nenhum dos marcadores descritos anteriormente. Para a terapia dessas lesões são considerados características histológicas, envolvimento linfonodal, tamanho do tumor e presença/ausência de metástases (MAROTTI et al., 2017; GADI; DAVIDSON, 2017). Quanto à histologia, o CMTN demonstra, em geral, um aumento da atividade mitótica, alta taxa de proliferação e alto grau nuclear (JITARIU et al., 2017; CHAUDHARY; WILKINSON; KONG, 2018).

Os CMTNs podem também ser subclassificados em *basal like* (BL) e *claudin-low*. O subtipo *basal like* é encontrado em cerca de 50% a 75% dos tumores TNs e possui características peculiares do ponto de vista molecular, como expressão de citoqueratinas basais (como citoqueratina 5), mutações nos genes *p53* e *BRCA1* e elevado potencial proliferativo. O subtipo *claudin-low* recebe essa classificação devido à baixa expressão dos genes da família das claudinas, principalmente claudinas 3, 4 e 7. Nestes, são detectados menores níveis de expressão de proteínas de junção célula-célula, incluindo E-caderina e P-caderina. São também identificados infiltrados de células imunes e células tronco tumorais, os quais promovem a transição epitélio mesenquimal (EMT) e, por conseguinte, a agressividade tumoral (PEROU, 2011; SRINIVASARAGHAVAN; STROBL; AGAH, 2015; ALI et al., 2017).

1.3 Diagnóstico

O CaM não possui sintomas ou sinais específicos. As alterações notadas como deformações no mamilo, nódulos ou caroços indolores nas papilas, pele da mama com aspecto de “casca de laranja” (vermelhidão e retração da pele) e extravasamento de líquido pelos mamilos (INCA, 2018) não são restritas aos casos de malignidade e, caso o sejam, já sinalizam uma doença em estágio mais avançado (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Nesse contexto, o diagnóstico precoce é crucial, pois aumenta as chances de cura. O autoexame permite detectar, durante o período menstrual, mudanças no formato, cor, tamanho e textura do órgão (CANCER RESEARCH UK, 2017; RICHARDS, 2009). Clinicamente, a mamografia é o método padrão ouro para o rastreamento da doença. (CANCER RESEARCH UK, 2017). Nesta, é realizada a triagem através de raios-x para a identificação de calcificações mamárias, podendo ser ou não massas cancerosas. Normalmente, o câncer em estágio inicial e em mulheres jovens pode não apresentar nódulos, dificultando a leitura confiável e

demandando testes adicionais (SUNG et al.,2016). Além da mamografia destacam-se, a ressonância magnética de imagem (MRI) da mama, ultrassonografia e, para laudo definitivo, a biópsia do tecido mamário (NATIONAL CANCER INSTIUTE, 2016).

A MRI é um procedimento baseado na emissão de ondas de rádio e magnéticas, resultando em imagens claras do corpo e tecidos moles. É um procedimento utilizado posteriormente à mamografia e à ultrassonografia para a detecção de CaM e na triagem de mulheres jovens portadoras da doença. A MRI ainda possibilita avaliar a dimensão da lesão, a fim de se definir qual o melhor procedimento cirúrgico para a paciente (CANCER RESEARCH UK, 2017).

Na ultrassonografia, ondas sonoras são utilizadas para a obtenção de imagens que, inclusive, reforçam as alterações já identificadas na mamografia. Consiste em um procedimento relativamente barato e fácil, uma vez que não expõe a paciente à radiação, além de permitir diferenciar cistos com fluidos de massas sólidas, podendo ser utilizada junto à biópsia para guiar o agulhamento do tumor (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Pela biópsia é possível confirmar o diagnóstico de CaM. Células do tecido mamário que apresentam anormalidades são retiradas e enviadas para a análise patológica (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). São utilizados métodos percutâneos como agulha fina, biópsia de fragmentos, *core biopsy* e agulha grossa ou mamotomia, a qual consiste em uma biópsia vácuo-assistida (CAMARGO JUNIOR, 2018).

1.4 Prognóstico

Prognosticar a doença, após a remoção da lesão, significa estimar o avanço do tumor e fornecer informações para o melhor direcionamento terapêutico. São considerados a idade da paciente, o estágio do tumor e a velocidade de multiplicação das células tumorais. Além disso, são avaliadas as características moleculares e o tipo histológico (ABREU et al., 2002).

A União Internacional para o Controle do Câncer (UICC) definiu os critérios para o estadiamento de tumores, conhecido como TNM. Esse sistema visa dividir os casos clínicos em grupos (estágios) baseados na extensão anatômica da lesão. Consiste na avaliação de três componentes, em que T descreve o local e a extensão do tumor primário; N se há ou não a presença de metástase nos linfonodos regionais e sua extensão, caso exista; e M se há ou não metástases (IUCC, 2018; MS/INCA, 2004). As características moleculares também podem auxiliar o prognóstico. Em mulheres recém diagnosticadas com CaM, os receptores ER, PR e HER-2 também são determinantes do prognóstico de curto prazo, sendo associados ao TNM

e ao grau do tumor (DONEPUDI, 2014). Vale salientar que o subtipo TN apresenta um comportamento mais agressivo em relação aos demais e, conseqüentemente, uma pior sobrevida global (LI et al., 2016).

1.5 Tratamento

Após caracterização microscópica e molecular, são definidas as estratégias de tratamento. Estas incluem métodos locais e sistêmicos. Localmente, o tumor é retirado por cirurgia e a região irradiada por radioterapia. A quimioterapia, a terapia hormonal e a terapia alvo atingem Células Tumorais Circulantes (CTCs) e, portanto, possuem caráter sistêmico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). A disseminação de células de câncer no sangue corresponde a uma das primeiras etapas do processo metastático. Quando as células tumorais se destacam do tumor primário são conhecidas com CTCs, sendo marcadores de agressividade para diferentes tumores, incluindo o de mama (BIDARD; PROUDHON; PIERGA, 2016; YU et al., 2019).

O tratamento para o CaM varia de acordo com o (i) estadiamento do tumor, podendo ter combinações entre métodos locais e sistêmicos conforme o quão avançado esteja; (ii) características biológicas da doença e (iii) características individuais (*status* da menopausa, idade, comorbidades e preferências da paciente). Além disso, o tratamento tem o potencial de cura, quando não metastático. Caso já identificado em outros focos, as medidas adotadas visam prolongar a sobrevida e propiciar uma melhor qualidade de vida para a paciente (INCA, 2018).

O método local, cirúrgico, visa tratar o tumor sem afetar o restante do organismo. A cirurgia elimina o tecido comprometido e, na mastectomia, é retirada toda a mama com posterior reconstrução por meio de técnicas oncoplásticas (BONILLA et al., 2017). Esses procedimentos são usualmente empregados nos estágios I e II da doença (INCA, 2018). Entretanto, a mastectomia pode deixar sequelas físicas e psicológicas, como baixa autoestima e problemas relacionados à imagem corporal. A cirurgia conservadora da mama, conhecida como quadrantectomia ou mastectomia parcial, possui como princípio retirar o tecido tumoral e suas margens, conservando parte do órgão (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; WYLD; AUDISIO; POSTON, 2014). Já na radioterapia são utilizadas radiações ionizantes, como feixes de elétrons e raio x ou gama, para inibir o crescimento ou destruir as células tumorais. Geralmente é combinada com outros métodos (cirúrgico e quimioterápico) para potencializar o tratamento (CASTANEDA; STRASSER, 2017).

A quimioterapia inclui a administração, oral ou venosa, de drogas químicas que alvejam células neoplásicas circulantes, levando à regulação de vias que causam a morte celular programada ou apoptose. Contudo, as substâncias não são citotóxicas somente às células tumorais, atingindo também as saudáveis. Portanto, o tratamento quimioterápico acarreta diversos efeitos colaterais como: náuseas, queda de cabelo, fraqueza e redução da imunidade. Essa terapia pode ser adotada como neoadjuvante, ou seja, antes do procedimento cirúrgico, ou adjuvante, após a cirurgia. Ainda, esse tipo de tratamento é denominado de antiblástico ou antineoplásico (SHAMSI; ISLAMIAN, 2017; REDDEN; FUHRMAN, 2013; HAVARD; HENRY, 2017).

A terapia alvo permite personalizar a conduta clínica de acordo com as características do tumor de cada paciente. As drogas são direcionadas e, atualmente, são utilizados anticorpo anti-HER-2 (MARCHIO et al., 2017) e o fármaco anti-PARP (CANTLEY et al., 2019). Inibidores de PARP [poli (ADP-ribose) polimerase] já foram aprovados para o tratamento do CMTN. Enzimas PARP auxiliam no reparo do DNA e, ao inibi-las, há um acúmulo exacerbado de danos e, conseqüentemente, o mecanismo apoptótico é ativado. A PARP-1 desempenha um papel fundamental em termos de reparo por excisão de base, o qual é importante para a sobrevivência de células tumorais mutadas para os supressores tumorais *BRCA1/2* (*Breast Cancer 1/2, early onset gene*). Assim, células com mutações nesses genes são sensíveis a inibição da PARP-1, o que define a seletividade do medicamento a tumores mutados (SACHDEV et al., 2019; VENERIS et al., 2020).

Na imunoterapia destaca-se o anticorpo anti-PDL1. Recentemente, foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) o anti-PD-L1 (atezolizumabe) para pacientes portadoras de CMTN avançado ou metastático irrissecável. O atezolizumabe é um anticorpo monoclonal que inibe a interação do ligante PD-L1 com o receptor de morte programado 1 (PD-1) – proteína transmembranar expressa em linfócitos T e B e em células natural killer (NK). Quando há a interação PD-1/PD-L1, a apoptose é inibida e células T efetoras são convertidas em imunossupressoras (SWOBODA; NANDA, 2018; CANTLEY et al., 2019). Portanto, o anticorpo permite a ativação dos linfócitos T, os quais auxiliam no combate do tumor.

Já a terapia hormonal visa bloquear o estímulo estrogênico, o qual influencia a proliferação de células malignas. São utilizados os moduladores de estrogênio e os inibidores de aromatase (enzima responsável pela produção de estrogênio pós-menopausa) (PADILHA et al., 2012). A maior parte da produção de estrogênio em mulheres na pós-menopausa ocorre nos tecidos periféricos que expressam aromatase, incluindo a mama. Dessa forma, o

estrogênio se encontra em níveis suficientes para promover o CaM, uma vez que a progesterona circulante está presente em níveis muito baixos nessas mulheres. Portanto, os inibidores de aromatase bloqueiam a conversão de androgênios em estrogênios, reduzindo os níveis circulantes de estrogênio para cerca de 1/10 dos níveis normais (CONEJO et al., 2018; SNELL et al., 2018). Para o CMTN, diversos alvos moleculares estão sendo explorados, incluindo o receptor de androgênio, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Receptores, proteínas tirosinas quinases, fosfatases, proteases, moléculas da via de sinalização PI3K/Akt, microRNAs (miRs) e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) têm se apresentado como potenciais alvos terapêuticos (NAGINI, 2017).

Outras tecnologias para o tratamento do CaM incluem a ablação, hipertermia e fototerapia/laserterapia. A ablação por radioterapia é um método minimamente cirúrgico em que é inserido um eletrodo no tumor e uma corrente iônica conduz calor de atrito. Danos térmicos irreversíveis (aquecimento de 50°C a 55°C) e coagulação (aquecimento entre 60°C e 100°C) são produzidos nas células malignas (SABEL, 2014). A hipertermia induzida por laser é um tratamento que também envolve a elevação da temperatura do tecido transformado. A temperatura ideal para a termoterapia a laser é de 60°C com um tempo médio de 30 minutos. O procedimento é realizado com auxílio de ultrassom ou ressonância magnética (FORNAGE; HWANG, 2014). A fototerapia utiliza a luz em combinação com produtos químicos para induzir à destruição de organelas, causando a morte celular. Na terapia fotodinâmica, fotossensibilizadores são combinados a biomoléculas como anticorpos monoclonais e lipossomos. Esse procedimento envolve três importantes componentes (i) luz com comprimento de onda específico, (ii) molécula fotoativa (fotossensibilizador) e (iii) presença de oxigênio. O sinergismo desses três componentes permite que a molécula de oxigênio se torne citotóxica e cause a destruição da célula tumoral (ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2017).

1.6 O Câncer de Mama Triplo Negativo e a Transição Epitélio Mesenquimal

O microambiente tumoral (TME) apresenta características biológicas complexas, contribuindo, diretamente, com a formação de metástases ao desencadear o processo de EMT. A composição física do TME compreende a matriz extracelular (MEC), os vasos sanguíneos e uma diversidade adicional de células, como os fibroblastos e células do sistema imunológico - incluindo macrófagos e linfócitos (DHAWAN et al., 2018). No CMTN, a agressividade do

tumor, a sobrevida reduzida e as características clínico-patológicas malignas estão correlacionadas com a superexpressão dos marcadores de EMT nos tecidos acometidos (YANG et al., 2019).

A EMT é um fenômeno de transdiferenciação em que as células epiteliais perdem suas junções e sua polaridade ápico-basal, reorganizando seu citoesqueleto, alterando seus perfis de sinalização e reprogramando a expressão de seus genes. Essas mudanças conduzem ao fenótipo mesenquimal com maior mobilidade e invasividade celulares e, conseqüentemente, ao quadro metastático (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; MARCUCCI; STASSI; MARIA, 2016; YIN et al., 2017).

Existem três tipos de EMT. A Tipo 1 está relacionada com a formação do embrião, a Tipo 2 com a regeneração tecidual em adultos e a Tipo 3 com a progressão tumoral (CHEN et al., 2017). Em processos oncológicos, a EMT é desencadeada por diferentes mecanismos, os quais envolvem fatores de transcrição como *Snail* (SNAI1), *Slug* (SNAI2), *TWIST1/2* e *ZEB1/2* e/ou microRNAs. No CaM tumores do tipo basais assemelham-se molecularmente à EMT, definindo uma doença mais agressiva/invasiva e com pior prognóstico (LIAO; YANG, 2017; HKALAMERA et al., 2016). Em modelos experimentais, mudanças morfológicas, alterações funcionais e na expressão de marcadores epiteliais - como a E-caderina (*CDH1*) e Citoqueratina18 (*CK18*), e mesenquimais, como a N-caderina e Vimentina (*VIM*) - são utilizados na validação da EMT (LIAO; YANG, 2017). De fato, a EMT é regulada por um complexo padrão de ativação e supressão de diferentes genes (YEUNG; YANG, 2016).

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana de adesão intracelular dependente de cálcio. Quando combinada com às cateninas α e β , forma o complexo E-caderina/ β -catenina/ α -catenina que se liga ao citoesqueleto de actina, gerando um componente importante das junções aderentes. Nesse contexto, a E-caderina mantém a estabilidade e polaridade celulares, preservando a estrutura e função dos tecidos epiteliais (LI et al., 2017; MEMNI et al., 2016). Conseqüentemente, sua regulação negativa compromete essas junções, capacitando as células a migrarem e facilitando, assim, a invasão tumoral e a metástase. Esse processo pode ser desencadeado por mutações no gene *CDH1*, hipermetilação de seu promotor e regulação de seus fatores de transcrição (HUGO et al., 2017). Além disso, como a E-caderina atua como supressora tumoral, quando expressa em baixos níveis, torna-se indicadora de mau prognóstico, principalmente quando associada ao CMTN (LI et al., 2016; YU et al., 2020).

O gene *VIM* é responsável por codificar a proteína Vimentina. É uma proteína de filamento intermediário com importante função estrutural, normalmente expressa em células de origem mesenquimal (MOHAMMED; ELHASSAN, 2019). Nos fibroblastos, o *VIM* regula

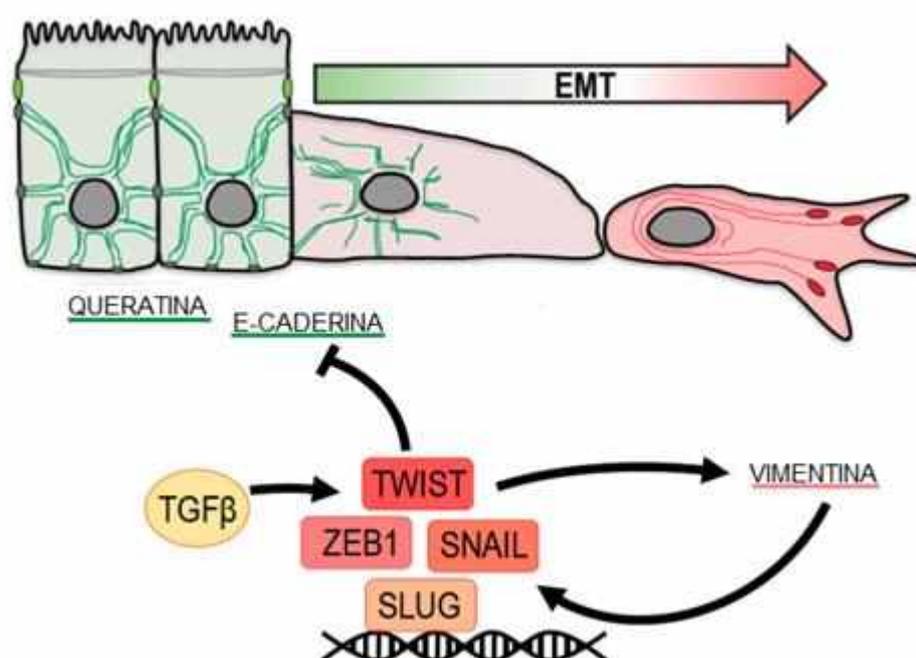
a migração celular, estando também associada à resposta imune, estabilização de transcritos para colágeno, cicatrização e EMT. Nesta, a regulação positiva de *VIM* já foi descrita no CaM (linhagens tumorais agressivas), câncer de próstata, de endométrio, em melanomas malignos e tumores do trato gastrointestinal (PEUHU et al., 2017; YAMASHITA et al., 2013; STEWART et al., 2016; VUORILUOTO et al., 2010; VIRTAKOIVU et al., 2015). A superexpressão dessa proteína vem sendo frequentemente associada à capacidade invasiva de células de CMTN (YAMASHITA et al., 2018; LIU et al., 2020).

A CK18 é uma citoqueratina tipo 1 pertencente à família dos filamentos intermediários. Encontra-se expressa em células epiteliais simples do trato gastrointestinal, fígado, pâncreas e glândula mamária. Combinada com a citoqueratina 8 (CK8) do tipo 2, regula diferentes processos celulares como mitose, apoptose, proliferação e, portanto, o comportamento de células tumorais. Além disso, controla a arquitetura intracelular, fornecendo estrutura para o citoplasma e resistência a tensões externas. No CaM, a perda de sua expressão é associada a um pior prognóstico das pacientes (YANG et al., 2018; JUNG et al., 2016). Durante a EMT, existe a perda de expressão de citoqueratinas epiteliais, incluindo a CK18, CK8 e CK19 e um favorecimento de citoqueratinas basais, conduzindo a uma mudança morfológica e comportamental (POLIOUDAKI et al., 2015; BOZZA; ZHANG; ZHANG, 2018).

Essas proteínas encontram-se relacionadas a diferentes vias de sinalização no CMTN, destacando-se a via *Notch*, a Wnt/ β -catenina e a *Hedgehog* (Hh). A via *Notch*, superexpressa nesse subtipo de CaM, é responsável por ativar genes-chave envolvidos em diversos processos biológicos, como angiogênese e migração celular. Ainda, a interação dessa via com a Wnt e TGF- β influencia diretamente no processo da EMT (JAMDADE et al., 2015; KUMAR; GOLANI; KUMAR, 2020). A Wnt/ β -catenina desempenha um papel fundamental no crescimento embrionário e pode conduzir à formação de tumores quando ativada de forma aberrante. Há diversas evidências de que esta via é anormalmente supra-regulada no CMTN. Além disso, sua regulação positiva ativa fatores de transcrição que atuam como marcadores da EMT, como o *Twist* e *Slug* (WU et al., 2019). Esses fatores, juntamente com *Snail*, *ZEB1* e *ZEB2*, são responsáveis por reprimir diretamente a transcrição de *CDH1*, e ao mesmo tempo promover a expressão aumentada de *VIM* (Figura 2) e N-caderina (WANG et al., 2018; AL-KHADAIRI et al., 2019; GUO; FAN; PEI, 2020; WU et al., 2020). Finalmente, a Hh é associada à promoção, progressão, angiogênese e metástase em diferentes tumores. A ativação aberrante dessa via inicia-se com a interação dos ligantes Hh (*Sonic-SHH*, *Indian-IHH* e *Desert-DHH*) ao receptor *Patched* (PTCH), ativando a proteína *Smoothed* (SMO), a qual é

responsável por liberar os fatores de transcrição GLI (homólogo de oncogene associado ao glioma) (LIU et al., 2020). No CMTN, há a superexpressão de GLI1 e GLI2 sugerindo a estreita relação desse mecanismo com a EMT (WILS; BIJLSMA, 2018; BHATEJA et al., 2019).

Figura 2. Representação da via de transição epitélio mesenquimal (EMT). Os níveis de Vimentina estão positivamente associados a uma perda de características epiteliais (verde) e a um ganho de fenótipo mesenquimal pró-migratório (vermelho). A expressão da Vimentina é regulada pelos fatores de transcrição *Twist*, *Snail*, *Zeb1* e *Slug*, os quais são regulados pela sinalização via TGF- β . O *Twist* ainda suprime a expressão das queratinas e da E-caderina (STROUHALOVA, 2020).

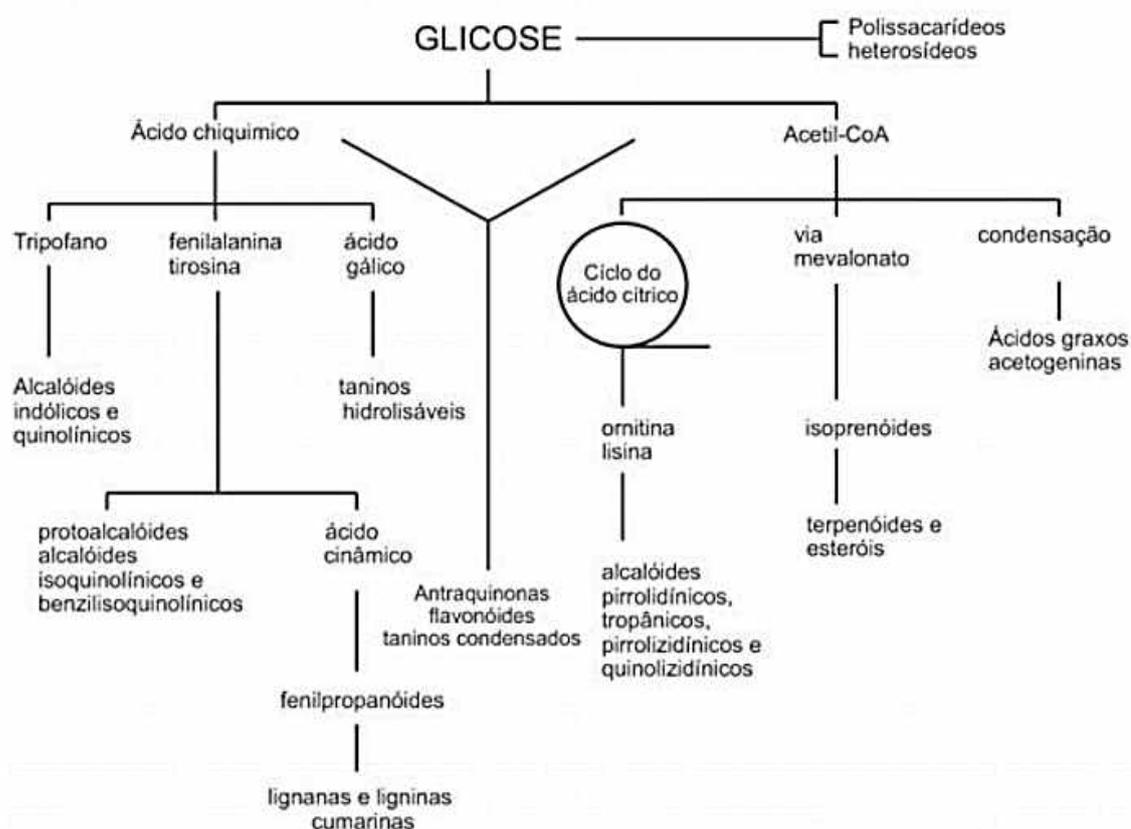


1.7 Produtos Naturais para o tratamento do CMTN

Produtos naturais (PNs) são compostos químicos biossintetizados por plantas, microrganismos e animais. Historicamente, são a fonte primordial de preparações medicinais, o que conduziu ao desenvolvimento de diferentes drogas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Também conhecidos como fitoquímicos ou metabólitos secundários, estes compõem uma grande diversidade de compostos importantes para a adaptação de plantas em seu ambiente natural, apesar de não essenciais para sua sobrevivência. Em geral, auxiliam no combate aos ataques de insetos, parasitas, fungos, vírus e bactérias, além de conferirem proteção contra raios ultravioletas. Ainda, alguns são atrativos devido ao odor, sabor e cor agradáveis (FUMAGALI et al., 2008).

Os metabólitos secundários são organizados de acordo com sua rota biossintética e são divididos em três grandes grupos: (i) terpenos, (ii) compostos fenólicos e (iii) alcaloides. Dessa forma, aproximadamente 60% dos PNs conhecidos derivam da via do mevalonato como os isopropanóides e terpenóides, cerca de 30% são oriundos da via do ácido chiquímico como os fenilpropanóides e alcaloides indólicos e 10% são provenientes de outras vias (Figura 3) (CHEZEM; CLAY, 2016; PINTO, 2015; SANTOS, 2010).

Figura 3. Biossíntese dos metabólitos secundários (SANTOS, 2010).



Durante séculos, os extratos brutos de ervas medicinais foram usados para tratar e curar doenças humanas. Diversos medicamentos modernos produzidos ou derivados de bioativos de plantas são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e empregados para o tratamento de CaM, pulmão, ovário, testículos, linfomas. O paclitaxel (Taxol®), por exemplo, é uma substância extraída da espécie *Taxus brevifolia*; vimblastina e vincristina extraídos da *Catharanthus roseus*; etoposide alcaloide extraído da *Podophyllum peltatum*, e topotecan obtido da *Camptotheca acuminata*. De fato, fitoquímicos são menos tóxicos e mais seguros, exercendo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiangiogênicos, antiproliferativos e pró-apoptóticos (SUBRAMANI; LAKSHMANASWAMY, 2017).

As dificuldades encontradas em relação ao tratamento do CMTN metastático decorrem da resposta refratária desses tumores, o que agrava o quadro clínico das pacientes. Assim, a pesquisa voltada para a caracterização de novos compostos obtidos a partir de espécies vegetais tem se mostrado bastante relevante para a busca de tratamentos alternativos, menos tóxicos e mais eficazes no combate a esse subtipo tumoral heterogêneo e que carece de terapia específica capaz de abranger sua heterogeneidade (ARZI et al., 2018).

Diversos estudos utilizando fontes naturais para o tratamento do CMTN vem sendo realizados. Alguns exemplares chineses já demonstraram efeitos inibitórios contra células tumorais TN. A espécie *Cornus officinalis* (na qual as antocianinas representam os principais agentes bioativos), por exemplo, é descrita por apresentar propriedades antiproliferativas, anti-inflamatórias, antioxidantes e quando, testada em modelo celular de CMTN, inibiu a proliferação e induziu a apoptose (TELANG; NAIR; WONG, 2019). O fungo *Phellinus linteus* é um cogumelo medicinal aplicado para a prevenção de disfunções gastroentéricas, para o tratamento de diarreia e combate ao câncer. Em células MDA-MB-231 os extratos dessa espécie ativaram a autofagia, o que contribui para o controle do crescimento celular (ZHOU et al., 2018).

Já a biodiversidade brasileira é considerada a maior do mundo, totalizando aproximadamente 45.000 espécies de plantas (cerca de 20 a 22% do total mundial) responsáveis por produzir diferentes metabólitos, os quais se mostram potencialmente promissores enquanto bioativos no tratamento de doenças. Dentre os seis principais biomas do país, o Cerrado é o segundo maior em extensão com cerca de 204 milhões de hectares (ocupação de 25% do território do Brasil). Sua biodiversidade (florística e faunística) representa em torno de 30% da brasileira, sendo afetada negativamente pela ocupação urbana e agropecuária. Assim, a conservação da biodiversidade desse bioma é um fator crucial para a sobrevivência das espécies endêmicas (DUTRA et al., 2016; PINTO, 2015). Em relação à sua flora, mais de 12 mil espécies de plantas já foram catalogadas, as quais apresentam valor cultural e econômico, com possível exploração na indústria farmacêutica e alimentícia (PEIXOTO et al., 2019).

1.8 *Bidens pilosa*

Bidens pilosa (Figura 4) é uma planta daninha da família Asteraceae distribuída em regiões tropicais e subtropicais de todo mundo, principalmente da Ásia e América. Em algumas regiões é usada como alimento e em outras em preparações medicamentosas

tradicionais (SINGH et al., 2017). É uma erva perene e ereta, suas folhas são serrilhadas e verdes, com flores brancas ou amarelas e sementes pretas (cerca de 3000 a 6000 sementes por planta). Seu crescimento varia de 60cm a no máximo 150cm, estabelecendo-se em qualquer tipo de ambiente (seco, úmido, com sol pleno, árido, alta ou baixa altitude) (BARTOLOME; VILLASEÑOR; YANG, 2013).

Figura 4. Flores, folhas e sementes de *Bidens pilosa* (YILDIRIM, 2019).



Entre os nomes populares atribuídos a *B. pilosa* no Brasil estão: picão, picão-preto, carrapicho, carrapicho-de-agulha, carrapicho-de-duas-pontas e carrapicho-picão. Para a obtenção de seus extratos são utilizadas todas as suas partes, desde a raiz até as sementes, flores e folhas (GILBERT; ALVES; FAVORETO, 2013). Na medicina tradicional são descritas diversas propriedades farmacológicas como antimalárica, no tratamento de infecções de pele, de distúrbios de fígado e de estômago. Possui ação anti-inflamatória, antimicrobiana, hepatoprotetora, antioxidante, mosquitocida e citotóxica contra células tumorais (BILANDA et al., 2017).

Em relação à composição fitoquímica da *B. pilosa*, estão presentes fenilpropanoides, poliacetilenos, alcaloides, polifenóis, triterpenos, chalconas, flavonoides, esteroides e saponinas. Esses compostos bioativos, principalmente as lactonas sesquiterpênicas e poliacetilenos, inibem o crescimento de microrganismos patogênicos e os flavonoides possuem ação anti-inflamatória importante (LIANG; XU, 2016).

Os extratos clorofórmicos, hidroalcoólicos, acetato de etila e metanólico já demonstraram efeito anticancerígeno em adenocarcinoma de cólon em estudos científicos

anteriores. Dentre estes, o clorofórmico foi o que apresentou maior citotoxicidade. Ainda, o metanólico exibiu maior atividade com concentrações citotóxicas mínimas (CTC50) de 965,2 µg/mL e 586,2 µg/mL em células HeLa e KB, respectivamente (BARTOLOME; VILLASEÑOR; YANG, 2013). Contudo, as alterações moleculares desencadeadas por seu extrato metanólico (ExM) no tratamento do CaM, sobretudo no CMTN, ainda não foram descritas.

Portanto, torna-se interessante compreender sua ação, especialmente na modulação de marcadores EMT. Sendo assim, o presente estudo concentra seus ensaios na avaliação da atividade antitumoral do ExM de *B. pilosa*, visando compreender os mecanismos modulados por seu tratamento em linhagem de CMTN.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos celulares e moleculares do ExM de *B. pilosa* sobre as linhagens celulares de CaM e CMTN.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do ExM de *B. pilosa* sobre linhagens celulares mamárias;
- ✓ Determinar a concentração ótima do ExM de *B. pilosa* no tratamento da linhagem tumoral mamária TN: MDA-MB-231;
- ✓ Avaliar o perfil de expressão dos genes *CDH1*, *VIM* e *CK18* (associados a EMT) após o tratamento do modelo celular de CMTN com ExM de *B. pilosa*;
- ✓ Definir o papel do ExM de *B. pilosa* na modulação de transcritos relacionados ao CMTN.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

No presente estudo foram utilizadas a linhagem não tumorigênica mamária MCF10A e três linhagens de CaM, sendo duas com fenótipo luminal T47D e MCF-7 e uma com fenótipo TN, MDA-MB-231 (basal). A linhagem MCF10A foi mantida em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 500ng/mL de hidrocortisona, 10µg/mL de insulina e 50µg/mL de gentamicina. Em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e 50µg/mL de gentamicina, foram cultivadas as células T47D e MCF-7. Todas as células supracitadas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂.

Já a MDA-MB-231 foi cultivada em meio L15 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50µg/mL de gentamicina mantidas a 37°C em uma atmosfera úmida sem CO₂. Os meios foram trocados em dias alternados até que as células atingissem 80% de confluência para serem usadas nos experimentos seguintes.

3.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O ExM de *B. pilosa* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho da UFJF. Para avaliar sua citotoxicidade e sua concentração ótima para a quantificação de transcritos associados à EMT em modelo celular de CMTN, foi realizado o ensaio colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazólico). Após confluência das células estas foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer utilizando o reagente azul de tripano. Em seguida, 1 x 10⁶ células/poço foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas por tempo necessário para a aderência das células.

Transcorrido esse período, foi adicionado 100 µL do extrato em diferentes concentrações finais (0,0078125 µg/µL; 0,015625 µg/µL; 0,03125 µg/µL; 0,0625 µg/µL; 0,125 µg/µL; 0,25 µg/µL; 0,5 µg/µL e 1 µg/µL) às linhagens celulares, incubadas durante 24h e 48h a 37°C, quando, então, foram adicionados 10 µL de MTT a 5 mg/mL (diluído em tampão fosfato salino-PBS 1x). As placas foram mantidas por 4 horas ao abrigo da luz e, em seguida, foram pipetados 50 µL de solução de SDS 20% com N-dimetil-formamida 50% em uma nova incubação por 16 horas. Após este tempo as amostras foram lidas a 570 a 590 nm em leitora Thermo Plate, TP-Reader. Para os ensaios foram adicionados os tratamentos com diluente (DMSO) e poços contendo apenas meio de cultura como controle negativo. Os cálculos de viabilidade foram realizados conforme a seguinte fórmula:

$$Viabilidade = \frac{AA - (ABSC - ABSM)}{ADMSO - (ABSC - ABSM)} \times 100$$

AA = Absorbância da Amostra

ABSC = Absorbância do controle de viabilidade (apenas com células)

ABSM = Absorbância do controle negativo (apenas meio de cultura)

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (DMSO)

3.3 Extração de RNA

Para a extração do RNA total das linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF10A, tratadas e não tratadas com 0,1 µg/mL do ExM de *B. pilosa* (concentração definida pelo MTT), foi utilizado o reagente TRIzol® Reagent (Invitrogen) e o protocolo executado conforme as recomendações do fornecedor. Em seguida, a qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 1 hora a 100 volts, utilizando o tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1mM EDTA) 0,5 X, corado com GelRed 1X (Amersham) e visualizado por luz ultravioleta no sistema de foto documentação Transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia). A quantificação do RNA foi conduzida em espectrofotômetro (PG Instruments) com leituras em 260 nm. Leituras em 280nm também foram realizadas e a razão 260nm/280nm foi considerada na validação da qualidade do material extraído. Este foi armazenado a -80°C para análises subsequentes.

3.4 Transcrição Reversa

Para a transcrição reversa (RT) foram preparadas soluções contendo 1µg de RNA total de cada amostra, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros (Invitrogen), incubadas a 37°C por 1 hora. O volume final de cada reação foi completado para 20 µL com água tratada com DEPC (Diethyl Polycarbonato – inibidor de RNase). As soluções foram posteriormente aquecidas a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e para inativação da transcriptase. Microtubos contendo apenas os reagentes, sem a adição do RNA total, foram incluídos para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C.

3.5 Quantificação Transcricional Relativa por PCR em Tempo Real

As quantificações relativas dos transcritos dos genes *CDH1*, *VIM* e *CK18* foram realizadas por PCR em tempo real (qPCR) a partir do cDNA previamente sintetizado. As amostras foram amplificadas em triplicata a partir de dois ensaios independentes e a detecção ocorreu pela emissão de fluorescência por SYBR®Green (Applied Biosystems). As reações foram preparadas para um volume final de 10µL, utilizando 5,0µL de Master Mix, 2 µL de cDNA (1:2) e 0,5µM de oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen). A ciclagem foi realizada conforme o padrão recomendado pelo equipamento StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) e as análises foram conduzidas em seu software adotando-se o método Cq comparativo. O gene Beta-2-microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nos ensaios de qPCR dos genes E-caderina (*CDH1*), Vimentina (*VIM*), Citoqueratina 18 (*CK18*) e o gene de referência Beta-2-microglobulina (*B2M*).

Gene	Sequência 5'- 3' (Forward – F and Reverse – R)	Fragmento amplificado (pb)
<i>CDH1</i>	F: GTCATTGAGCCTGGCAATTTAG R: GTTGAGACTCCTCCATTCCTTC	97
<i>VIM</i>	F: ACTAGAGATGGACAGGTTATCA R: GTAGGAGTGTCGGTTGTTAAG	218
<i>CK18</i>	F: GCTCTGGGTTGACCGTGG R: GTGGTGCTCTCCTCAATCTGC	151
<i>B2M</i>	F: CCTGCCGTGTGAACCATGT R: GCGGCATCTTCAAACCTCC	94

3.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados pelo software *GraphPad Prism* 8.0. Para os ensaios de MTT foi adotado o teste ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* e para os ensaios de qPCR

foi utilizado o teste t de *Student*. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

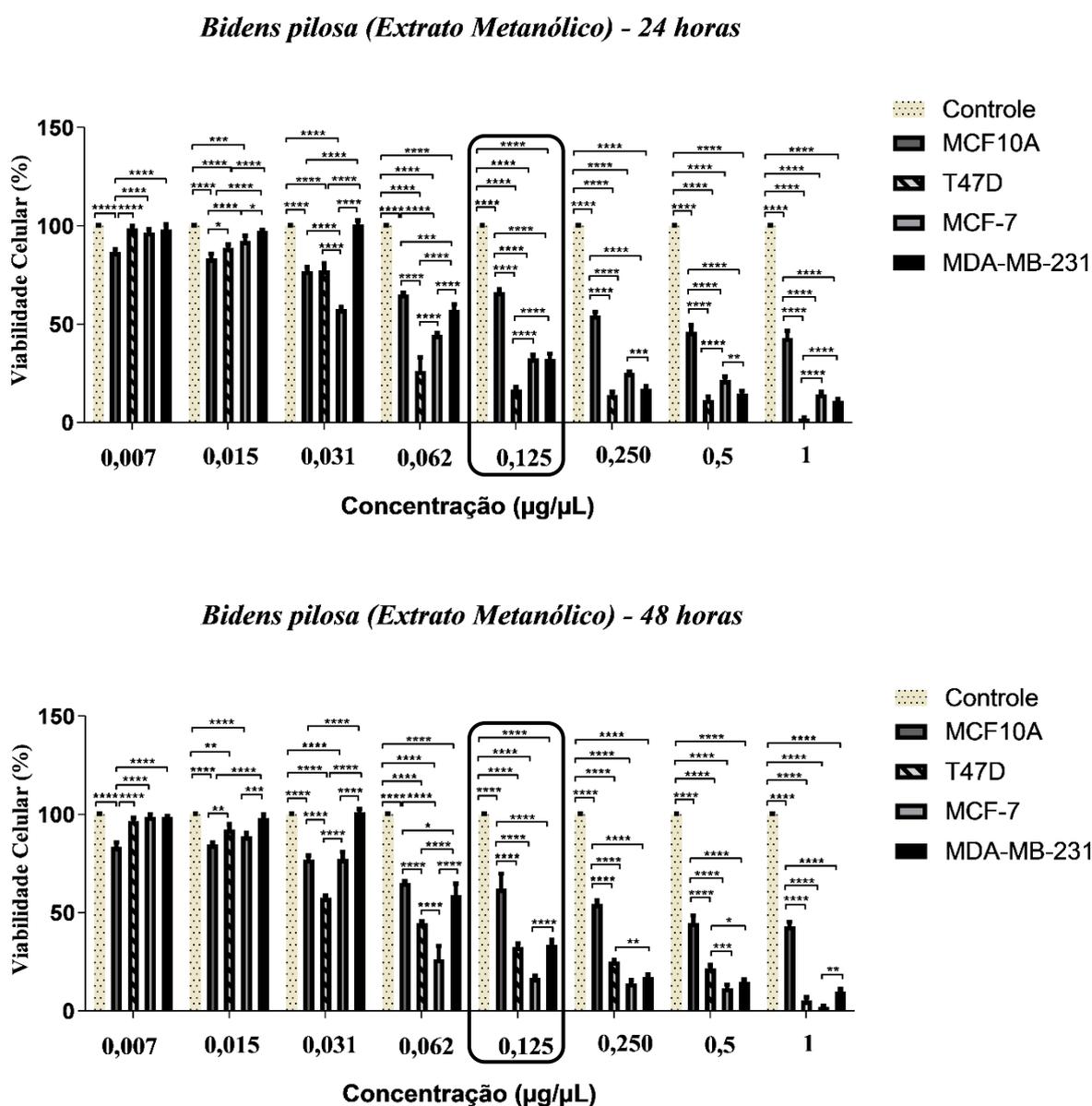
4 RESULTADOS

4.1 Ensaios de citotoxicidade

As respostas celulares ao tratamento com ExM de *B. pilosa* estão representados na Figura 5. Após 24 e 48 horas de tratamento, verificou-se uma redução de 50% da viabilidade celular ($p < 0,0001$), em todas as linhagens tumorais (T47D, MCF-7 e MDA-MB-231), nas concentrações 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando comparadas com o controle e com a linhagem não tumorigênica MCF10A. Além disso, é possível observar que a linhagem TN MDA-MB-231 teve sua viabilidade celular reduzida cerca de três vezes mais que a não tumorigênica MCF10A, nessas mesmas concentrações.

Em ambos os gráficos é possível observar que nas menores concentrações (0,007 e 0,015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) não houve diminuição significativa na viabilidade das linhagens tumorais. Além disso, o extrato se mostrou citotóxico à linhagem não tumorigênica, contudo, sua viabilidade permaneceu em média 85%. Entretanto, a partir da concentração de 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o efeito citotóxico foi mais proeminente nas linhagens tumorais. Nota-se também que as células T47D foram mais sensíveis ao tratamento em relação à MCF-7 no tempo de 24 horas. Após 48 horas o comportamento foi o inverso. Portanto, ambos fenótipos luminiais responderam de forma inversa em 24 e 48 horas a partir da concentração 0,062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Apesar do composto se apresentar mais citotóxico nas linhagens luminiais quando comparadas a linhagem TN, investigou-se a modulação dos genes da via EMT na MDA-MB-231 por esta representar um subtipo mais agressivo de CaM, que possui poucas opções de tratamento.

Figura 5. Comparação da viabilidade das linhagens MCF10A, T47D, MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com extrato metanólico de *B. pilosa*. Os resultados mostram a resposta celular após tratamento por 24 e 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). A área demarcada no gráfico indica a concentração em que se obteve melhor resposta citotóxica das células tumorais em relação à não tumorigênica.



O parâmetro denominado IC₅₀, apresentado na Tabela 2, se refere à medida quantitativa de quanto o extrato foi capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular. Em ambos os tempos os valores foram superiores para a linhagem não tumorigênica o que demonstra seletividade do ExM para células tumorais. De fato, a seletividade foi significativa após 24 horas (T47D=15,3; MCF-7=10,0 e MDA-MB-231=7,9) e 48 horas (T47D=10,9; MCF-7=16,4 e MDA-MB-231=8,2).

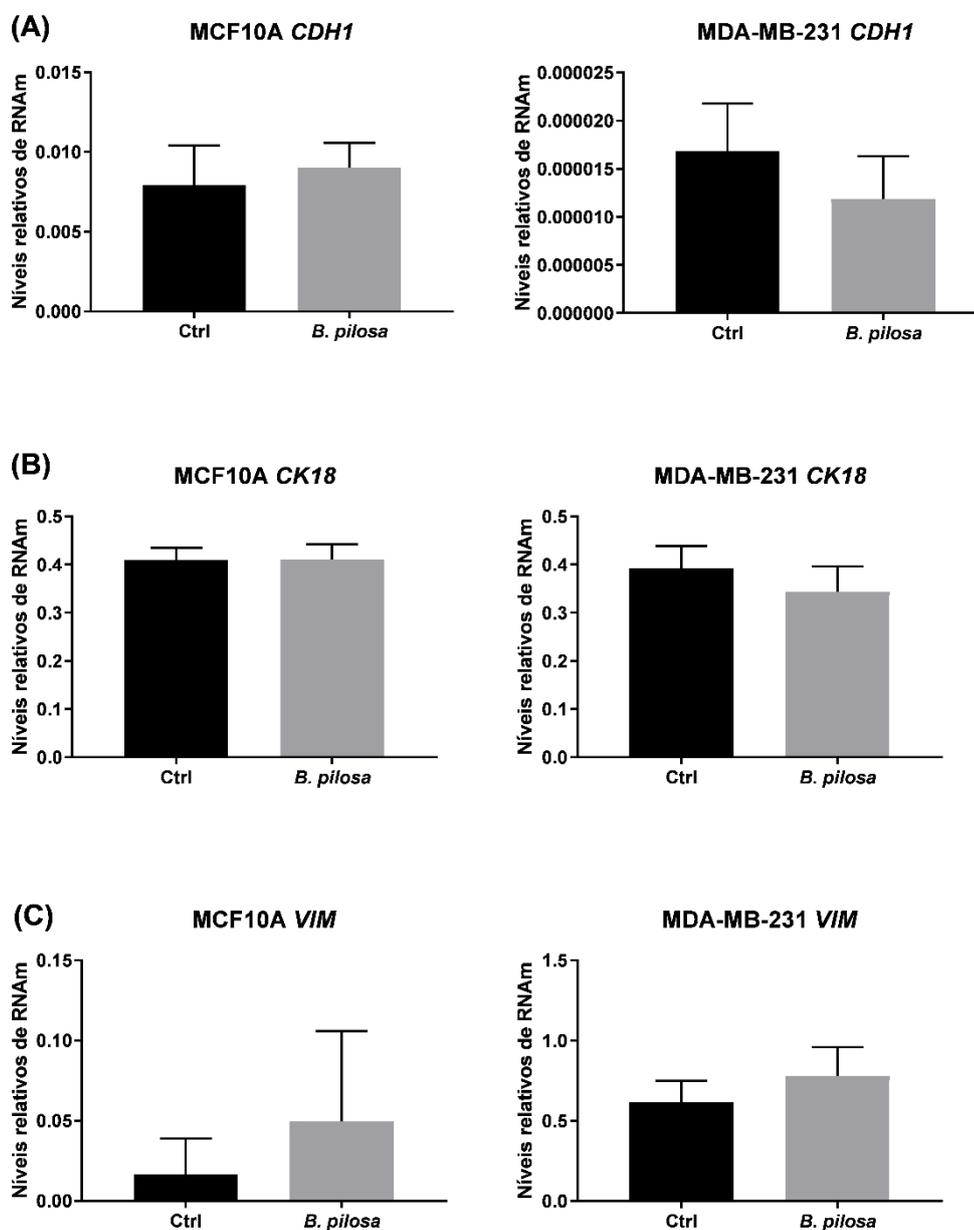
Tabela 2. Valores de IC50 após tratamento das linhagens celulares MCF10A, T47D, MCF-7 e MDA-MB-231 com extrato metanólico de *B. pilosa* ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Os valores foram obtidos por regressão não linear a partir dos dados observados no ensaio de citotoxicidade.

Linhagens Tempo	MCF10A	T47D	MCF-7	MDA-MB-231
	24 horas	0,720	0,047	0,072
48 horas	0,769	0,070	0,047	0,094

4.2 Perfil de expressão dos genes relacionados à EMT

A fim de elucidar os mecanismos modulados pelo ExM de *B. pilosa* foram realizados ensaios de qPCR para os genes *CDH1*, *VIM* e *CK18* após 48 horas de tratamento das linhagens. Os níveis basais de expressão desses genes também foram analisados. O ExM de *B. pilosa* foi utilizado na concentração de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes após o tratamento das linhagens MCF10A e MDA-MB-231 (Figura 6).

Figura 6. Quantificação relativa dos transcritos relacionados ao evento de transição epitélio-mesenquimal. Foram analisados os genes E-caderina (*CDH1*) (A), Citoqueratina 18 (*CK18*) (B) e Vimentina (*VIM*) (C) antes (Ctrl) e após o tratamento das linhagens MCF10A e MDA-MB-231 por 48 horas com extrato metanólico de *Bidens pilosa*.



5 DISCUSSÃO

O CMTN é um subtipo molecular agressivo e com elevado potencial metastático, desafiando a prática clínica por possuir restritas opções terapêuticas. A eficácia dos quimioterápicos existentes ainda é limitada frente à heterogeneidade dessas lesões, ao

desenvolvimento de mecanismos de resistência e à complexidade do microambiente tumoral (DEEPAK et al., 2020). A pesquisa envolvendo a descoberta de novas abordagens terapêuticas direcionadas e seletivas tem se tornado crucial para mitigar a agressividade do CMTN, aumentando a sobrevivência das pacientes. Nesse contexto, fitoquímicos ganham destaque por serem obtidos de fontes naturais, com reduzida toxicidade e notável espectro de atividades biológicas no controle de diversas doenças, incluindo o câncer. As propriedades desses compostos permitem a interação em diversas vias de sinalização e, portanto, atuam como agentes anticâncer promissores (BHATTACHARYA et al., 2020).

Estudos recentes têm demonstrado que metabólitos secundários, principalmente flavonoides, alcaloides, carotenoides e terpenoides, auxiliam no combate de tumores TN, inibindo a proliferação, angiogênese e invasão, além de induzirem danos ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose. Zhang et al. (2018) relataram que o tratamento de células MDA-MB-231 (modelo celular de CMTN) com extrato de *Ficus carica* promoveu o controle de sua proliferação com a parada do ciclo celular na fase S e regulou positivamente genes associados à apoptose como *BAX*, *TP53* e *TP21*. Dois carotenoides bioativos de açafrão (*Crocus sativus*), crocina e crocetina, também exerceram efeitos anti-metastáticos em tumores mamários TNs ao modularem genes da via Wnt/ β -catenina (ARZI et al., 2020). Portanto, investir tempo e recursos na validação de PNs para o tratamento oncológico é, indubitavelmente, interessante, uma vez que, além de bioativos, permitem a exploração de suas estruturas, ampliando seu espectro de ações (MALLA et al., 2020).

No presente estudo avaliamos os efeitos do ExM de *B. pilosa* sobre linhagens mamárias. Essa espécie tem se destacado por suas propriedades farmacológicas e nutricionais. Seu uso como fitoterápico vem sendo descrito cientificamente desde o século XX, com atividades antioxidantes e citotóxicas já relatadas sobre células tumorais de cólon humano (YI et al., 2016). A atividade antitumoral de *B. pilosa* foi primeiramente demonstrada na década de 1980 em estudos *in vitro* e *in vivo* e com diferentes solventes extratores. Sundararajan et al. (2006) relataram que o ExM bruto e a fração de acetato de etila (EtOAc) de *B. pilosa* são significativamente citotóxicos às linhagens humanas HeLa e KB, em tumor de colo de útero. Além disso, a fração EtOAc dessa planta inteira fresca também se mostrou supressora da proliferação celular e da formação de tubos nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) induzidas com bFGF (WU et al., 2004). O extrato aquoso também inibiu a proliferação de cinco linhagens celulares leucêmicas humanas: L1210, U937, K562, Raji e P3HR1, com um IC50 dose-dependente (CHANG et al. 2001). Ainda, seu extrato hexânico

comprometeu a viabilidade de linhagens de câncer de fígado e cólon humano (ALVAREZ et al. 1996; KUMARI et al. 2009).

Presentemente, avaliamos a capacidade do ExM de *B. pilosa* em interferir na viabilidade de células de CaM, sobretudo TN, pelo método colorimétrico utilizando MTT, o qual é amplamente adotado no rastreamento de substâncias biologicamente ativas. De fato, avaliar o perfil citotóxico de um composto sobre modelos celulares requer ensaios sensíveis, com reprodutibilidade e menor variação nos resultados. Nesse sentido, o ensaio de redução de MTT é um experimento simples, rápido e quantitativo, utilizado na triagem de compostos promissores (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Nos últimos anos, muita atenção tem sido focada em testes quimiossensíveis para selecionar substâncias citotóxicas eficientes no combate do CaM e do CMTN. Ensaios de MTT em células MDA-MB-231 demonstraram o efeito citotóxico da quercetina (NGUYEN et al., 2017). Esse ensaio também foi utilizado para avaliar a viabilidade das linhagens celulares de CMTN (MDA-MB-231 e BT549) tratadas com berberina (ZHAO et al., 2017), por exemplo.

Observamos que o ExM de *B. pilosa* foi citotóxico às células tumorais mamárias a partir da concentração de 0,125µg/µL em ambos os tempos de tratamento. Apesar da T47D ter se mostrado mais sensível ao tratamento no tempo de 24 em relação ao tempo de 48 horas, apresentando uma viabilidade aumentada, pesquisadores sugerem que essa linhagem possui uma capacidade de autorrenovação relacionada à sinalização da via Wnt/β-catenina, além de possuírem células iniciadoras de CaM altamente tumorigênicas (CICs), exibindo um fenótipo de células-tronco cancerígenas (LAGADEC et al., 2010; HUANG et al., 2018).

Falowo et al. (2016) revelaram que o extrato bruto etanol/água das folhas de *B. pilosa* possuem quantidades significativas de compostos fenólicos capazes de eliminar radicais livres. Além disso, as partes aéreas dessa planta, obtidos através do extrato hidroalcoólico e posteriormente fracionados com metanol, clorofórmio e acetato de etila, possui capacidade de reduzir tumores e contagem de células cancerígenas em tumor Ascítico de Ehrlich, (KVIECINSKI et al., 2008) o que evidencia a presença de compostos relevantes e passíveis de combater o CMTN. Nesse contexto, Xuan e Khanh (2016) investigaram a composição fitoquímica de *B. pilosa* e descreveram a presença de 301 compostos. Evidências sugerem que a complexidade fitoquímica dessa espécie pode ser responsável por suas atividades bioativas. Dentre as substâncias os poliacetilenos, os flavonoides, os triterpenos e alguns óleos essenciais são considerados seus principais constituintes.

Os solventes orgânicos definem quais metabólitos serão separados em maior quantidade de acordo com a polaridade e/ou solubilidade do composto com o solvente (JONES;

KINGHORN, 2012). Frequentemente, as frações mais usadas são a de metanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio, éter de petróleo, butanol e etanol. Em estudos demonstrando as análises dos compostos de *B. pilosa*, foram isolados da fração de acetato de etila flavonoides e poliacetilenos (ácido vanílico, kaempferol, derivados da quercetina, entre outros) (WU et al., 2013). Da fração de éter de petróleo, foram obtidos triterpenos e fitoesteróis (SHEN et al., 2018). Derivados de quercetina já foram descritos em extratos de butanol (BuOH) de *B. pilosa* inibindo o t-PA (ativador plasminogênio tissular) e o u-PA (ativador plasminogênio da uroquinase), envolvidos no processo de migração celular e indução de mediadores inflamatórios. Além disso, a centaureína e a apigenina já foram identificadas em extratos butanólico e metanólico, sendo associadas ao estímulo da imunidade antitumoral e à morte de células derivadas de CaM, linfoma, melanoma e carcinoma de cólon. A buteína isolada do extrato de BuOH, por sua vez, também induziu a apoptose e parada do ciclo celular, além de inibir a aromatase e NF- κ B, (CHIANG et al., 2004; MOON et al., 2010). Como diferentes solventes extratores são responsáveis por determinar compostos majoritários distintos, o solvente utilizado neste estudo favoreceu a separação de metabólitos majoritários responsáveis pela citotoxicidade observada.

Compostos fenólicos como ácido gálico, catequina, kaempferol, ácido felúrico e paclitaxel já foram detectados no extrato metanólico de *B. pilosa* (SINGH et al., 2017). Ambos, kaempferol e paclitaxel, são quimioterápicos usados para o tratamento de tumores (HU et al., 2019; BEG et al., 2019). Adicionalmente, por meio da análise por GC-MS de ExM foram identificados outros seis compostos voláteis (1,3,6,10-dodecatetraeno, 3,7,11-trimetil- (Z, E); 1H-3A, 7-metanozuleno, octa-hidro-1,4,9,9-tetrametilo; 9H-Fluoreno, 9-Diazo; 1-octadecino; Ácido N-hexadecanóico e 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol), também com resultados promissores contra células tumorais. Esses dados evidenciam a necessidade de se caracterizar os compostos majoritários do extrato utilizado para, assim, direcionar estudos posteriores mais robustos na validação de seu uso como estratégia de tratamento para o CMTN.

O CMTN possui resposta clínica agressiva, com poucas opções de tratamento e ainda incipiente conhecimento acerca de suas alterações moleculares. *CDH1*, *CK18* e *VIM* são descritos como marcadores desse processo (CHO et al., 2020) e mudanças em suas expressões podem prever a agressividade de tumores. Contudo, o ExM de *B. pilosa* não modulou a expressão desses genes e sugerimos que os efeitos do extrato decorrem da alteração de outros mecanismos como proliferação, apoptose, autofagia e/ou angiogênese.

6 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que o ExM de *B. pilosa* foi citotóxico e seletivo para linhagens tumorais mamárias (T47D, MCF-7, MDA-MB-231), quando comparadas à linhagem não tumoral (MCF10A). Além disso, o extrato foi claramente citotóxico para a linhagem de CMTN, a qual representa tumores que carecem de terapias amplamente eficazes. O extrato não modulou genes relacionados à EMT, contudo, nossos resultados subsidiam estudos adicionais para a obtenção do composto majoritário do ExM de *B. pilosa* e para elucidar quais vias biológicas são afetadas no CaM após seu tratamento com esse composto para que, assim, possam ser sugeridas novas alternativas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

A, Richards M. The National Awareness and Early Diagnosis Initiative in England: assembling the evidence. **British Journal Of Cancer**. Eua, p. 1-4. 03 dez. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/6605382>>. Acesso em: 24 out. 2018.

ABREU, Evaldo de; KOIFMAN, Sergio. **Fatores Prognósticos do câncer de mama**. 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v01/pdf/revisao.pdf>. Acesso em: 25 out. 2018.

ALI, Arwa M. et al. Triple Negative Breast Cancer: A Tale of Two Decades. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.491-499, 7 abr. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520616666160725112335>.

AL-KHADAIRI, Ghaneya et al. PRAME promotes epithelial-to-mesenchymal transition in triple negative breast cancer. **Journal Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-14, 3 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-018-1757-3>.

ALVAREZ, Laura et al. Bioactive Polyacetylenes from *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, [S.L.], v. 62, n. 04, p. 355-357, ago. 1996. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957902>.

AMENDOLA, Luis Cláudio Belo; VIEIRA, Roberto. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 51, p.325-330, set. 2005. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_51/v04/pdf/revisao3.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2019.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Biopsy**. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-biopsy.html>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Ultrasound**. 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-ultrasound.html>>. Acesso em: 22 out. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Surgery for Breast Cancer**. 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 28 out. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treating Breast Cancer**. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>>. Acesso em: 28 out. 2018.

ANIOGO, Eric Chekwube; GEORGE, Blassan Plackal Adimuriyil; ABRAHAMSE, Heidi. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. **Expert Review Of Anticancer Therapy**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.693-702, 3 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14737140.2017.1347505>.

ARZI, Laleh et al. A Comparative Study on Anti-Invasion, Antimigration, and Antiadhesion Effects of the Bioactive Carotenoids of Saffron on 4T1 Breast Cancer Cells Through Their Effects on Wnt/ β -Catenin Pathway Genes. **Dna And Cell Biology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.697-707, ago. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2018.4248>.

ARZI, Laleh et al. Anti-metastatic properties of a potent herbal combination in cell and mice models of triple negative breast cancer. **Life Sciences**, [S.L.], v. 243, n. 24, p. 1-12, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117245>.

ARZI, Laleh et al. Inhibitory Effect of Crocin on Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer by Interfering with Wnt/ β -Catenin Pathway in Murine Model. **Dna And Cell Biology**, [s.l.], v. 37, n. 12, p.1068-1075, dez. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2018.4351>.

BARTOLOME, Arlene P.; VILLASEÑOR, Irene M.; YANG, Wen-chin. Bidens pilosaL. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2013, p.1-51, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/340215>.

BEG, Sarwar et al. QbD-based development of cationic self-nanoemulsifying drug delivery systems of paclitaxel with Improved biopharmaceutical attributes. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 3, p. 118, 2019.

BIDARD, Francois-Clement; PROUDHON, Charlotte; PIERGA, Jean-Yves. Circulating tumor cells in breast cancer. **Molecular Oncology**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 418-430, 12 jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.001>.

BHATEJA, Priyanka et al. The Hedgehog Signaling Pathway: a viable target in breast cancer?. : A Viable Target in Breast Cancer?. **Cancers**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. 1126-1138, 7 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11081126>.

BHATTACHARYA, Saurav et al. Delivery of thymoquinone through hyaluronic acid-decorated mixed Pluronic® nanoparticles to attenuate angiogenesis and metastasis of triple-negative breast cancer. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 322, n. 10, p. 357-374, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.033>.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estatísticas de câncer**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

BRINKLEY, B. R. et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. In: **Cancer Research**. 1980;40: 3118-3129. PMID 7000337

BONILLA, J.a. Merino; TABANERA, M. Torres; MENDOZA, L.h. Ros. El cáncer de mama en el siglo xxi: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. **Radiology**, [s.l.], v. 59, n. 5, p.368-379, jun. 2017. Publicado por Elsevier Espanha.

BOZZA, William P.; ZHANG, Yaqin; ZHANG, Baolin. Cytokeratin 8/18 protects breast cancer cell lines from TRAIL-induced apoptosis. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 33, p.23264-23273, 19 abr. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25297>.

CAMARGO JUNIOR, Hélio. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. **Biópsia de mama: linhas gerais**. 2018. Disponível em: <<https://www.febrasgo.org.br/pt/noticias/item/318-biopsia-de-mama-linhas-gerais>>. Acesso em: 22 out. 2018.

CANCER RESEARCH UK. **Breast MRI scan**. 2017. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/getting-diagnosed/tests-diagnose/breast-mri-scan>>. Acesso em: 23 out. 2018.

CANCER RESEARCH UK. **Finding breast cancer early**. 2017. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/getting-diagnosed/finding-breast-cancer-early>>. Acesso em: 24 out. 2018.

CANTLEY, Lewis C. et al (Comp.). Atezolizumab Combo Approved for PD-L1–positive TNBC. **Cancer Discovery**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.2159-8274, 20 mar. 2019. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-nb2019-038>.

CASTANEDA, Serguei A.; STRASSER, Jon. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. **Surgical Oncology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.371-382, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2017.01.013>.

CHAI, Dandan et al. β 2-microglobulin has a different regulatory molecular mechanism between ER+ and ER- breast cancer with HER2-. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.1-11, 12 mar. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-019-5410-1>.

CHANG, Jung-San et al. Antileukemic Activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. **The American Journal Of Chinese Medicine**, [S.L.], v. 29, n. 02, p. 303-312, jan. 2001. World Scientific Pub Co Pte Lt. <http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x01000320>.

CHAUDHARY, Lubna N.; WILKINSON, K. Hope; KONG, Amanda. Triple-Negative Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.141-153, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.004>.

CHEN, Tong et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 232, n. 12, p.3261-3272, 10 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.25797>.

CHEZEM, William R.; CLAY, Nicole K.. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 131, p.26-43, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.08.006>.

CHIANG, Yi-ming et al. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 95, n. 2-3, p. 409-419, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.010>.

CHO, Eunae et al. Breast Cancer Subtypes Underlying EMT-Mediated Catabolic Metabolism. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 2064-2077, 10 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9092064>.

CONEJO, Inmaculada et al. Effect of neuromuscular taping on musculoskeletal disorders secondary to the use of aromatase inhibitors in breast cancer survivors: a pragmatic randomised clinical trial. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-19, 11 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-018-2236-3>.

DEEPAK, K.G.K. et al. Tumor microenvironment: challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. : Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 153, n. 19, p. 1-35, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104683>.

DHAWAN, Udesh et al. Nanochip-induced Epithelial to Mesenchymal Transition: Impact of physical microenvironment on cancer metastasis. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 14, n. 10, p.11474-11485, 20 mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.7b19467>.

DONEPUDI, Mallika Siva et al. Breast cancer statistics and markers. **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**. Department Of Biotechnology, Acharya Nagarjuna University, Guntur, Andhra Pradesh, India, p. 506-511. jul. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313729>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

DUTRA, Rafael C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 112, p.4-29, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>.

EIRIKSSON, Finnur Freyr et al. Lipidomic study of cell lines reveals differences between breast cancer subtypes. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1-22, 14 abr. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0231289>.

FALANDO SOBRE CÂNCER DE MAMA. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer** (inca) Coordenação de Prevenção e Vigilância – Conprev, 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/falando_cancer_mama1.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2019.

FALOWO, A. B. et al. Antioxidant activities of Moringa oleifera L. and Bidens pilosa L. leaf extracts and their effects on oxidative stability of ground raw beef during refrigeration storage. **Cyta - Journal Of Food**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 249-256, 8 dez. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2016.1243587>.

FELDEN, Jussara Beatriz Borre; FIGUEIREDO, Andreia Cristina Leal. Distribuição da gordura corporal e câncer de mama: um estudo de caso-controle no Sul do Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, Canoas, v. 16, n. 5, p.2425-2433, nov. 2011.

FENG, Yixiao et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.77-106, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

FORNAGE, Bruno D.; HWANG, Rosa F.. Current Status of Imaging-Guided Percutaneous Ablation of Breast Cancer. **American Journal Of Roentgenology**, [s.l.], v. 203, n. 2, p.442-448, ago. 2014. American Roentgen Ray Society. <http://dx.doi.org/10.2214/ajr.13.11600>.

FLEMBAN, Arwa; QUALTROUGH, David. The Potential Role of Hedgehog Signaling in the Luminal/Basal Phenotype of Breast Epithelia and in Breast Cancer Invasion and Metastasis. **Cancers**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.1863-1884, 16 set. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers7030866>.

FUMAGALI, Elisângela et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.627-641, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000400022>.

GADI, Vijayakrishna K.; DAVIDSON, Nancy E.. Practical Approach to Triple-Negative Breast Cancer. **Journal Of Oncology Practice**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.293-300, maio 2017. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jop.2017.022632>.

GILBERT, Benjamin; ALVES, Lucio Ferreira; FAVORETO, Rita. *Bidens pilosa* L. Asteraceae (Compositae; subfamília Heliantheae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 8, p.53-67, jan. 2013. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/15136/2/16.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

GOBBI, Helenice. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Bras Patol Med Lab**, Brasil, v. 48, n. 6, p.463-474, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v48n6/v48n6a13.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2019.

GUO, Yubo; FAN, Yingyi; PEI, Xiaohua. Fangjihuangqi Decoction inhibits MDA-MB-231 cell invasion in vitro and decreases tumor growth and metastasis in triple-negative breast cancer xenografts tumor zebrafish model. **Cancer Medicine**, [s.l.], v. 0, n. 0, p.1-15, 9 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.2894>.

HA, Su Min et al. Association of BRCA Mutation Types, Imaging Features, and Pathologic Findings in Patients With Breast Cancer With BRCA1 and BRCA2 Mutations. **American Journal Of Roentgenology**, [s.l.], v. 209, n. 4, p.920-928, out. 2017. American Roentgen Ray Society. <http://dx.doi.org/10.2214/ajr.16.16957>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796549>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

HARVEY, Alan L.; EDRADA-EBEL, Ruangelie; QUINN, Ronald J.. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.111-129, 23 jan. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4510>.

HAVARD, Robert; HENRY, N Lynn. Integrating clinicopathologic and genomic tools in chemotherapy decision-making for early stage breast cancer. **Future Oncology**, [s.l.], v. 13,

n. 28, p.2507-2510, dez. 2017. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fon-2017-0452>.

HOLLESTELLE, Antoinette et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 121, n. 1, p.53-64, 11 jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-009-0460-8>.

HU, Gaowu et al. IQ Motif Containing GTPase-Activating Protein 3 (IQGAP3) Inhibits Kaempferol-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells by Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2) Signaling Activation. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 25, p. 7666, 2019.

HUANG, Yun et al. Overexpressed ACBD3 has prognostic value in human breast cancer and promotes the self-renewal potential of breast cancer cells by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 363, n. 1, p. 39-47, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.003>.

HUGO, H. J. et al. Epithelial requirement for in vitro proliferation and xenograft growth and metastasis of MDA-MB-468 human breast cancer cells: oncogenic rather than tumor-suppressive role of E-cadherin. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.1-25, 27 jul. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-017-0880-z>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Câncer de Mama**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Controle do câncer de mama: Tratamento**. 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento>. Acesso em: 28 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Estatísticas de câncer**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 01 mar. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Fatores de risco**. 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1>. Acesso em: 22 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **O que é o câncer?** 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 22 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Tratamento para o câncer de mama**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/acoes-de-controle/tratamento>>. Acesso em: 02 jan. 2019.

INTERNATIONAL AGENCY RESEARCH ON CANCER. **Estimated number of prevalence cases (5-year) in 2018, worldwide, all cancers, females, all ages**. 2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id>. Acesso em: 22 out. 2018.

JAMDADE, Vinayak S et al. Therapeutic targets of triple-negative breast cancer: a review. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 172, n. 17, p.4228-4237, 30 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13211>.

JITARIU, Adriana-andreea et al. Triple negative breast cancer: the kiss of death. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 28, p.46652-46662, 7 abr. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.16938>.

JONES, William P.; KINGHORN, A. Douglas. Extraction of Plant Secondary Metabolites. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 341-366, 2012. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13

JORDE, Lynn B. et al. **GENÉTICA MÉDICA**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 403 p.

JUNG, Hyejung et al. Cytokeratin 18 is necessary for initiation of TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 423, n. 1-2, p.21-28, 13 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-016-2818-7>.

İKALAMERA, Dubravka et al. Genome-wide gain-of-function screen for genes that induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 38, p.61000-61020, 16 ago. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11314>

KAO, Jessica et al. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. **Plos One**, [s.l.], v. 4, n. 7, p.6146-6162, 3 jul. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006146>.

KRIEGMAIR, M.c. et al. Prognostic Value of Molecular Breast Cancer Subtypes based on Her2, ESR1, PGR and Ki67 mRNA-Expression in Muscle Invasive Bladder Cancer. **Translational Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.467-476, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2018.02.001>.

KUMAR, Aviral; GOLANI, Aparna; KUMAR, Lekha Dinesh. EMT in breast cancer metastasis: an interplay of microRNAs, signaling pathways and circulating tumor cells. **Frontiers In Bioscience**, [s.i.], v. 25, n. 1, p.979-1010, 1 mar. 2020.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D.. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2018, n. 6, p. 1-4, jun. 2018. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.

KUMARI, Priyanka et al. A promising anticancer and antimalarial component from the leaves of *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v. 75, n. 1, p. 59, 2009.

KVIECINSKI, Maicon Roberto et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 117, n. 1, p. 69-75, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.017>.

LAGADEC, Chann et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. **Breast Cancer Research**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-13, fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2479>.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.178-196, 21 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3758>.

LI, Peng et al. The expression of NEDD9 and E-cadherin correlates with metastasis and poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], v. 9, n. -, p.5751-5759, set. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ott.s113768>.

LI, Xiaoxian et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 161, n. 2, p.279-287, 25 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-016-4059-6>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-016-4059-6>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

LI, Zhan et al. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.16445-16455, 27 jan. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.14860>.

LIAO, Tsai-tsen; YANG, Muh-hwa. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.792-804, 26 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.12096>.

LIANG, Xianrui; XU, Qiao. Separation and identification of phenolic compounds in *Bidens pilosa* L. by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 39, n. 10, p.1853-1862, maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201600017>.

LIU, Chengyi et al. Natural cordycepin induces apoptosis and suppresses metastasis in breast cancer cells by inhibiting the Hedgehog pathway. **Food & Function**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 2107-2116, mar. 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9fo02879j>.

LIU, Mengyuan et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on cell-surface vimentin-positive circulating tumor cells in gastric cancer patients. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. -, n. -, p.1-17, 28 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.12643>.

MALLA, Rama Rao et al. Breast Tumor Microenvironment: emerging target of therapeutic phytochemicals. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 1-53, 11 mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153227>.

MAMON, H. J. et al. Differing effects of breast cancer 1, early onset (BRCA1) and ataxia-telangiectasia mutated (ATM) mutations on cellular responses to ionizing radiation. **International Journal Of Radiation Biology**. [s.l.], p. 817-829. out. 2003.

MARCHIO, C et al. Predictive Diagnostic Pathology in the Target Therapy Era in Breast Cancer. **Curr Drug Targets**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.4-12, nov. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25654739>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

MARCUCCI, Fabrizio; STASSI, Giorgio; MARIA, Ruggero de. Epithelial–mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.311-325, 29 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2015.13>.

MAROTTI, Jonathan D. et al. Triple-Negative Breast Cancer. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 187, n. 10, p.2133-2138, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.05.018>.

MEMNI, Hager et al. E-cadherin genetic variants predict survival outcome in breast cancer patients. **Journal Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-12, 16 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-016-1077-4>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **TNM Classificação de Tumores Malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Esdeva, 2004. 254 p. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/tnm2.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

MOHAMMED, Mohammed Elimam Ahamed; ELHASSAN, Nuha Mohammed. Cytoskeletal and extracellular matrix proteins as markers for metastatic triple negative breast cancer. **Journal Of International Medical Research**, [s.l.], v. 47, n. 11, p.5767-5776, 11 out. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0300060519877079>.

MOON, Dong-oh et al. Butein suppresses the expression of nuclear factor-kappa B-mediated matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in prostate cancer cells. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 24, n. 7, p. 1927-1934, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.08.002>.

NAGINI, Siddavaram. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.152-163, 12 jan. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NIH. **How Cancer Is Diagnosed**. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>>. Acesso em: 24 out. 2018.

NEVE, Richard M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.515-527, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>.

NGUYEN, Lich Thi et al. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. **The Korean Journal Of Physiology & Pharmacology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 205-213, jan. 2017. The Korean Physiological Society and The Korean Society of Pharmacology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2017.21.2.205>.

NIGRO, Janice M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, [s.l.], v. 342, n. 6250, p.705-708, dez. 1989. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/342705a0>.

ONU Brasil (Org.). **OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo**. 2017. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>. Acesso em: 22 out. 2018.

OPAS/OMS (Org.). **Folha informativa - Câncer**. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839>. Acesso em: 22 out. 2018.

PADILHA, M et al. Neoadjuvant radiotherapy and hormonotherapy in locally advanced breast cancer: state of the art. **Acta Med Port**, Coimbra, v. 25, n. 6, p.327-335, dez. 2012. Serviço de Radioterapia, Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Coimbra, Portugal.

PANDYA, Sonali; MOORE, Richard G.. Breast Development and Anatomy. **Clinical Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.91-95, mar. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/grf.0b013e318207ffe9>.

PEIXOTO, Josana de Castro et al. Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and Biological Profile. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 16, p.2891-2905, 9 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24162891>.

PEUHU, Emilia et al. Epithelial vimentin plays a functional role in mammary gland development. **Development**, [s.l.], v. 144, n. 22, p.4103-4113, 25 set. 2017. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.154229>.

PEROU, C. M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. **The Oncologist**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.61-70, jan. 2011. <http://dx.doi:10.1634/theoncologist.2011-s1-61>

PINHO, Inês Sasso Soares de. **Fenótipos Diferentes de uma Neoplasia Comum: Carcinoma Metaplásico da Mama com Diferenciação Condróide**. 2017. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Instituto de Anatomia Patológica, Universidade de Lisboa, 2017. Disponível em: <<http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/31361/1/InesSSPinho.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2019.

PINTO, Graciele Fernanda de Souza. **Fitotoxicidade e análise fitoquímica a partir de folhas de cinco espécies de cerrado**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências, Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Unesp, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2015.

POLIOUDAKI, Hara et al. Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-10, 13 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1386-7>.

PRAT, Aleix et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 142, n. 2, p.237-255, 27 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-013-2743-3>.

PRAT, Aleix et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, [s.l.], v. 24, p.1-10, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>.

PULASKI, Beth A.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols In Immunology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.1-16, out. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.

REDDEN, Meredith H.; FUHRMAN, George M.. Neoadjuvant Chemotherapy in the Treatment of Breast Cancer. **Surgical Clinics Of North America**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.493-499, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2013.01.006>.

SACHDEV, Esha et al. PARP Inhibition in Cancer: An Update on Clinical Development. **Targeted Oncology**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.657-679, 17 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11523-019-00680-2>.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 16, p. 410-411.

SATYA-PRAKASH, K.I. et al. Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. **Cancer Genetics And Cytogenetics**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.61-73, jan. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-4608\(81\)90057-1](http://dx.doi.org/10.1016/0165-4608(81)90057-1).

SINGH, Garima et al. Pharmacological potential of *Bidens pilosa* L. and determination of bioactive compounds using UHPLC-QqQLIT-MS/MS and GC/MS. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-16, 16 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-2000-0>.

SHAMSI, Mahdiyeh; ISLAMIAN, Jalil Pirayesh. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. **Nuclear Medicine Review**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.45-48, 31 jan. 2017. VM Media SP. zo.o VM Group SK. <http://dx.doi.org/10.5603/nmr.2017.0002>.

SHEN, Yiwei et al. Anticancer effect of petroleum ether extract from *Bidens pilosa* L and its constituent's analysis by GC-MS. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 217, n. 1, p. 126-133, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.019>.

SNELL, Cameron E et al. Improved relapse-free survival on aromatase inhibitors in breast cancer is associated with interaction between oestrogen receptor- α and progesterone receptor-b. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 119, n. 11, p. 1316-1325, nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-018-0331-3>.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 19, p.10869-10874, 11 set. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191367098>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815>>. Acesso em: 21 mar. 2019

SUBRAMANI, Ramadevi; LAKSHMANASWAMY, Rajkumar. Complementary and Alternative Medicine and Breast Cancer. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [s.l.], p.231-274, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.008>

SUNDARARAJAN, Parimalakrishnan et al. Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. **African health sciences**, v. 6, n. 1, p. 27-30, 2006.

SUNG, Janice S. et al. Breast Cancers Detected at Screening MR Imaging and Mammography in Patients at High Risk: Method of Detection Reflects Tumor Histopathologic Results. **Radiology**, [s.l.], v. 280, n. 3, p.716-722, set. 2016. Radiological Society of North America (RSNA). <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2016151419>. Disponível em: <<https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2016151419>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

SMITH, Shari E. et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.1-15, 5 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-017-0855-0>.

SRINIVASARAGHAVAN, Vaishnavi; STROBL, Jeannine; AGAH, Masoud. Microelectrode bioimpedance analysis distinguishes basal and claudin-low subtypes of triple negative breast cancer cells. **Biomedical Microdevices**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.1-11, 29 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10544-015-9977-2>.

STEWART, Teneale A. et al. Janus kinases and Src family kinases in the regulation of EGF-induced vimentin expression in MDA-MB-468 breast cancer cells. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 76, p.64-74, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.007>.

STROUHALOVA, Katerina et al. Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. **Cancers**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-20, 11 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12010184>.

SWOBODA, April; NANDA, Rita. Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. **Optimizing Breast Cancer Management**, [s.l.], v. 173, n. 5, p.155-165, 20 jan. 2018. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-70197-4_10.

TANG, X et al. Cystine addiction of triple-negative breast cancer associated with EMT augmented death signaling. **Oncogene**, [s.l.], v. 36, n.30, p.4235-4242, 21 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.394>.

TELANG, Nitin; NAIR, Hareesh; WONG, George. Growth inhibitory efficacy of *Cornus officinalis* in a cell culture model for triple-negative breast cancer. **Oncology Letters**, [s.l.], p.5261-5266, 21 mar. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2019.10182>.

UICC. **What is TNM?** 2018. Disponível em: <<https://www.uicc.org/resources/tnm>>. Acesso em: 27 out. 2018.

VALLA, M. et al. Molecular Subtypes of Breast Cancer: Long-term Incidence Trends and Prognostic Differences. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 25, n. 12, p.1625-1634, 26 set. 2016. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-16-0427>.

VENERIS, Jennifer Taylor et al. Choosing wisely: Selecting PARP inhibitor combinations to promote anti-tumor immune responses beyond BRCA mutations. **Gynecologic Oncology**, [s.l.], v. 156, n. 2, p.488-497, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.09.021>.

VIRTAKOIVU, Reetta et al. Vimentin–ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. **Cancer Research**, [s.l.], v. 75, n. 11, p.2349-2362, 8 abr. 2015. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-14-2842>.

VUORILUOTO, K et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. **Oncogene**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.1436-1448, 8 nov. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.509>.

WAGNER, Mônica Silveira et al. Revitalizing the AZT Through of the Selenium: an approach in human triple negative breast cancer cell line. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 8, p. 525-538, 14 nov. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2018.00525>.

WANG, Shushu et al. Triple Negative Breast Cancer Depends on Sphingosine Kinase 1 (SphK1)/Sphingosine-1-Phosphate (S1P)/Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3 (S1PR3)/Notch Signaling for Metastasis. **Medical Science Monitor**, [s.l.], v. 24, p.1912-1923, 1 abr. 2018. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.905833>.

WILS, Leon J; BIJLSMA, Maarten F. Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 121, p.23-44, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.013>.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL. **Body fatness & weight gain: Body fatness and weight gain and the risk of cancer**. 2018. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/dietandcancer/exposures/body-fatness>>. Acesso em: 24 out. 2018.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL. **Lactation (breastfeeding): Lactation and the risk of cancer**. 2018. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/dietandcancer/exposures/lactation-breastfeeding>>. Acesso em: 24 out. 2018.

WU, Hua-tao et al. Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor ZEB1 in breast cancer. **Journal Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-10, 3 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-020-02240-z>.

WU, Jianguo et al. Chemical Constituents of Bidens pilosa var. radiata. **Chemistry Of Natural Compounds**, [s.l.], v. 49, n. 4, p. 759-760, set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0733-7>.

WU, Li-Wha et al. Polyacetylenes Function as Anti-Angiogenic Agents. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 2112-2119, nov. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/b:pham.0000048204.08865.41>.

WU, Qiong et al. Epithelial cell adhesion molecule and epithelial-mesenchymal transition are associated with vasculogenic mimicry, poor prognosis, and metastasis of triple negative breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, [s.i], v. 12, n. 5, p.1678-1689, maio 2019.

WYLD, Lynda; AUDISIO, Riccardo A.; POSTON, Graeme J.. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.115-124, 11 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.191>.

XUAN, Tran Dang; KHANH, Tran Dang. Chemistry and pharmacology of *Bidens pilosa*: an overview. **Journal Of Pharmaceutical Investigation**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 91-132, 30 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40005-016-0231-6>.

YAMASHITA, Nami et al. Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1003-1009, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2018.02.002>.

YAMASHITA, Nami et al. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, [s.l.], v. 139, n. 5, p.739-746, 26 jan. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-013-1376-6>.

YANG, Hsin-ling et al. Anti-EMT properties of CoQ0 attributed to PI3K/AKT/NFKB/MMP-9 signaling pathway through ROS-mediated apoptosis. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.1-21, 8 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-019-1196-x>.

YANG, Jiangling et al. Prognostic value and clinicopathological significance of serum- and tissue-based cytokeratin 18 express level in breast cancer: a meta-analysis. **Bioscience Reports**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.1-38, 5 fev. 2018. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20171145>.

YEUNG, Kay T.; YANG, Jing. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.28-39, 9 dez. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.12017>.

YI, Jun et al. Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Flavonoids from *Bidens pilosa* L var *radiata* Sch Bip. **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 341-348, 4 mar. 2016. African Journals Online (AJOL). <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i2.17>.

YILDIRIM, Hasan. **An alien species of Bidens (Asteraceae): Bidens pilosa L., new to the Turkish flora.** 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Bidens-pilosa-from-its-natural-habitats-in-Osmaniye-Figures-taken-by-M-Celik_fig1_330688364. Acesso em: 02 mar. 2020.

YIN, Kailin et al. TFDP3 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-17, 23 jan. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170573>.

YOUNG, R. K. et al. Establishment of epithelial cell line MDA-MB-157 from metastatic pleural effusion of human breast carcinoma. **In Vitro**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.239-245, jan. 1974. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02616069>.

YU, Dandan et al. Diagnostic Value of Concentration of Circulating Cell-Free DNA in Breast Cancer: a meta-analysis. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 95, p. 1-8, 1 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00095>.

YU, Jinling et al. Metastasis suppressor 1 acts as a tumor suppressor by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. **The International Journal Of Biological Markers**, [s.l.], v. -, n. -, p.1-8, 13 fev. 2020. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1724600820905114>.

ZHAO, Shen et al. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. **Annals Of Translational Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 499-499, abr. 2020. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2020.03.194>.

ZHAO, Yuwan et al. Berberine activates caspase-9/cytochrome c -mediated apoptosis to suppress triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 95, p. 18-24, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.045>.

ZHANG, Yu et al. Extracts and components of Ficus carica leaves suppress survival, cell cycle, and migration of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Oncotargets And Therapy**, [S.L.], v. 11, p. 4377-4386, jul. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ott.s171601>.

ZHOU, Xunian et al. Elaborating the Role of Natural Products on the Regulation of Autophagy and their Potentials in Breast Cancer Therapy. **Current Cancer Drug Targets**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.239-255, 09 mar. 2018. Bentham Science Publishers. <http://dx.doi.org/10.2174/1568009617666170330124819>.