

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DIANDRA ZIPINOTTI DOS SANTOS

**ATORVASTATINA AUMENTA A EFICÁCIA DA CISPLATINA EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO**

VITÓRIA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

DIANDRA ZIPINOTTI DOS SANTOS

**ATORVASTATINA AUMENTA A EFICÁCIA DA CISPLATINA EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientação: Professor(a) Dr(a).
Leticia Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA

2021

ATORVASTATINA AUMENTA A EFICÁCIA DA CISPLATINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO

Diandra Zipinotti dos Santos

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientação: Professor(a) Dr(a). Leticia Batista Azevedo Rangel

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Leticia Batista Azevedo Rangel
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Marco Cesar Cugundes
Guimaraes.

Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Lorenzo Lyrio Stringari
Universidade Federal do Espírito
Santo/NDI

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Leonardo Nimrichter
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S237a Santos, Diandra Zipinotti dos, 1990-
Atorvastatina aumenta a eficácia da cisplatina em células de câncer de mama através da modulação do metabolismo lipídico / Diandra Zipinotti dos Santos. - 2021.
159 f. : il.

Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer. 2. Metabolismo dos lipídios. 3. Colesterol. 4. Resistência à drogas. I. Rangel, Leticia Batista Azevedo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela saúde e bem-estar necessários para concluir mais este capítulo da minha vida.

À minha orientadora Dra. Letícia Rangel cuja orientação, apoio e incentivo foram inestimáveis ao longo de toda minha vida acadêmica. Obrigada por acreditar no meu trabalho.

À Isabella Guimarães que, desde a iniciação científica, me deu suporte nos estudos e experimentos. Você contribuiu de maneira decisiva para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento como estudante. Obrigada por, além de ser colega de trabalho, ser uma amiga com quem posso contar em qualquer momento e por me apoiar e suportar minhas tensões e reclamações nos últimos anos de estudo.

À minha família pelo apoio incondicional, pela força e por ser meu porto seguro nos momentos de tribulação. Obrigada por me ensinar os valores mais preciosos de um ser humano: a humildade e o amor. Sem vocês eu não estaria aqui.

Aos colegas de laboratório pelos momentos de convívio, risos, trocas e afetos.

Ao meu co-orientador Dr. Andrew Hoy por me aceitar de braços abertos no seu laboratório possibilitando parte do desenvolvimento do meu trabalho e por fornecer orientação e feedback ao longo deste projeto.

À Hakeem-Sanni pela cooperação, conhecimentos repassados e auxílios fundamentais nos experimentos durante o doutorado sanduíche.

Ao Thomas Grewal pelo imenso conhecimento repassado.

Ao professor Dr. Leonardo Nimrichter pelo conhecimento científico comigo compartilhado.

Aos meus amigos do LACEN/ES, que apesar de pouco tempo de convívio, me apoiaram, me incentivaram e me tranquilizaram no momento mais difícil da minha trajetória acadêmica até então.

Às Agências de Fomento CAPES, FAPES, Robinson Fellowship da Universidade de Sydney.

Ao Charles Perkins Center da Universidade de Sydney e toda equipe técnica pela estrutura concedida para trabalho durante o doutorado sanduíche.

À Universidade Federal do Espírito Santo, local da minha formação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A resistência adquirida ao tratamento é um grande problema no manejo do câncer de mama (CAM), principalmente do subtipo triplo-negativo (TNBC). Assim, se faz necessária a identificação dos mecanismos de sobrevivência adaptativos nas células tumorais, de modo a melhorar a eficácia terapêutica no CAM. Diferentemente das células normais, as células cancerosas apresentam alteração do metabolismo, como facilidade na incorporação de nutrientes, de modo a sustentar a tumorigênese e progressão tumoral. Em geral, essas alterações foram identificadas no metabolismo de glicose e de aminoácidos, sendo o metabolismo do colesterol e suas vias metabólicas ainda pouco exploradas no CAM. Deste modo, este estudo teve como objetivo investigar se o metabolismo do colesterol está relacionado à resistência à cisplatina (CDDP), e verificar se o uso da atorvastatina (ATV) modula a eficácia de CDDP e o fenótipo resistente desenvolvido pelas células tumorais. Por meio de técnicas bioquímicas e radiométricas, além de ensaio de MTT e Incucyte, verificamos que a CDDP modula o metabolismo do colesterol em modelos de CAM luminal A (MCF-7) e TNBC (MDA-MB-231), e que CDDP combinada com baixas concentrações de ATV reduziu a proliferação e a viabilidade celular em maior extensão do que CDDP em monoterapia, principalmente em células MDA-MB-231, com uma redução do IC₅₀ de CDDP em 166 vezes ($p < 0,0001$) em 72h de tratamento. Verificamos que MDA-MB-231 tem expressão aumentada do receptor de LDL (LDLR) e acil-CoA:colesterol aciltransferase-1 (ACAT-1), enquanto MCF-7 apresenta maior expressão de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMGCR), e que essa diferença pode estar relacionada ao padrão de resposta ao fármaco. O tratamento combinado de CDDP com ATV reduz a esterificação do colesterol em MDA-MB-231, concomitantemente com a redução da expressão de ACAT-1, LDLR e HMGCR. Verificamos que a regulação positiva de ACAT-1 ($p < 0,05$) parece ser um mecanismo potencial de resistência á CDDP nas células resistentes (MDACR), e que ATV sensibilizou a linhagem resistente à CDDP. Em conjunto, nossos dados sugerem que a associação de ATV com CDDP parece ser benéfica, especialmente para o TNBC. Adicionalmente, nossos dados suportam a hipótese de que a expressão elevada de ACAT-1 pode impulsionar a agressividade e resistência à quimioterapia em tumores de mama triplo-negativos, e ACAT-1 é um possível alvo para associação de ATV e CDDP, aumentando a citotoxicidade e quimiossensibilidade ao medicamento convencional.

ABSTRACT

Acquired treatment resistance is a major problem in breast cancer (BC) management, especially aggressive subtypes such as triple-negative-BC (TNBC). Understanding tumor biology and designing new treatments is critical to improving therapeutic efficacy and prognosis. In some cancers, alterations in lipid metabolism, including the accumulation of cholesterol and cholesteryl esters (CE), contribute to tumor progression and development of drug resistance. The present study aimed to identify the role of cholesterol metabolism in BC response to cisplatin (CDDP) treatment in the acute setting and in acquired resistance, and if atorvastatin (ATV) can modulate platinum sensitivity. *In vitro* studies in MCF-7 (Luminal A), MDA-MB-231 (TNBC) and in a developed CDDP-resistant MDA-MB-231 cells (MDACR) were performed using a variety of biochemical and radiometric techniques. Cell viability and cell proliferation were measured through MTT assay and Incucyte, respectively. We demonstrated that CDDP alters cholesterol metabolism in luminal A (MCF-7) and TNBC (MDA-MB-231) cell models and that CDDP in combination with low concentrations of ATV reduces cell proliferation and cell viability more than CDDP alone, especially in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells display elevated levels of CE, LDLR and ACAT1 levels compared to MCF-7 cells, whereas MCF-7 cells had greater HMGCR protein levels compared to MDA-MB-231 cells. The combination of CDDP and ATV dramatically altered cell cholesterol metabolism more in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells. These results suggest that the increased susceptibility of MDA-MB-231 cells to co-administration of CDDP and ATV compared to MCF-7 cells is related to an increased dependence on CE availability. ATV restored CDDP sensitivity in CDDP-resistant cells, MDACR, which exhibit upregulation of ACAT-1 compared to their parental cells MDA-MB-231. Overall, our data suggest that association of ATV with conventional antineoplastic drugs appears to be beneficial, especially when associated with CDDP for the MDA-MB-231 lineage. Moreover, our data from cell culture-based studies supports upregulation of cholesterol homeostasis as an adaptive response that contributes to aggressiveness and chemotherapy resistance. This adaptive behavior of breast cancer cells and targeting of cholesterol metabolism warrants further preclinical and clinical investigation as a novel strategy to overcome CDDP resistance.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1: INCIDÊNCIA DE CAM NO MUNDO. | 16 |
| FIGURA 2: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL..... | 17 |
| FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DO CAM DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR. | 23 |
| FIGURA 4: AS CÉLULAS TUMORAIS AUMENTAM A CAPTAÇÃO DOS LIPÍDIOS LIBERADOS PELOS ADIPÓCITOS E OS ARMAZENAM NA FORMA DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS..... | 33 |
| FIGURA 5: ESQUEMA RESUMIDO DA HOMEOSTASE DO COLESTEROL CELULAR. | 35 |
| FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO COLESTEROL NO CAM | 36 |
| FIGURA 7: ESTRUTURA 2D E 3D DA ATV..... | 42 |
| FIGURA 8: EFEITO DA CDDP NAS CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-231. | 51 |
| FIGURA 9: EFEITOS CITOTÓXICOS DA COMBINAÇÃO DE CDDP E ATV NAS CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-231. | 54 |
| FIGURA 10: EFEITO DA ATV E DA DISPONIBILIDADE DE COLESTEROL EM CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-231. | 58 |
| FIGURA 11: EFEITO DA CDDP NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO DE CE | 61 |
| FIGURA 12: CORRELAÇÃO DAS PRINCIPAIS ENZIMAS E RECEPTOR DO METABOLISMO DE CE COM A SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CAM | 62 |
| FIGURA 13: MODULAÇÃO DO METABOLISMO DE CE EM CÉLULAS DE CAM APÓS TERAPIA COMBINADA COM CDDP E ATV..... | 66 |
| FIGURA 14: AVALIAÇÃO DE APOPTOSE NA LINHAGEM MDA-MB-231 APÓS O TRATAMENTO COM CDDP E ATV | 66 |
| FIGURA 15: IMAGEM MICROSCÓPICA DAS LINHAGENS CELULARES DE TNBC, MDA-MB-231 E MDACR..... | 67 |
| FIGURA 16: ANÁLISE DA CITOTOXIDADE DE DIVERSOS FARMACOS NA LINHAGEM MDA-MB-231 E MDACR..... | 69 |
| FIGURA 17: EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE CDDP COM ATV NA LINHAGEM MDACR | 69 |
| FIGURA SUPLEMENTAR 1: ANÁLISE DO CONTEÚDO DE COLESTEROL NAS LINHAGENS DE CAM..... | 98 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACAT-1 - Acil-CoA:colesterol aciltransferase

ATV – Atorvastatina

BRCA1/2 – Oncogene do câncer de mama 1/2

CAM – Câncer de mama

CDDP – Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II))

CE – Éster de colesterol

CO – Colesterol

DMSO – Dimetilsulfóxido

ER – Receptor de estrogênio

FBS – Soro fetal bovino

FDA – *Food and Drug Administration*

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HER2 – Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

HMGCR – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% das células

IHC – Classificação imuno-histoquímica

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LDLR – Receptor da LDL

LPDS – Soro deficiente de lipoproteínas

nCEH – colesterol éster hidrolase neutra

OMS – Organização mundial da saúde

PI – Iodeto de propídio

PR – Receptor de progesterona

TNBC – Câncer de mama triplo-negativo

VCM – Viabilidade celular metabólica

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 CÂNCER DE MAMA (CAM)..... | 15 |
| 1.1.1 Classificação do CAM | 18 |
| 1.2 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O CAM | 24 |
| 1.2.1 Quimioterapia convencional | 25 |
| 1.2.2 Terapia hormonal | 27 |
| 1.2.3 Terapia alvo | 27 |
| 1.2.4 Imunoterapia | 28 |
| 1.3 O PAPEL DA OBESIDADE NO CAM..... | 30 |
| 1.3.1 Metabolismo lipídico e implicações no CAM | 32 |
| 1.4 ESTATINAS..... | 40 |
| 1.4.1 Efeitos das estatinas sobre o câncer | 42 |
| 2 OBJETIVOS | 44 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 44 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 44 |
| 3 MATERIAS E MÉTODOS | 44 |
| 3.1 LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR | 44 |
| 3.2 PREPARAÇÃO DE SORO DEFICIENTE DE LIPOPROTEÍNA (LPDS) E LDL | 45 |
| 3.3 FÁRMACOS E COMPOSTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS..... | 45 |
| 3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) E CÁLCULO ESTIMADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DAS CÉLULAS (IC ₅₀) PARA OS FÁRMACOS DE INTERESSE | 46 |
| 3.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR..... | 47 |
| 3.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE COLESTEROL E CE..... | 47 |
| 3.7 ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE COLESTEROL E CE..... | 48 |
| 3.8 IMUNOBLOTTING | 48 |
| 3.9 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR: MARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDEO (PI) | 49 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 49 |
| 4 RESULTADOS | 50 |
| 4.1 EFEITO DA CDDP NAS LINHAGENS DE CAM LUMINAL A E TNBC..... | 50 |
| 4.2 A ATV AUMENTA O EFEITO CITOTÓXICO DA CDDP NAS CÉLULAS DE CAM | 51 |

| | |
|---|------------|
| 4.3 EFEITO DA ATV E DA DISPONIBILIDADE DO COLESTEROL NAS LINHAGENS DE CAM..... | 55 |
| 4.4 EFEITO DA CDDP NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO DO CE NAS LINHAGENS DE CAM..... | 59 |
| 4.5 EFEITO DA TERAPIA COMBINADA DE CDDP COM ATV NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO DO CE NAS LINHAGENS DE CAM..... | 62 |
| 4.6 A ATV RESENSIBILIZA A LINHAGEM RESISTENTE MDACR À CDDP | 66 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 70 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 76 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 76 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 77 |
| ANEXO I | 98 |
| FIGURA SUPLEMENTAR..... | 98 |
| ANEXO II | 99 |
| 1 Comprovante de submissão do artigo I..... | 99 |
| Review Article <i>LIPID METABOLISM IS A PUTATIVE TARGET AGAINST BREAST CANCER</i> | 100 |
| Abstract | 101 |
| 2 Comprovante de submissão do artigo II..... | 122 |
| Research article..... | 123 |
| <i>ATORVASTATIN IMPROVES CISPLATIN SENSITIVITY THROUGH MODULATION OF CHOLESTERYL ESTER HOMEOSTASIS IN BREAST CANCER CELLS</i> | 123 |
| Abstract | 124 |
| Data Availability Statement..... | 136 |
| The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary material. | 136 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA (CAM)

Não obstante esforços e investimentos em métodos diagnósticos e terapêuticos na oncologia nos últimos anos, o CAM se manteve como o segundo câncer mais comum em todo o mundo e ocupou a quinta causa de morte por câncer em 2020, configurando um problema mundial de saúde pública (BRAY et al., 2018; HARBECK; GNANT, 2017). Globalmente, somente no ano de 2020, houve mais de 2 milhões de novos casos de CAM, sendo as maiores taxas de incidência na Austrália e Nova Zelândia (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018; SUNG et al., 2021) (Figura 1), e mais de 600 mil mortes pela doença. No Brasil, espera-se a ocorrência de 66.280 mil novos casos de CAM para cada ano do biênio 2021-2022 (Figura 2) e este constitui a primeira causa de morte por câncer na população feminina, representando 16,1% do total de óbitos (INCa, 2020), com exceção dos tumores de pele não melanoma. Nota-se que há uma variação das taxas de incidência de CAM entre os países, sendo a incidência mais elevada nos países desenvolvidos. Essas variações são consequência, pelo menos parcialmente, de uma maior prevalência dos fatores de risco conhecidos para a doença, como envelhecimento e obesidade, além da detecção precoce e atividades de triagem (SANCHO-GARNIER; COLONNA, 2019). Considerando o envelhecimento, na Austrália, por exemplo, a incidência de CAM é maior na faixa etária de 65 a 75 anos, enquanto no Brasil, acomete mais as mulheres na faixa de 45 a 55 anos. Adicionalmente, o rastreamento do CAM aumenta a possibilidade do mesmo ser detectado em estágios iniciais e de capturar casos que nunca teriam sido diagnosticados. Dessa forma, as taxas de incidência costumam ser mais altas em países que implementam programas de rastreamento do CAM, como no caso de países mais desenvolvidos cientificamente e economicamente. (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004).

A alta taxa de mortalidade está intimamente ligada à detecção tardia, quimiorresistência e ao aparecimento de metástases, conferindo maior agressividade aos tumores que passam a não ser mais responsivos às estratégias terapêuticas disponíveis clinicamente. Ainda, além da constatação epidemiológica, o CAM afeta negativamente a qualidade de vida de milhões de pacientes e suas famílias,

resultando frequentemente em transtornos psicológicos e emocionais pela perda da imagem corporal da mulher após cirurgias e tratamentos, gerando também grande impacto social (AL-AZRI et al., 2014; HINZEY et al., 2016). Esses dados evidenciam a complexidade do problema mundialmente e nos mostram que o CAM acomete a população feminina independente da condição socioeconômica do país. Nesse contexto, a jornada por entendimento e aplicação de novas estratégias terapêuticas no CAM, para o benefício dos pacientes oncológicos e da sociedade, é fundamental e ininterrupta.

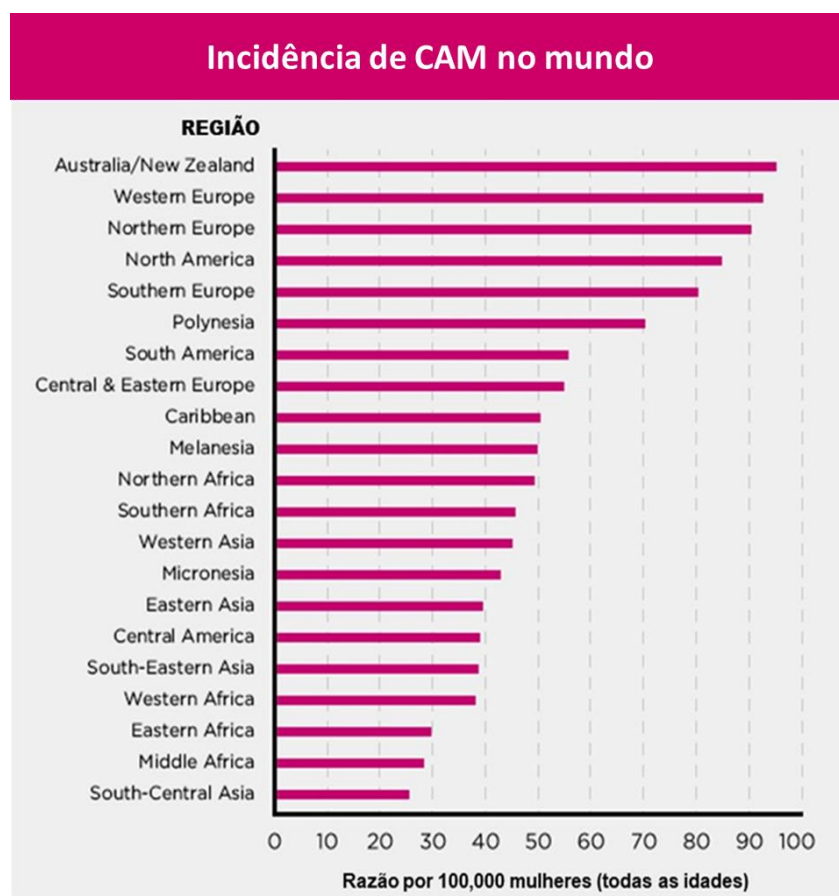


Figura 1: Incidência de CAM no mundo. Em geral, as taxas de CAM são mais altas em países desenvolvidos (como EUA, Inglaterra e Austrália) do que em países em desenvolvimento (como Camboja, Nepal e Ruanda). Fonte: Adaptado de SUNG et 2021.

| Localização Primária | Casos | % | | | Localização Primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|--------|----------|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata | 65.840 | 29,2% | Homens | Mulheres | Mama feminina | 66.280 | 29,7% |
| Cólon e reto | 20.520 | 9,1% | | | Cólon e reto | 20.470 | 9,2% |
| Traqueia, brônquio e pulmão | 17.760 | 7,9% | | | Colo do útero | 16.590 | 7,4% |
| Estômago | 13.360 | 5,9% | | | Traqueia, brônquio e pulmão | 12.440 | 5,6% |
| Cavidade oral | 11.180 | 5,0% | | | Glândula tireoide | 11.950 | 5,4% |
| Esôfago | 8.690 | 3,9% | | | Estômago | 7.870 | 3,5% |
| Bexiga | 7.590 | 3,4% | | | Ovário | 6.650 | 3,0% |
| Linfoma não Hodgkin | 6.580 | 2,9% | | | Corpo do útero | 6.540 | 2,9% |
| Laringe | 6.470 | 2,9% | | | Linfoma não Hodgkin | 5.450 | 2,4% |
| Leucemias | 5.920 | 2,6% | | | Sistema nervoso central | 5.220 | 2,3% |

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2: Incidência de câncer no Brasil. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCa, 2020.

Por definição biológica, o CAM compreende uma doença de causa multifatorial que culminam com mutações e alterações de protooncogenes e diminuição da expressão de genes supressores tumorais (DUIJF et al., 2019). Esses fatos resultam, em última análise, em alterações dos sinais normais de proliferação celular como falta de responsividade aos sinais de morte celular, perda da integridade do ciclo celular e aumento da viabilidade celular, culminando com multiplicação desordenada de células da mama tanto advindo do ducto, dos lóbulos ou do tecido intermediário (HARBECK; GNANT, 2017; RAKHA et al., 2012). Essa proliferação desordenada leva ao desenvolvimento do tumor, onde essas células passam a produzir metaloproteínas, fatores de crescimento principalmente angiogênicos e outros metabólitos essenciais para seu desenvolvimento, podendo ocorrer ou não a invasão de tecidos adjacentes e metástases.

Esses fatores que levam ao desenvolvimento do CAM são basicamente divididos em dois grupos, inevitáveis e modificáveis (WEIDERPASS; MEO; VAINIO, 2011). Dentre os fatores inevitáveis podemos citar a idade, histórico familiar e genético, histórico pessoal e características intrínsecas da paciente como características imunológicas (BUCHTA ROSEAN et al., 2019) e reprodutivas, a exemplo da menarca precoce, da menopausa tardia, da nuliparidade e da gestação tardia (CLAVEL-CHAPELON; GERBER, 2002). Apesar do caráter hereditário do CAM ser bem estabelecido, apenas uma fração minoritária dos CAM, aproximadamente 10% de todos os casos, é de origem hereditária, e destes, aproximadamente 5% decorrem principalmente de mutações germinativas hereditárias e somáticas em genes de suscetibilidade ao

câncer de mama 1 (BRCA1) e 2 (BRCA2) (LALLOO; EVANS, 2012). Pacientes que apresentam mutações em BRCA1 e BRCA2 têm probabilidade de 55-72% e 45-69% de desenvolver CAM, respectivamente. Ademais, o fenótipo tumoral tende a variar de acordo com o gene mutado. Pacientes com mutações em BRCA1 têm maior chance de desenvolver CAM triplo-negativo (TNBC), enquanto os que carregam mutações em BRCA2 tendem a desenvolver tumores luminais (DE TALHOUET et al., 2020). BRCA1 e BRCA2 são genes supressores tumorais, denominados *caretakers*, que desempenham importante função no controle de reparo do DNA, controle do ciclo celular e estabilidade cromossômica (TUNG; GARBER, 2018). Conseqüentemente, pacientes com mutações deletérias nesses genes apresentam maior sensibilidade aos fármacos que interferem com moléculas envolvidas nos processos de reparo do DNA (DE TALHOUET et al., 2020; ROBSON et al., 2017). Com relação aos fatores modificáveis, podemos relatar o peso corpóreo, a obesidade (FALLONE et al., 2018), o diabetes (JOHNSON et al., 2012; LARSSON; MANTZOROS; WOLK, 2007), o abuso de álcool (ZEINOMAR et al., 2019), tabagismo (REYNOLDS, 2013), a exposição à radiação ionizante (MIGLIORETTI et al., 2016) e terapia de reposição hormonal (VINOGRADOVA; COUPLAND; HIPPISEY-COX, 2020).

Existem vários tipos de CAM evoluindo de diferentes formas. Alguns tipos têm desenvolvimento rápido enquanto outros crescem mais lentamente. Esses comportamentos distintos se devem às características próprias de cada tumor e sua localização, e são extremamente importantes na determinação da gravidade da doença, do tipo de tratamento e das chances de remissão da doença. Deste modo, por se tratar de doença complexa e heterogênea com relação às diversas características morfológicas, à evolução clínica variável e às diferentes respostas às opções terapêuticas, o CAM é classificado de acordo com parâmetros padrão que incluem tipo, grau, estágio e expressão gênica, os quais auxiliam na definição do melhor protocolo de tratamento para a paciente.

1.1.1 Classificação do CAM

1.1.1.1 Classificação histológica

Esta classificação se refere à localização do tumor, categorizando o CAM basicamente em invasivo, não invasivo, recorrente e metastático (IORFIDA et al., 2012; RAKHA et al., 2012). Subsequentemente, no momento do diagnóstico, o CAM é ainda classificado de acordo com seu estadiamento, determinado pelo tamanho do tumor (T), disseminação nodal (N) e metástases à distância (M), o que determina fortemente seu prognóstico. Basicamente, o estadiamento combina esses fatores e estratifica a doença em 5 estágios (0, I, II, III e IV) (INCa, 2020). A classificação histopatológica, apesar de mais usada por ser barata e poder ser facilmente aplicável na rotina, tem utilidade clínica limitada, devido à precisão prognóstica e ao poder preditivo de resposta à quimioterapia/radioterapia insuficientes. Dessa forma, técnicas imuno-histoquímicas têm sido empregadas com o intuito de aprimorar o diagnóstico do CAM, possibilitando o desenvolvimento racional de estratégias terapêuticas para as pacientes. Com isso, os grupos de estadiamento de prognóstico clínico são aplicáveis a todas as pacientes CAM primário antes que qualquer tratamento tenha sido implementado, e requerem uma avaliação clínica e de imagem, bem como uma biópsia com grau e resultados disponíveis da classificação imuno-histoquímica (IHC) (ACS, 2020).

1.1.1.2 Classificação IHC

A classificação IHC define o padrão de expressão de receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2), bem como a avaliação do índice de proliferação celular por meio da investigação da expressão do antígeno nuclear Ki67 (INWALD et al., 2013). Esse antígeno é amplamente usado na prática clínica na determinação da proliferação visto que está presente nas células em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), exceto na fase G0 (YUAN et al., 2016). Destaca-se que o grau de expressão de Ki67 se correlaciona positivamente com pior prognóstico e menor tempo livre de doença (NISHIMURA et al., 2010). Dessa forma, o CAM pode ser estratificado em quatro subtipos: luminal A, luminal B, HER2-*enriched* e TNBC (Quadro 1).

O subtipo luminal A é caracterizado pela presença de receptores hormonais ER e PR, ausência de HER2 e possui baixos níveis de proteína Ki67 em suas células. Esses tumores são de desenvolvimento mais lento e de baixo grau, geralmente grau I.

Ademais, apresentam baixa probabilidade de recorrência, sendo essa de aproximadamente 8% em uma média de 10 anos (IGNATIADIS; SOTIRIOU, 2013). Dessa forma, embora seja o subtipo de maior incidência dentre os demais, é também o de prognóstico mais favorável (JOHANSSON et al., 2019).

Com relação ao subtipo luminal B, esse pode ser sub categorizado em luminal B HER2 negativo (ER positivo, HER2 negativo, Ki67 alto e PR baixo) e luminal B HER2 positivo (ER positivo, amplificação ou superexpressão de HER2, Ki67 alto e qualquer status de PR). A taxa de expressão do PR nos tumores luminais B é de 74%, inferior à dos tumores luminais A (94%). Em relação à expressão de HER2, aproximadamente 30% dos tumores luminais B são HER2 positivos. Esses tumores geralmente se proliferam ligeiramente mais rápido e apresentam pior prognóstico quando comparados aos do subtipo luminal A (SAYED et al., 2021). Ainda não é bem definido se existe diferença significativa de prognóstico entre os luminais B HER2 positivos e luminais B HER2 negativos, visto que eles também podem apresentar ou não expressão alterada de outras proteínas como MKI67, CCNB1 e MYBL2, que estão relacionadas a piores prognósticos e desenvolvimento de resistência à terapia (CHEANG et al., 2009). Ademais, outros fatores relacionados ao paciente podem interferir no desfecho clínico e prognóstico dos subtipos moleculares do CAM. Um estudo relatou que a alta paridade associa-se ao prognóstico ruim somente em pacientes com CAM inicial do tipo luminal B HER2 negativo (JÄÄSKELÄINEN et al., 2020). Assim, conclui-se que este marcador clínico sozinho não é sensível o suficiente para indicar o desfecho clínico do paciente e avaliar o prognóstico dentro do subgrupo luminal B. Entretanto, vale lembrar que a positividade para HER2 nesses tumores amplia o leque de opções terapêuticas quando comparada ao dos tumores luminais B HER2 negativos que não se beneficiam da terapia alvo específica para a proteína; terapia esta que pode ser vantajosa para o paciente, e possivelmente corroborar com uma melhora no desfecho clínico.

Os tumores cujas células expressam receptores hormonais são a maioria dos diagnósticos de CAM, correspondendo a aproximadamente 65% dos casos. De forma geral, são responsivos à terapia e, desta forma, configuram tumores de bom prognóstico se comparados aos outros subtipos justamente porque se beneficiam ambas as modalidades de tratamento, quimioterapia e hormonioterapia (VIDAL; PARÉ; PRAT, 2016).

A amplificação de gene HER2 ou a superexpressão da proteína do tipo quinase HER2 associada à ausência ou baixa expressão dos receptores hormonais pelas células de CAM, caracteriza o terceiro subtipo IHC, *HER2-enriched* (INIC et al., 2014; SCHETTINI et al., 2020). Esse grupo é biologicamente heterogêneo com relação a marcação IHC, visto que entre 60 a 80% destes tumores são HER2+/receptores hormonais negativos, e aproximadamente 20-40% são HER2+/receptores hormonais positivos (BRASÓ-MARISTANY et al., 2020; PRAT et al., 2020; SCHETTINI et al., 2020). Apesar desta discrepância, é sabido que, aproximadamente 20% dos carcinomas mamários invasivos, apresentam essa alteração em HER2, tendo variações descritas na literatura de 15 a 30% (BORGES et al., 2012; PRAT et al., 2020). Esta alteração em HER2, confere ao tumor um comportamento biológico e clínico mais agressivo em relação aos tumores luminais. Entretanto, são frequentemente tratados com sucesso com terapias alvo-específicas direcionadas para a proteína HER2 (SCHETTINI et al., 2020).

Por fim, os TNBC são denominados dessa forma visto que não apresentam expressão de nenhum dos três receptores ER, PR e HER2. Embora os princípios básicos de diagnóstico e tratamento do TNBC sejam semelhantes aos do CAM em geral, esse grupo é altamente heterogêneo e peculiar com relação à apresentação clínica, histológica, características moleculares e resposta à terapia. Com um percentual de diagnóstico de aproximadamente 15% dos CAMs, são menos frequentes que os luminais, entretanto, são tumores mais agressivos, com maiores tendência ao desenvolvimento de metástase e de pior prognóstico (CAREY, L. A. et al., 2007; OUYANG et al., 2014; TRIVERS et al., 2009). Estudos mostram que pacientes que apresentaram diagnóstico de TNBC são geralmente mais jovens, têm grau mais avançado e maior volume tumoral em relação às pacientes diagnosticadas com os demais subtipos (COLLETT, 2005; DENT et al., 2007). Adicionalmente, estão associados a sobrevida inferior comparada àquela de mulheres portadoras de outros subtipos de CAM. Menos de 30% das mulheres com TNBC metastático sobrevivem cinco anos e quase todas morrem em decorrência da doença (DENT et al., 2007). Outrossim, diferentemente dos outros subtipos, nenhum tratamento direcionado está aprovado e disponível para o enfrentamento do TNBC, e a quimioterapia convencional continua a ser sua única estratégia terapêutica.

Quadro 1: Subtipos de CAM definidos pelo método IHC. Para marcação Ki67, um resultado inferior a 10% é considerado baixo, 10-20% limítrofe e alto se for superior a 20%. Fonte: Elaborado pelo autor.

| Subtipos | Luminal A | Luminal B | | HER2-enriched | TN |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------|
| | | HER2- | HER2+ | | |
| Marcadores | ER+, PR+, HER2-, Ki67 baixo | ER+, PR+, HER2-, Ki67 alto | ER+, PR-/+, HER2+, Ki67 alto | ER-, PR-, HER2+, Ki67 alto | ER-, PR-, HER2-, Ki67 alto |
| Porcentagem de diagnóstico | 50-60 % | 15-20 % | | 10-15% | 15-20% |
| Prognóstico | Bom | Intermediário | | Ruim | Ruim |
| Estratégia terapêutica | Quimioterapia; Terapia hormonal | Quimioterapia; Terapia hormonal | Quimioterapia; Terapia hormonal; Terapia alvo | Quimioterapia; Terapia alvo | Quimioterapia |

Com o avanço tecnológico, passou-se a ter evidências diretas da heterogeneidade dos CAM, levando a mudanças nos paradigmas da sua biologia. As classificações tradicionais de tumores mamários com base em características patológicas e avaliação IHC apesar de aplicação clínica e validade, podem não capturar os diversos cursos clínicos de tumores de mama individuais. Dessa forma, implementou-se considerar alterações genéticas subjacentes como estratégias complementares de tratamento e estratificações de pacientes com CAM.

1.1.1.3 Classificação molecular

Como mencionado anteriormente, o CAM apresenta alta diversidade e complexidade biológica. Dessa forma, a utilização de técnicas como *microarray*, e mais recentemente, sequenciamento de nova geração com estudos de abordagem do genoma completo, possibilitaram classificar o CAM em 6 subtipos intrínsecos, a saber: luminal A, luminal B, *HER2-enriched*, *Claudin-low*, *basal-like* e normal-símile (Figura 3) (MALHOTRA et al., 2010; PRAT et al., 2010). Vale ressaltar que o perfil de distribuição e a incidência de casos varia de acordo com etnia da população avaliada

(ACHEAMPONG et al., 2020; AL-THOUBAITY, 2020; PANDIT et al., 2020; SERRANO-GOMEZ et al., 2016). Após essas descobertas, o perfil molecular do TNBC também tem sido intensamente estudado de forma a explicar a heterogeneidade fenotípica tumoral do CAM por meio das grandes variações na expressão gênica. Assim, esses estudos classificam o TNBC em outros seis subtipos moleculares, nomeadamente tipo basal 1, tipo basal 2, imunomodulador, mesenquimal, mesenquimal de células tronco e subtipo luminal androgênio (BARECHE et al., 2018; HUBALEK; CZECH; MÜLLER, 2017; LEHMANN et al., 2016). É importante ressaltar que algumas dessas classificações se sobrepõem; entretanto, não são classificações permutáveis (DOGRA; MEHTA; DOVAL, 2020). Um exemplo é o subgrupo de cânceres basais que correspondem a aproximadamente 77% TNBC por IHC (ALLURI; NEWMAN, 2014; GONG et al., 2021).

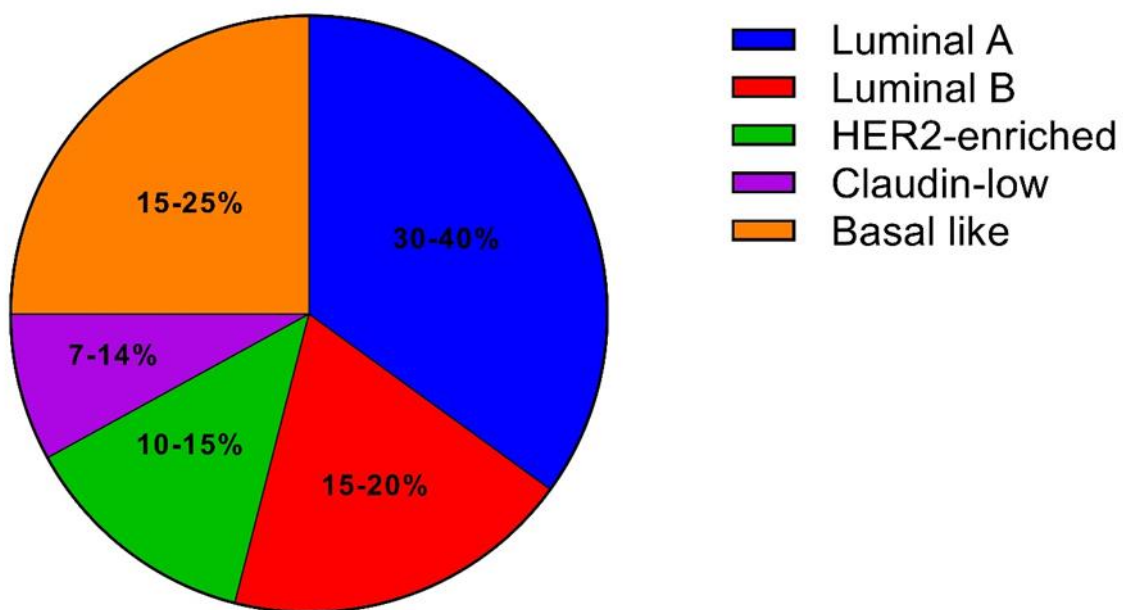


Figura 3: Distribuição do CAM de acordo com a classificação molecular. Os números demonstram aproximadamente a porcentagem média de ocorrência de cada subtipo classificado de acordo com o perfil molecular. Fonte: elaborado pelo autor.

Além de diferentes perfis de expressão gênica, esses subtipos moleculares também apresentam desfechos clínicos e respostas à terapia distintos. Os subtipos tipo basal e *HER2-enriched* são mais agressivos, tendo proporção maior de mutações em TP53

e probabilidade consideravelmente maior de ser grau III do que os cânceres luminais A. Em contrapartida, a mesma mutação está presente em menos de 30% dos tumores luminais. Faltam ainda definições e metodologias padronizadas para a identificação dos subtipos moleculares e ensaios clínicos prospectivos para validar a contribuição desses subtipos intrínsecos no perfil de sobrevida e demais características do CAM. Deste modo, até o presente momento os perfis de expressão gênica não substituem os parâmetros clássicos, mas sim complementam os mesmos (TANG; SKINNER; HICKS, 2009). Como mencionado anteriormente, essas classificações são fundamentais para entender o comportamento biológico dos tumores e ajudar a definir as estratégias de tratamento do CAM.

1.2 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O CAM

Diversos fatores influenciam a escolha do tratamento no CAM, tais como: tamanho do tumor e presença de metástase; condição dos linfonodos axilares, o subtipo tumoral e se é câncer recorrente ou não. Dessa forma, o conhecimento desses fatores é de fundamental importância para um diagnóstico completo e preciso, direcionando a escolha da estratégia terapêutica mais efetiva (PEART, 2015). De forma geral, a modalidade terapêutica no CAM pode ser dividida em terapia local (cirurgia e radioterapia) e terapia sistêmica (medicamentosa). Vale ressaltar que as modalidades terapêuticas geralmente são combinadas com intuito curativo. Entretanto, quando o carcinoma se encontra em estágios mais avançados e disseminados, podem ser empregadas isoladamente com o intuito paliativo, a fim de melhorar a qualidade de vida da paciente.

O tratamento cirúrgico é a modalidade mais antiga de tratamento e, basicamente, existem dois tipos principais de cirurgia para remover tumor mamário: cirurgia de conservação da mama (também chamada de mastectomia parcial) e a mastectomia total (em que toda a mama é removida, incluindo todo o tecido mamário e outros tecidos próximos) (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010).

A radioterapia, tratamento com raios (ou partículas) de alta energia, é basicamente realizada em duas formas: radioterapia externa e a braquiterapia, cuja radiação provém de materiais radioativos que são colocados no interior da paciente, no local

acometido. Tanto a radioterapia quanto o tratamento sistêmico podem ser empregados tanto como medida pré-operatória (neoadjuvante), para diminuir o tamanho do tumor e permitir cirurgia conservadora, ou como complemento ao tratamento cirúrgico (adjuvante) a fim de eliminar as células cancerosas residuais (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010).

Em relação ao tratamento sistêmico, atualmente, as decisões sobre a conduta de pacientes com CAM são baseadas principalmente em critérios histopatológicos, incluindo tamanho do tumor, status nodal, classificação, ER, PR e status de HER2, além de características da paciente, como idade por exemplo. Esses parâmetros têm sido recomendados em ambas as diretrizes, nacionais e internacionais (DITSCH et al., 2019; SCHWENTNER et al., 2013). Esse tipo de tratamento pode ser subdividido em quatro modalidades: quimioterapia, hormônio terapia, terapia alvo e imunoterapia (ACS, 2020).

1.2.1 Quimioterapia convencional

De acordo com as diretrizes atuais, tanto para o CAM em geral quanto para o subtipo TNBC, o manejo clínico das pacientes com quimioterapia envolve basicamente o uso de fármacos citotóxicos como taxanos, antraciclinas, ciclofosfamida e fluorouracil (ECKSTEIN, 2011; YIN et al., 2020). O taxano mais utilizado no CAM é o paclitaxel. Paclitaxel é um terpenóide estabilizador de microtúbulos, que impede a progressão do ciclo celular, e conseqüentemente, o crescimento tumoral (WEAVER, 2014). Dentre as antraciclinas, as mais utilizadas são a doxorrubicina e epirrubicina, cujo efeito antitumoral se dá pela inibição da enzima topoisomerase II, com conseqüente indução da quebra da fita de DNA e apoptose (RAJ; FRANCO; LIPSHULTZ, 2014). A ciclofosfamida, pró-fármaco precursor da mostarda de fosforamida, exerce seu efeito por meio da alquilação intra-fita ou inter-fitas de DNA adjacentes na posição guanina N-7 (KORKMAZ; TOPAL; OTER, 2007). Por sua vez, o fluorouracil é um fármaco antimetabólico, cujo efeito antineoplásico se dá por meio da incorporação de seus metabólitos no RNA e DNA, e pela inibição da timidilato sintase (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Apesar de ampla utilização, esses quimioterápicos apresentam grave perfil toxicológico para as pacientes. Os taxanos e as antraciclinas podem causar neurotoxicidade severa e cardiotoxicidade irreversível do tipo I,

respectivamente (RAJ; FRANCO; LIPSHULTZ, 2014; SANTOS GUIMARES et al., 2013). Estudos já mostraram que o paclitaxel induz severa neutropenia (MARUPUDI et al., 2007). Mielossupressão, hiponatremia e hemorragia crônica são algumas das manifestações adversas da ciclofosfamida. Plaquetopenia é um dos severos efeitos do fluorouracil. Todos esses efeitos supracitados podem levar à descontinuidade do tratamento, gerando um impacto negativo para a paciente.

Recentemente, derivados de platina, como a cisplatina (CDDP), têm emergido como opção no enfrentamento clínico do TNBC. O mecanismo de ação dos derivados de platina consiste na ativação intracelular e posterior ligação covalente com o sulco maior no DNA formando aductos por meio de ligações intra e intercadeias, induzindo alterações estruturais no DNA (ALDOSSARY, 2019). Dessa forma, ocorre a ativação de diversas vias de transdução de sinal como vias de reparo de DNA, ciclo celular e apoptose (GARUTTI et al., 2019). O interesse inicial da CDDP no esquema terapêutico do TNBC, se deu pela hipótese de maior sensibilidade dos TNBC a esses agentes, principalmente os tumores com mutação em BRCA1 (CAREY, Lisa A et al., 2012). Ressalta-se que 70% dos tumores de mama contendo mutações germinativas em BRCA1 são categorizados como TNBC. Numerosos ensaios clínicos demonstraram que a CDDP, tanto em monoterapia quanto em combinação com outros fármacos anticâncer, é altamente eficaz na indução de apoptose de células tumorais de TNBC e na redução do volume tumoral. Apesar de uma boa opção terapêutica, a CDDP também é responsável por severos efeitos adversos nas pacientes como nefro e ototoxicidade, além da possibilidade de causar depressão da medula óssea e neurotoxicidade dependente da dose (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018).

Adicionalmente, já é descrito na literatura que mutações secundárias em BRCA1/2 podem resultar em desenvolvimento de resistência aos derivados de platina (MYLAVARAPU; DAS; ROY, 2018). De fato, apesar das pacientes com TNBC responderem bem à quimioterapia inicial com CDDP e demais medicamentos, a maioria desenvolve quimiorresistência ou apresenta recidiva da doença (WAHBA; EL-HADAAD, 2015). Ademais, a quimioterapia não é realizada empregando somente um fármaco, mas vários esquemas diferentes de combinações em ciclos repetidos e de frequência variável. Como consequência, os efeitos adversos tendem a ser intensificados. Além disto, a alta toxicidade altera significativamente a eficácia do tratamento, pois exigem doses mais baixas do fármaco ou prolongam os intervalos

entre ciclos de quimioterapia, o que pode proporcionar a progressão do tumor (LAKE; HUDIS, 2004).

1.2.2 Terapia hormonal

A hormonioterapia, também conhecida como terapia endócrina, foi a primeira terapia direcionada aprovada para o CAM e constitui tratamento eficaz para a maioria dos tumores que apresentam expressão de ER e PR (TREMONT; LU; COLE, 2017). Estrogênio e progesterona são os principais reguladores do crescimento e diferenciação do tecido mamário, e exercem seus efeitos celulares pela ligação e ativação de seus receptores nucleares específicos, os ER e PR (TRABERT et al., 2020). Logo, a hormonioterapia impede esses hormônios de se ligarem aos seus receptores. Os principais fármacos representantes dessa classe são tamoxifeno (TMX) e inibidores de aromatase que incluem anastrozol, exemestano e letrozol (ARIMIDEX, TAMOXIFEN et al., 2008; TREMONT; LU; COLE, 2017). O TMX é um modulador seletivo do ER alfa e beta, que inibe o crescimento das células mamárias por antagonismo competitivo do ER com o estrogênio. Já os inibidores de aromatase, exercem seu efeito pelo bloqueio da conversão de andrógenos adrenais em estrógenos (ABDEL-HAFIZ, 2017). De uma forma geral, a utilização desses fármacos tem demonstrado melhora da sobrevida das pacientes, diminuindo o risco de recorrência e mortalidade. Alguns estudos ainda apontam que as pacientes com CAM pós menopausadas se beneficiam mais com o tratamento com inibidores de aromatase do que com tamoxifeno, apresentando maior sobrevida global (ARIMIDEX, TAMOXIFEN et al., 2008; PALUMBO et al., 2014). Entretanto, apesar dos benefícios, o uso dos inibidores apresenta um perfil alto de toxicidade, acarretando perda de massa óssea, artralgia, fraturas e ainda hipercolesterolemia (ARIMIDEX, TAMOXIFEN et al., 2008). Ademais, sua eficácia em longo prazo é limitada pela recidiva da doença e pelo desenvolvimento de resistência (OSBORNE; SCHIFF, 2011).

1.2.3 Terapia alvo

A terapia alvo, por sua vez, é a estratégia medicamentos direcionados para as células tumorais que superexpressam determinadas proteínas celulares. Para as células tumorais que têm expressão aumentada da proteína do tipo quinase HER2, o tratamento envolve o uso de anticorpo monoclonais, anticorpo-fármaco conjugado e inibidores de quinase. Os anticorpos monoclonais mais utilizados são trastuzumabe e pertuzumabe.(VRBIC et al 2013, SHARP; HARPER-WYNNE, 2014). Como a quimioterapia citotóxica convencional não é seletiva, pode-se conjugar o quimioterápico com o anticorpo anti-HER2, fazendo com que esses fármacos atuem diretamente sobre as células de interesse, aumentando assim a veiculação intracelular do composto. Os anticorpos-fármaco conjugados mais empregados são trastuzumab-entansina (T-DM1) e trastuzumabe-deruxtecan (DS-8201). Em relação aos inibidores de quinase, destacam-se o lapatinibe, neratinibe e tucatinibe. É válido ressaltar que os inibidores de quinase são bastante utilizados em pacientes com CAM com metástases cerebrais, visto que esses medicamentos apresentam a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

Outra proteína de importante destaque como alvo de terapias do CAM é poli(ADP-ribose)polimerase (PARP), envolvida na regulação de processos celulares como proliferação, mecanismo de reparo ao DNA, morte celular e processos imunomoduladores (HEGEDŰS; VIRÁG, 2014). Os genes BRCA1/2 também são vitais para manter a integridade genômica, e quando ocorre uma mutação desses genes com conseqüente comprometimento de sua função, PARP passa a servir como um sistema “backup”, e principal atuante nesses mecanismos de reparo genômico. Recentemente, inibidores de PARP como olaparibe têm emergido como opção terapêutica satisfatória principalmente em pacientes com tumores triplo-negativos com mutação em BRCA (PAPADIMITRIOU; MOUNTZIOS; PAPADIMITRIOU, 2018).

1.2.4 Imunoterapia

A mais nova e emergente modalidade terapêutica contra o CAM é a imunoterapia, cujo racional é restaurar o sistema imunológico da paciente, de forma que as células do sistema imune reconheçam de forma mais eficaz e eliminem as células cancerosas durante os checkpoints imunológicos (SUGIE, 2018). O ligante de morte programada 1 (PD-L1) e a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA4), são alvos

imunológicos extremamente visados nesse contexto. Algumas células cancerosas apresentam alta expressão do ligante PDL-1, que quando se liga ao receptor de morte programada (PD-1) presente nas células T, impede que as células T as destruam, e assim, as células cancerosas evadem o sistema imune. As células T também podem ser inativadas quando CTLA-4, presente em sua superfície, se liga a CD80/86 presente nas células apresentadoras de antígenos, e assim ficam impedidas de atacar as células tumorais (DARVIN ET AL 2018). Alguns exemplos de medicamentos imunoterápicos atualmente comercializados são ipilimumabe (anticorpo monoclonal anti-CTLA-4), nivolumabe (anti PD-L1), atezolizumabe (anti PD-L1), avelumabe (anti PD-L1). Em 26 de julho deste ano, o pembrolizumabe (anti PD-L1) foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como tratamento neoadjuvante para o TNBC em estágio inicial de alto risco em combinação com quimioterapia convencional (fda.gov, acesso em 13 de out. 2021). Mais recente, ocorreu a aprovação do dostarlimabe (anti-PD-1) para o tratamento de paciente portadores de tumores sólidos recidivados ou avançados com deficiência de *mismatch repair*, após progressão a terapia-padrão. Apesar da imunoterapia ser uma modalidade de tratamento relativamente recente e mais avançada, apenas 20-40% dos pacientes respondem ao tratamento (DARVIN et al., 2018). Ainda, como esses medicamentos podem ativar uma ampla gama de células do sistema imunológico, existe a possibilidade de desencadear reações autoimunes graves.

Vale ressaltar que uma nova abordagem terapêutica denominada *Car T-Cells* vem sendo estudada para o tratamento do CAM (ZHAO, Zhenhui et al., 2020). Esta é uma combinação de terapia gênica com terapia celular e imunoterapia, onde os linfócitos T da paciente são geneticamente modificados em laboratório a fim de expressarem estruturas chamadas de receptores de antígenos quiméricos (CARs), que irão se ligar a antígenos específicos nas células tumorais (WANG, Jinghua; ZHOU, 2017). Hoje, o CART T-cells é somente aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células B refratária ou recidivada, e não para tumores sólidos (TARIQ et al., 2018). Apesar de ser uma terapia promissora, apresenta controvérsias como altíssimo custo (podendo chegar a 475 mil dólares) e possibilidade de efeitos adversos gravíssimos como síndrome de liberação de citocinas (CRS), podendo levar à disfunção de múltiplos órgãos (KHOURY et al., 2018; SARKAR et al., 2019; TARIQ et al., 2018).

Nesse contexto, apesar de todas essas ferramentas terapêuticas disponíveis, o tratamento do TNBC ainda configura um dos maiores desafios enfrentados na clínica oncológica do CAM (PRAT et al., 2015). A ausência de diretrizes de tratamento específicas para este subtipo ainda faz com que a terapia preconizada seja a quimioterapia citotóxica convencional, sendo associado a altas taxas de remissão e quimiorresistência (DEES et al., 2020).

Não é totalmente compreendido por quais vias e as características específicas deste grupo de CAM que o tornam mais agressivos, recidivantes e refratários à terapia. Entretanto, sabe-se que a via metabólica das células tumorais de TNBC é altamente alterada, distinguindo-se dos outros subtipos de CAM (BARECHE et al., 2018; GONG et al., 2021). Cumpre ainda salientar que inúmeros estudos mostraram que os tratamentos oncológicos convencionais afetam níveis séricos de colesterol e suas frações em pacientes com CAM, o que poderia piorar o prognóstico da doença (LU et al., 2011; TIAN et al., 2019; XU, Liuyue et al., 2020). Adicionalmente, o tratamento a longo prazo com CDDP pode induzir síndrome metabólica, que compreende resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia e obesidade abdominal (HAUGNES et al., 2007; TIAN et al., 2019; WESTERINK et al., 2016). Por conseguinte, uma melhor compreensão do perfil metabólico do TNBC tem a potencialidade de proporcionar direcionamento e desenvolvimento de agentes terapêuticos contra esse subtipo, resultando em melhoria do prognóstico desses pacientes.

1.3 O PAPEL DA OBESIDADE NO CAM

O interesse pelo metabolismo lipídico tumoral se deu quando estudos retrospectivos começaram a correlacionar a obesidade com o desenvolvimento de CAM. Nesse contexto, a obesidade, definida pelo aumento da massa adiposa decorrente do desequilíbrio energético de caráter multifatorial (OMS, 2021), pode ser considerada um fator de risco no desenvolvimento de diversos cânceres e, inclusive, do CAM (LIGIBEL, 2011). Vários estudos em animais e humanos demonstraram a influência da obesidade sobre o fenótipo do CAM e papel dos lipídios na doença.

A associação entre o sobrepeso e o CAM foi relatado pela primeira vez em 1976, quando pacientes obesas com CAM apresentaram tumores consideravelmente

maiores e mais invasivos, bem como sobrevida 25.3% menor em relação ao grupo controle (ABE et al., 1976). Desde então, buscou-se compreender melhor a associação entre o perfil lipídico de pacientes e o CAM. Estudo retrospectivo, conduzido 5683 pacientes com CAM, sob tratamento em triagem clínica, mostrou claramente a correlação da obesidade e pior desfecho clínico das pacientes. (PAJARES et al., 2013). As pacientes com obesidade caracterizada apresentaram maior taxa de recorrência e mortalidade quando comparadas às não obesas. Outro trabalho retrospectivo realizado com 4077 mulheres com CAM ER negativo, em tratamento com diversos quimioterápicos, também reforçou a associação do CAM com a obesidade (DIGNAM, 2003). Neste estudo, a mortalidade das pacientes obesas foi superior à das não obesas. Para mais, alguns estudos sugerem que a obesidade configura fator de risco para o desenvolvimento de TNBC (BURKBAUER et al., 2020). É importante frisar também que a obesidade demonstrou ter um impacto na responsividade à quimioterapia. Estudo sugeriu que o docetaxel, fármaco lipofílico, poderia ser retido pelo tecido adiposo antes de atingir o tumor, resultando em menor sobrevida livre da doença em pacientes obesas quando comparadas com às não obesas (DESMEDT et al., 2020). Ainda, já foi demonstrado que pacientes obesos, sob mesmo tratamento que pacientes não obesos, apresentam pior desfecho clínico (CHEN et al., 2012).

Além da massa adiposa, estudos relataram a relação entre perfis lipídicos; colesterol total (TC), triglicerídeos (TG), colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) e colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e o CAM. Já foi relatado que o TC é significativamente maior entre pacientes com CAM comparados com o grupo controle (RAY; HUSAIN, 2001).

Em população feminina de 464 mulheres com CAM invasivo, dentre os quais 49,1% carregavam subtipo luminal A, 21,3% ao subtipo luminal B, 9,3% *HER2-enriched* e 20,3% ao subtipo TNBC, foi investigada a relação entre perfil lipídico e parâmetros como sobrevida, mortalidade e recorrência do CAM (LOFTERØD et al., 2018). Dentre o subtipo TNBC, pacientes com maiores índices de TG tiveram a taxa de mortalidade três vezes maior e redução de 19% na sobrevida global quando comparadas àquelas com baixa taxa de TG. Ainda, essas pacientes apresentaram cinco vezes mais riscos de recidiva do CAM. Ademais, mostrou-se que razão HDL-colesterol/TC alta sugere prognóstico melhor para pacientes com CAM e que os TG elevados estão associados

ao prognóstico ruim, principalmente dentro do subtipo TNBC (LOFTERØD et al., 2018).

Com relação à influência do LDL nas células do CAM, a literatura se posiciona de forma divergente. Quatro estudos em épocas distintas mostraram não existir correlação entre LDL e risco de CAM (GAARD; TRETLI; URDAL, 1994; MELVIN et al., 2012; NI; LIU; GAO, 2015) HOYER; ENGHOLM, 1992). Entretanto, Nowak e colaboradores demonstraram que altos níveis de LDL estão, sim, associados ao aumento do risco de desenvolvimento de CAM (NOWAK; ÄRNLÖV, 2018). Ainda, outro estudo mostrou que LDL está positivamente correlacionado com risco aumentado de CAM e com o tamanho do tumor (RODRIGUES DOS SANTOS et al., 2014). Essa divergência na literatura sobre o LDL afetar ou não a o desenvolvimento de tumor mamário pode ser devido às diferenças nos efeitos do colesterol nos subtipos de CAM, embora essa possibilidade clame por mais estudos. Devido ao exposto, o estudo das alterações de vias metabólicas, principalmente do colesterol, nos diferentes subtipos de CAM é importante para abordagens terapêuticas promissoras.

1.3.1 Metabolismo lipídico e implicações no CAM

Atualmente, a reprogramação metabólica é definitivamente um marco importante das células cancerosas, estando intimamente ligada à rápida proliferação e migração, bem como à influência do microambiente tumoral, facilitando metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A primeira alteração metabólica estudada no CAM foi com relação ao metabolismo glicídico, denominado “Efeito Warburg”, por meio do qual as células cancerosas aumentam sua captação de glicose para a produção de ATP pela via glicólica anaeróbica culminando com a produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio (glicose aeróbica) (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; WARBURG, 1956). Esta observação feita há 65 anos atrás, já era indício de que as células cancerosas apresentam plasticidade metabólica, se adaptando à disponibilidade de oxigênio e nutrientes no microambiente tumoral. Entretanto, com o avanço científico outras vias metabólicas foram estudadas e se observou que esses tumores apresentam também alteração do metabolismo de aminoácidos (NEWSHOLME; CRABTREE; ARDAWI, 1985; SIVANAND; VANDER HEIDEN, 2020)

e lipídios (SWINNEN; BRUSSELMANS; VERHOEVEN, 2006), e que estas alterações podem estar correlacionadas com a agressividade tumoral (Figura 4).

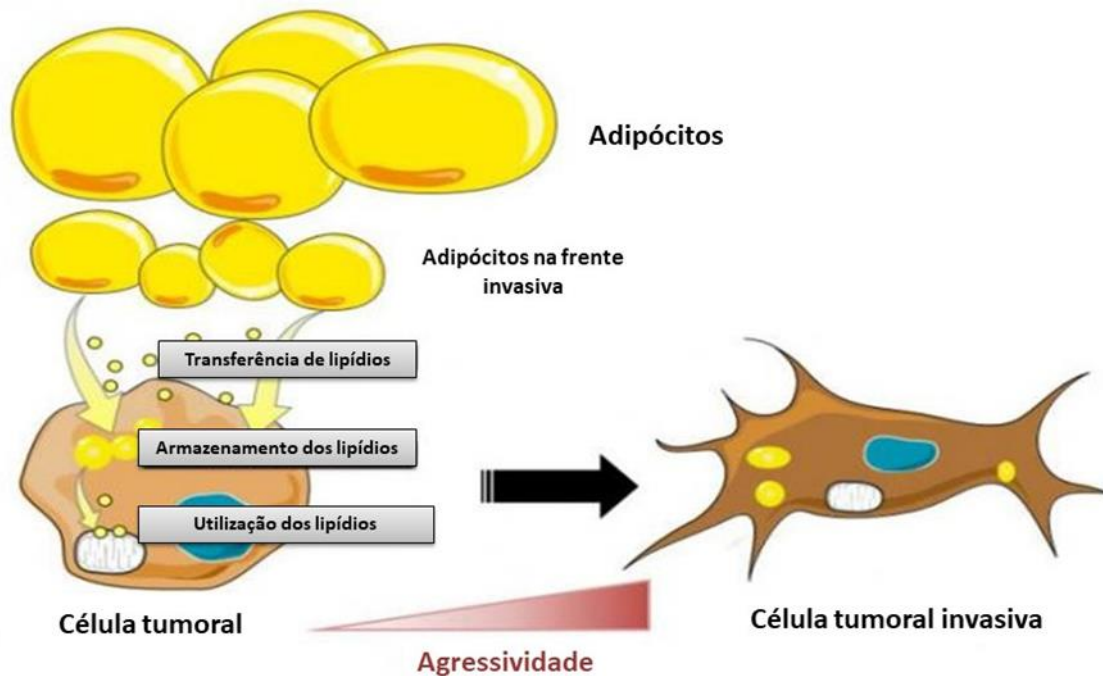


Figura 4: As células tumorais aumentam a captação dos lipídios liberados pelos adipócitos e os armazenam na forma de gotículas lipídicas. Ao longo do tempo, os lipídios são usados como fonte de energia, o que permite que as células tumorais aumentem suas capacidades invasivas, tornando-se mais agressivas. Fonte: Adaptado de Catherine Muller (2017) Institut des sciences biologiques.

O colesterol configura importante lipídio para o desenvolvimento e progressão do CAM. A homeostase do colesterol envolve o controle da biossíntese, captação, uso e transporte desse lipídio (AFONSO et al., 2018; IKONEN, 2008). Resumidamente, na primeira etapa da biossíntese do colesterol ocorre a condensação das moléculas de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), catalisada pela HMG-CoA sintase (HMG-CoAS). O HMG-CoA é posteriormente reduzido a mevalonato pela 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGCR), etapa enzimática irreversível e limitante na biossíntese do colesterol. Em seguida, mevalonato é fosforilado em duas reações sequenciais produzindo o mevalonato-5-difosfato. Este é então descarboxilado pela mevalonato-5-pirofosfato descarboxilase e convertido em isopentil pirofosfato, que em seguida é convertido em geranyl pirofosfato. Por conseguinte, a molécula de geranyl pirofosfato é transformada em farnesil pirofosfato.

Duas moléculas de farnesil pirofosfato são condensadas em esqualeno a partir da catalisação pela esqualeno sintase. O esqualeno é então ciclizado para formar lanosterol e, finalmente, o lanosterol é convertido em colesterol em uma série de 19 outras reações (Figura 5) (SHARPE; BROWN, 2013; SITAULA; BURRIS, 2016).

Adicionalmente, o colesterol pode ser obtido de fonte extracelular (proveniente da dieta) por meio das lipoproteínas que o carregam pela corrente sanguínea, principalmente LDL. A captação vesicular de LDL é essencial para o metabolismo do colesterol. Este processo é regulado pelo receptor de LDL (LDLR). O reconhecimento de apolipoproteína pelo receptor em pH neutro inicia a internalização, seguida pela ligação com a proteína adaptadora de LDLR no motivo NPxY citoplasmático e agrupamento de complexos receptor-ligante em cavidades revestidas de clatrina. Uma vez internalizado, o endossomo é ativado em condição ácida, resultando na liberação de ligantes internalizados do receptor (HUANG; SONG; XU, 2020). Os receptores são reciclados de volta para a superfície da célula. O colesterol internalizado reduz a biossíntese do colesterol por feedback negativo e a transcrição do LDLR ao inibir a proteína ligante do elemento regulado por esteróis (SREBP-2). O PCSK9 se liga ao LDLR que tem como alvo o LDLR para o lisossoma com fins à degradação. Mais uma vez, a lipogênese também é reduzida pela inibição de SREBP-1c. TG sofre adipogênese para formar gotículas de lipídios. Em condições normais, o excesso de colesterol pode ser tóxico para as células. Assim, o colesterol excessivo é convertido em éster de colesterol (CE) ou convertido em seu metabólito primário 27-hidroxicolesterol (27HC). ACAT-1 é a principal enzima responsável pela esterificação do colesterol e seu armazenamento em gotículas lipídicas (BROWN; RADHAKRISHNAN; GOLDSTEIN, 2018).

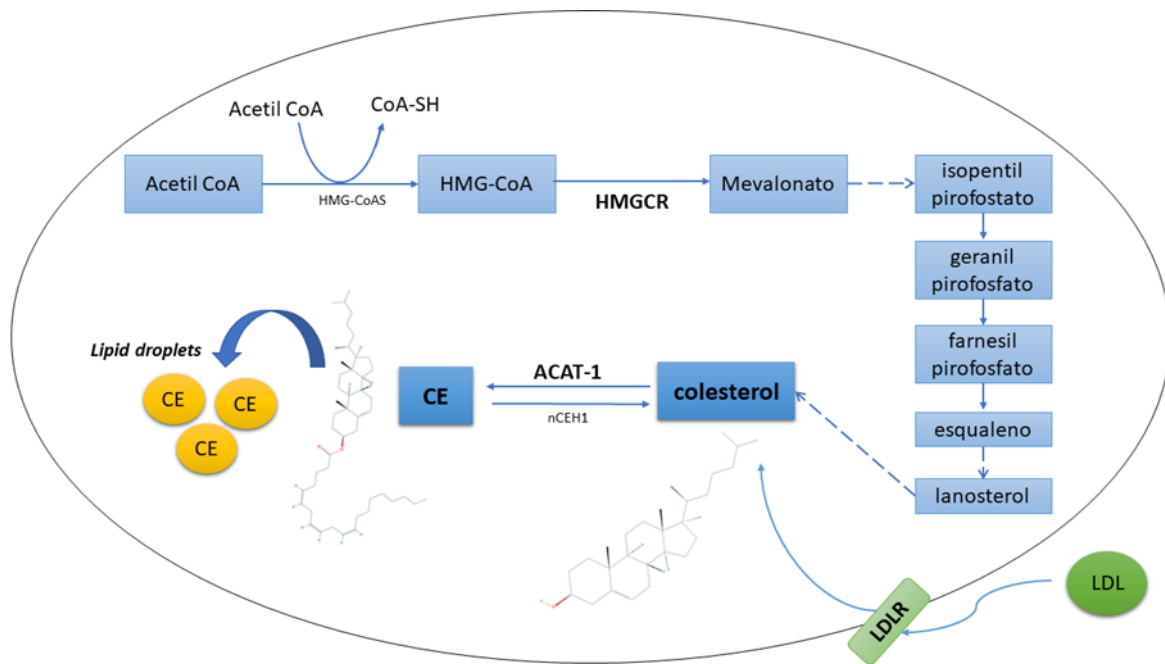


Figura 5: Esquema resumido da homeostase do colesterol celular. O ciclo de esterificação do colesterol e hidrólise de CE é um dos passos no controle da homeostase do colesterol intracelular. O colesterol livre, advindo tanto de fonte exógena quanto endógena proveniente da síntese celular pela via do mevalonato, é esterificado pela ACAT-1 e armazenado em forma de CE nas gotículas lipídicas. A enzima colesterolil-éster-hidrolase neutra (nCEH) age opostamente à ACAT-1, hidrolisando o CE e gerando colesterol livre e ácidos graxos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Já foi relatado que quanto maior a taxa proliferativa da célula tumoral, maior a avidade por colesterol, tanto os absorvidos da dieta como os endógenos (BELORIBI-DJEFAFLIA; VASSEUR; GUILLAUMOND, 2016). O colesterol é um lipídio essencial para a manutenção da homeostase celular, além de ser um precursor de hormônios esteroides e componente essencial das membranas plasmáticas, desempenhando um papel fundamental na transdução de sinal intracelular. Dessa forma, a desregulação da homeostase do colesterol é um fator contribuinte da progressão do CAM (Figura 6).

Sabe-se que os microdomínios de membrana enriquecidos com colesterol, denominados balsas lipídicas (do inglês *lipid rafts*), são essenciais à diversos eventos celulares como por exemplo a transdução de sinal para ativação de vias celulares PI3K/AKT/mTOR e RAF/MEK/ERK, importantes para o desenvolvimento e proliferação celular (MOLLINEDO; GAJATE, 2020). Enfatizando a importância do colesterol nesse contexto, estudo desenvolvido por Badana e colaboradores

(BADANA et al., 2016) mostrou que o tratamento de células triplo-negativas (MDA-MB 231 e MDA-MB 468) com metil- β clclodextrina (MCD), composto que depleta colesterol e desregula as balsas lipídicas, reduziu a proliferação e inibiu o comportamento invasivo das células TNBC de forma dose-dependente. Em outro estudo, A depleção do colesterol com MCD também aumentou a suscetibilidade de células de CAM luminal A e TNBC à carboplatina e 5-fluorouracil, e que reduziu a fosforilação de AKT na linhagem triplo-negativa (UPADHYAY et al., 2006).

Vale ressaltar que o colesterol também pode atuar de forma decisiva na supressão das respostas imunológicas contra o carcinoma. Já foi visto que as células TCD8⁺, maiores atuantes na resposta imune contra o tumor, conseguem absorver o colesterol das células cancerosas (cujo conteúdo é superior do que nas células normais) levando a uma superestimulação e perda da função celular, conhecido como processo de exaustão celular (MA et al., 2019; MILLER et al., 2010; YANG, Wei et al., 2016). Ademais, a manipulação do conteúdo intracelular de colesterol com B-ciclodextrina mostrou remodelar a resposta imune e prevenir o efeito de exaustão em células TCD8⁺ (YANG, Wei et al., 2016).

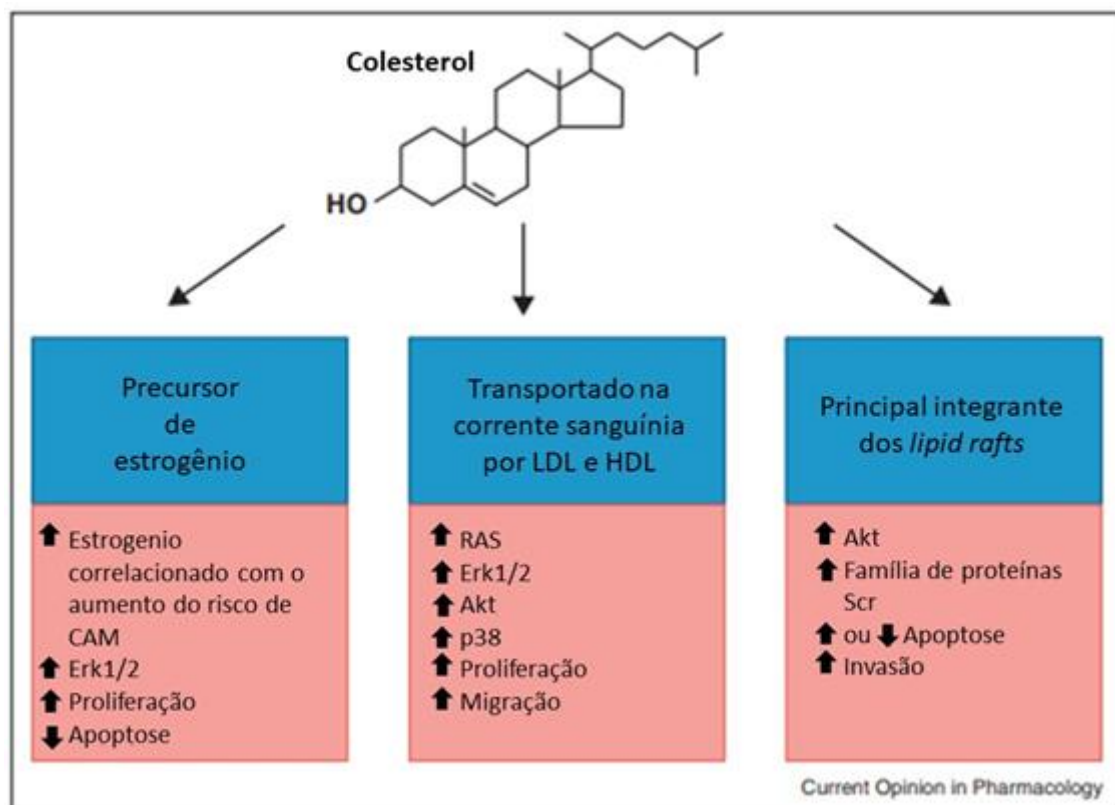


Figura 6: Representação esquemática dos mecanismos de ação do colesterol no CAM. O colesterol é um precursor do estrogênio, que tem um papel claramente estabelecido no CAM, principalmente nos

subtipos luminais, ativando as vias de sinalização, o que aumenta a proliferação celular e diminui a apoptose (YAGER ET AL 2006). Adicionalmente, lipoproteínas como LDL, ricas em colesterol, ativam vias de sinalização, incluindo Ras, Erk1 / 2, Akt (MINEO et al 2003) e p38, que estão associadas, à proliferação migração celular e à morte celular. O colesterol também é o principal constituinte dos *lipid rafts*, que atuam como uma plataforma para moléculas de sinalização, como as proteínas quinases Akt e Src, relacionadas também a migração, proliferação e apoptose. Fonte: Christiane Danilo 2012.

Células tumorais de diversos tipos de câncer apresentam alteração de enzimas chave da via do colesterol, o que leva a uma regulação positiva da biossíntese do colesterol e à produção aumentada dos seus metabólitos (YANG, Jie; WANG; JIA, 2020). Células provenientes de tumores gástricos apresentam expressão aumentada de HMGCR. Estudo clínico liderado por Bengtsson e colaboradores revelou que a expressão citoplasmática de HMGCR está associada ao desenvolvimento de câncer de cólon (BENGTSSON et al., 2014). No CAM, a utilização de microRNA-195 inibiu a expressão de HMGCR nas células de CAM MCF-7 e MDA-MB-231, resultando na alteração dos níveis de colesterol e na redução da proliferação celular. Adicionalmente, estudos mostram que o colesterol proveniente da dieta tem uma correlação positiva com desenvolvimento de CAM. Revisão sistemática e estudo meta-analítico mostraram correlação da alta ingestão de colesterol (>390mg/d) e o aumento do risco de desenvolvimento de CAM (LI, Changkun et al., 2016). Outro estudo realizado em murinos mostrou que a dieta rica em colesterol acelera o crescimento tumoral e a progressão da doença sob forma de metástases (LLAVERIAS et al., 2011). No entanto, os resultados dos estudos envolvendo dieta é muito debatido entre pesquisadores e cientistas, sendo as análises dependentes de muitas variáveis intrínsecas, como, por exemplo, pré-disposição da paciente à hipercolesterolemia (JIE YANG et al., 2020). Adicionalmente, sabe-se que o colesterol dietético tem efeito limitado sobre os níveis de colesterol plasmático (JIE YANG et al., 2020). Assim, embora o colesterol dietético possa ser indicativo de um estilo de vida propenso ao câncer, o colesterol sintetizado parece ter peso maior na progressão do CAM do que o colesterol dietético.

Apesar de muitos estudos abrangerem a importância do colesterol no CAM, pouco se sabe sobre o CE nesta doença. Nos CE, a hidroxila do colesterol se encontra esterificada com um ácido graxo, gerando um derivado ainda mais hidrofóbico do colesterol. Além de serem constituintes principais das gotículas lipídicas encontradas

nas células, são a forma na qual o colesterol é transportado na corrente sanguínea, compondo o cerne hidrofóbico das lipoproteínas. Vale ressaltar que as gotículas lipídicas facilitam a coordenação e a comunicação entre diferentes organelas e atuam como centros vitais do metabolismo celular. A desregulação da sua homeostase já foi relacionada com diversas patologias como presença de gordura no fígado, diabetes e doenças cardiovasculares (DALHAIMER, 2019; GLUCHOWSKI et al., 2017; O'ROURKE; YEAMAN; SHEPHERD, 2001).

A obesidade, que está intimamente relacionada com o CAM, é também caracterizada pelo acúmulo exacerbado de gotículas lipídicas nas células (D'AQUILA; ZEMBROSKI; BUHMAN, 2019; XU, Shimeng; ZHANG; LIU, 2018). A implicação destas no CAM foi reportada pela primeira vez em 1974, quando cientistas observaram que as células tumorais mamárias armazenavam material lipídico em vesículas lipídicas (RAMOS; TAYLOR, 1974). Entretanto, talvez por não ter acesso a métodos de pesquisa mais avançados, o papel exato do acúmulo de CE na progressão do câncer permaneceu sem elucidação por muitos anos.

Como a ACAT-1 é a principal enzima responsável pela síntese de CE, postula-se que essa enzima modula a síntese e o armazenamento de CE e formação das gotículas lipídicas, e conseqüentemente, tem implicações em diversas doenças. De fato, já foi descrito que ACAT-1 contribui para a formação dessas vesículas durante a adipogênese (ZHU et al., 2018) e que a expressão aumentada dessa enzima resulta em acúmulo de CE em diversos cânceres (ZABIELSKA; SLEDZINSKI; STELMANSKA, 2019).

Antalis e colaboradores (2010) revelaram que células de TNBC, em comparação às células luminais, apresentam mais gotículas lipídicas e mais concentradas em CE e TG (outro componente das gotículas). Adicionalmente, evidências na literatura sugerem tumores de mama de uma forma geral (independente do subtipo) expressam mais ACAT-1 do que células de mama não cancerosas (RHODES et al., 2004). Ademais, análises em amostras tumorais de CAM luminal A, HER2 e TNBC, sugerem que o excesso de CE intracelular está correlacionado com o perfil proliferativo e com fenótipo mais agressivo dos tumores (DE GONZALO-CALVO et al., 2015a).

A aquisição de fenótipo tumoral mais agressivo e resistente pode ser causado por diversos fatores, dentre eles, pela presença de células tronco tumorais (CSC). Essa subpopulação de células apresenta a capacidade de auto renovação e de se

diferenciar nas linhagens heterogêneas que compõem o tumor (JORDAN; GUZMAN; NOBLE, 2006). Além disso, por motivos ainda desconhecidos, essas células evadem à ação de quimioterápicos, resultando em recidiva da doença (MOSERLE et al., 2010). Recentemente, um estudo feito em painel de células de CAM mostrou que CSC apresentam formação aumentada de gotículas lipídicas (HERSHEY et al., 2019). Também foi observado que as CSC apresentam regulação positiva da via do mevalonato e aumento da síntese de ácidos graxos (BRANDI et al., 2017).

As evidências relatadas mostram claramente a relevância clínica do CE e das enzimas relacionadas com sua formação. Entretanto, uma revisão sobre a reprogramação metabólica no TNBC revelou que as essas vias lipídicas ainda são pouco conhecidas e exploradas nesse subtipo de CAM, e apenas a via de síntese de ácidos graxos é explorada e está sendo testada clinicamente como alvo terapêutico (SUN et al., 2020). Dentre os estudos que exploram essa via de ácidos graxos atualmente, um encontra-se em fase II (NCT03179904) e avalia a combinação quimioterápica de paclitaxel/trastuzumabe juntamente com a inibição da enzima ácido graxo sintase (FASN) pelo inibidor TVB-2640, em pacientes com CAM HER2 positivos; e o segundo estudo também em fase II (NCT02595372), envolve a avaliação da resposta patológica completa em pacientes com TNBC tratados com quimioterapia neoadjuvante padrão em combinação com omeprazol em altas doses. Ressalta-se que em estudos científicos preliminares, os pesquisadores mostram que os inibidores da bomba de prótons inibem efetivamente FASN (Clinicaltrials.gov).

Nos últimos anos, apesar de novos tratamentos e terapias terem sido desenvolvidos, os dados para morbimortalidade do CAM continuam alarmantes. Embora os benefícios potenciais para os pacientes e suas famílias sejam profundos, uma das principais barreiras na inovação terapêutica é o custo para o desenvolvimento e lançamento de um novo fármaco no mercado, podendo atingir em torno de 2 bilhões de dólares (KUNNUMAKKARA et al., 2019; MORGAN et al., 2011). Acrescente-se ainda que, no atual contexto financeiro e econômico, iniciativas público-privadas tentam diminuir o tempo e os custos da pesquisa e desenvolvimento de fármacos investindo no reposicionamento do fármaco, ou seja, encontrando novas utilizações fora do âmbito da indicação médica original de um medicamento aprovado (MASUDA et al., 2020). Uma das vantagens do uso dessa ferramenta é a possibilidade de minimizar a toxicidade dos medicamentos, responsável pelos efeitos colaterais em

diferentes órgãos e sistemas que aumenta significativamente a morbidade relacionada à doença. Em consonância ao exposto, substâncias que interferem com o metabolismo do colesterol, como as estatinas, surgem como estratégias auxiliares e viáveis de fármacos reposicionados e promissores no combate ao CAM.

1.4 ESTATINAS

O pioneiro nos estudos dos inibidores de HMGCR foi o bioquímico japonês Akira Endo, cuja pesquisa envolvendo metabólitos fúngicos e a síntese do colesterol por volta de 1970, levou ao desenvolvimento da classe de fármacos conhecido hoje como estatinas (ENDO, 2017). O fato das células fúngicas apresentarem em sua parede celular o ergosterol em vez de colesterol, levou Akira a testar sua hipótese de que os fungos produziam inibidores naturais que bloqueavam a biossíntese do colesterol. Analisando mais de 6000 substâncias, Akira isolou do *Penicillium citrinum* a mevastatina, inibidor competitivo da HMGCR com mais afinidade de ligação pela HMGCoA do que o substrato natural (ENDO, 2010). Apesar de testada para redução do colesterol em alguns estudos envolvendo pacientes, a mevastatina não foi comercializada para aplicação clínica devido à alta toxicidade (THOMPSON; MABUCHI, 2014). A primeira estatina comercial e com utilização clínica foi a lovastatina, isolada do *Aspergillus terreus*. Com o progresso científico, outras estatinas foram descobertas e sintetizadas para fins terapêuticos. Os principais representantes do grupo farmacológico comercializados são pravastatina, sinvastatina, lovastatina, fluvastatina, atorvastatina (ATV) e rosuvastatina (CEDRAZ; LAVORATO, 2020a).

Como agentes hipolipidêmicos de primeira escolha na atualidade, as estatinas têm sido utilizadas na prevenção primária e secundária das doenças cardiovasculares, sendo uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo (CEDRAZ; LAVORATO, 2020b). São fármacos relativamente seguros, bem tolerados e de baixo custo. O efeito hipolipemiante clássico das estatinas se dá por meio da inibição reversível e competitiva da HMGCR, bloqueando, assim, a biossíntese do colesterol. Entretanto, estudos já mostraram que adicionalmente à inibição endógena do colesterol, as estatinas regulam positivamente o LDLR no fígado e tecidos periféricos aumentando o clearance de colesterol (YOUNG; FONG, 2012). Além da eficácia na redução dos lipídios plasmáticos, evidências indicam uma série de outros efeitos

pleiotrópicos desses fármacos, que perpassam por melhoria na função endotelial, ações antitrombóticas, inibição da migração de células germinativas durante o desenvolvimento, efeito neuroprotetor, dentre outros (BEDI et al., 2016; BLUM; SHAMBUREK, 2009; LI, Hsin-Hua; LIN; HUANG, 2018).

Apesar das estatinas compartilharem o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto à atividade e à farmacocinética desses fármacos, basicamente por diferenças em sua estrutura molecular. Dentre essas diferenças, a lipossolubilidade é uma característica essencial, pois a incorporação hepática das estatinas é dependente dessa propriedade físico-química. Dados recentes sugerem que as estatinas lipofílicas podem ser preferíveis sobre as estatinas hidrofílicas por oferecerem melhores resultados clínicos na terapia dos pacientes (ANOTHASINTAWEE et al., 2016; BONSU; REIDPATH; KADIRVELU, 2015). Dentre os fármacos estatínicos empregados clinicamente, ATV é uma estatina sintética e lipossolúvel, cuja fórmula química é $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ (Figura 7). A ATV se liga à HMGCR por uma ligação de hidrogênio extra, o que contribui para sua alta potência e eficácia (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). Ainda, sua meia vida é de aproximadamente 14h, favorecendo maior tempo de duração do efeito da substância no paciente. Além disso, os efeitos adversos dessa estatina são poucos e fármaco é bem tolerada pelos seus usuários, tal que estudos têm demonstrado a segurança da utilização de altas doses de ATV (KOREN; FELDMAN; MENDES, 2009). Esses fatores, tornaram a ATV a estatina mais vendida no ano de 2002 (CAMPO, CARVALHO, 2007). Além dos efeitos pleiotrópicos das estatinas supracitados, o reposicionamento de um fármaco já existente, como a ATV, para nova aplicação clínica no manejo de pacientes com CAM resultaria numa abordagem segura e excelente opção em relação custo-eficácia e de baixa toxicidade para a terapia adjuvante que poderia ser disponibilizada.

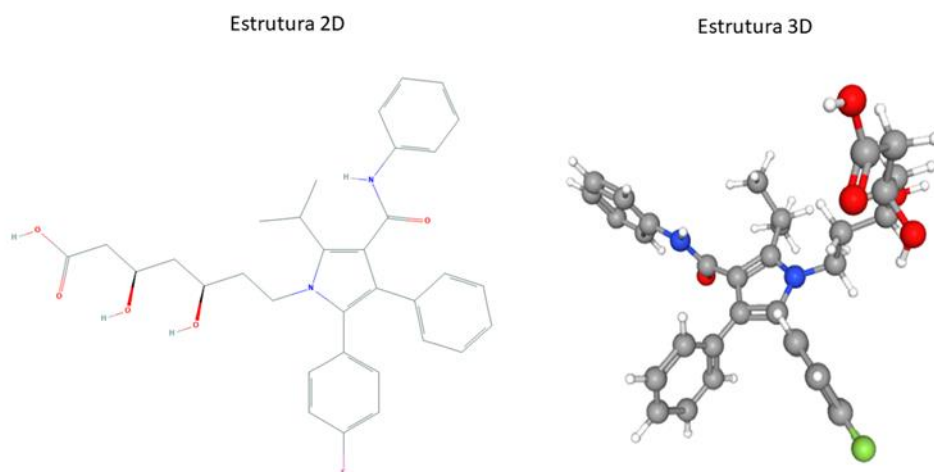


Figura 7: Estrutura 2D e 3D da ATV, um ácido di-hidroxi monocarboxílico ($C_{33}H_{35}FN_2O_5$), membro da classe de medicamentos conhecida como estatinas. Fonte: Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2021).

1.4.1 Efeitos das estatinas sobre o câncer

Na última década, uma série de publicações relataram o papel das estatinas no câncer, mostrando que esses fármacos podem atuar tanto como prevenção quanto na terapia (BARBALATA et al., 2020; LONGO et al., 2020). Foi relatado que pacientes com dislipidemia tratados com estatinas tiveram incidência menor de câncer em relação aos que faziam uso de outros medicamentos para hipercolesterolemia (FARWELL et al., 2008; NISHIBORI, 2007). Adicionalmente, o uso desses fármacos se correlacionou com a redução da mortalidade por câncer, melhorando a sobrevivência dos pacientes (VOORNEVELD et al., 2017; WANG, Ange et al., 2016).

Estudo conduzido por Poynter e colaboradores contendo 1.953 pacientes com câncer colorretal e 2.015 pacientes controle mostrou que o uso de estatinas por pelo menos cinco anos foi associado com risco reduzido de desenvolvimento da doença (POYNTER et al., 2005). Outro estudo retrospectivo de casos de câncer, conduzido por Murakami e colaboradores em 2016, associou o uso de lovastatina ao risco reduzido de desenvolvimento de CAM, apontando a estatina como potencial agente quimiopreventivo. Entretanto, há relatos na literatura mostrando resultados contraditórios. Baandrup e colaboradores conduziram estudos nos quais não se observou nenhuma associação entre o uso de estatinas e o menor risco de

desenvolvimento de câncer de ovário (BAANDRUP et al., 2015). Semelhantemente, ensaio clínico randomizado realizado por Seckl e colaboradores mostrou que o uso de pravastatina não beneficiou pacientes com câncer de pulmão (SECKL et al., 2017). No entanto, apesar de numerosos estudos epidemiológicos, não foi alcançado nenhum consenso definitivo sobre a relação entre o uso de estatina e o risco de desenvolvimento de câncer. Essa indefinição de dados pode estar relacionada à grande heterogeneidade dos grupos estudados utilizando diferentes estatinas, sugerindo a seletividade das estatinas para certos tipos de câncer, bem como a importância das diferenças farmacocinéticas das estatinas empregadas.

Diversos estudos têm buscado compreender o mecanismo antineoplásico das estatinas. Revisão publicada na *Clinical Cancer Research* abordou os principais mecanismos propostos na literatura das estatinas no câncer que perpassam por efeitos antiproliferativos, apoptóticos e anti-invasivos (CHAN; OZA; SIU, 2003). Segundo revisado por Brown (2007), além da diminuição da proliferação e da migração de células tumorais em função da redução na disponibilidade de colesterol, as estatinas diminuem a produção dos derivados de mevalonato, como o farnesol, um isoprenóide que constitui âncora lipídica para várias oncoproteínas como Ras e Rho. Por outro lado, estudo conduzido por Mücke e colaboradores (2004) indicou que o efeito antiproliferativo das estatinas testadas parece depender de efeito apoptótico mediado pela diminuição da regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Adicionalmente, Sanchez e colaboradores (2008) indicaram que os efeitos antiproliferativos e antitumorais das estatinas em linhagem de CAM luminal A são mediados por estresse oxidativo. É notório que os mecanismos que medeiam esses efeitos antiproliferativos das estatinas continuam pouco claros, sendo necessários investigações e estudos mais aprofundados para obtenção de dados mais consistentes.

Considerando que toxicidade e tolerabilidade são dois impasses significantes para a utilização dos agentes quimioterápicos convencionais, a ATV emerge como abordagem alternativa no enfrentamento do CAM, marcando a potencialidade de melhora de perspectiva e qualidade de vida das pacientes com CAM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diante do exposto, o objetivo central do nosso estudo foi investigar o efeito da ATV e CDDP nos subtipos de CAM luminal A e TNBC, e a possível modulação de CE na quimiorresistência adquirida à CDDP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto, delineamos os objetivos específicos, a saber:

- Analisar de forma comparativa a eficácia do quimioterápico convencional CDDP nas linhagens de CAM luminal A, MCF-7 e TNBC, MDA-MB-231;
- Verificar os possíveis mecanismos celulares da ATV na modulação da citotoxicidade da CDDP nas referidas linhagens;
- Analisar a expressão de proteínas ACAT-1, HMGCR e LDL-R que servem como centros reguladores da sinalização do metabolismo do colesterol nas linhagens citadas;
- Verificar como a disponibilidade de colesterol extracelular afeta a modulação do metabolismo nas células de CAM;
- Correlacionar a utilização da ATV à restauração da sensibilidade das células de CAM resistentes à CDDP.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

Para a realização deste estudo, empregaram-se linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, obtidas pelo ATCC, que representam o CAM luminal A e TNBC, respectivamente.

Adicionalmente, a partir da linhagem parental MDA-MB-231, foi desenvolvida a linhagem resistente à CDDP, MDACR. As células resistentes foram desenvolvidas a partir de um método já pré-estabelecido pelo nosso grupo, empregando-se estratégia de seleção de pulso seguida por recuperação em meio livre do fármaco para simular a administração de quimioterapia na clínica (DOS SANTOS GUIMARÃES et al., 2018). A linhagem MDA-MB-231 foi submetida ao tratamento com aumento gradual da concentração de CDDP. Em cada etapa de resistência, a concentração do fármaco aumentou duas vezes, de 5 μ M a 100 μ M. Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) high glucose (4500.0 mg/L) suplementado com HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico), bicarbonato de sódio 0,22% (p/v), soro fetal bovino inativado 10% (v/v) (FBS, Gibco/Invitrogen, Nova Iorque, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA). A morfologia celular foi observada usando microscópio Zeiss Observer Z1 e todas as imagens foram capturadas usando Axio-Vision Rel. 4,8 software (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

3.2 PREPARAÇÃO DE SORO DEFICIENTE DE LIPOPROTEÍNA (LPDS) E LDL

LPDS foi isolado a partir do FBS por método previamente estabelecido (FAIROOZY et al., 2017; GREWAL et al., 1996). Resumidamente, o FBS teve sua densidade ajustada para fração de $d > 1,25$ g/ml pela adição de KBr e submetido à ultracentrifugação a 4°C a uma velocidade de 100 000 rpm por 16 h, em ultracentrífuga Beckman TL-100. Em seguida, o colesterol (camada superior da solução centrifugada) foi cuidadosamente removido e o LPDS restante foi dialisado em NaCl 0,15 M overnight. Posteriormente, o LPDS foi esterilizado por passagem em filtro Millipore (Millex-GV 0,22 μ m) e armazenado a -20°C até o uso. O LDL que foi preparado e testado em estudos anteriores (FAIROOZY et al 2017; MENESES-SALAS, 2020), foi gentilmente doado pelo Dr. Thomas Grewal (Universidade de Sydney, Austrália).

3.3 FÁRMACOS E COMPOSTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

A CDDP foi comprada da empresa Cayman Chemical e diluída em PBS 1X. A ATV foi cedida pelo farmacêutico Paulo Palácio (O2 manipulação) e solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. Ressalta-se que, em todos os experimentos, a concentração final de DMSO foi $\leq 1\%$ (v/v).

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) E CÁLCULO ESTIMADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DAS CÉLULAS (IC_{50}) PARA OS FÁRMACOS DE INTERESSE

O cálculo da IC_{50} e avaliação citotóxica de CDDP e ATV foram realizados utilizando o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, MO, EUA). Vale ressaltar que o método de análise colorimétrica com o MTT permite mensurar o metabolismo celular pela redução deste sal por ação da succinato-desidrogenase mitocondrial, ocorrendo a formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (CARMICHAEL 1987). Brevemente, as células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 96 poços e, após 24h de cultivo, foram tratadas com os fármacos de interesse por 48h e 72h. Posteriormente, as células foram incubadas com 20 μ L da solução de MTT (5 mg/mL) por 4h. Em seguida, 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância procedeu em comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas (MR-96 A, Bioclin, MG, Brasil). Como controle interno dos experimentos, utilizou-se o veículo em que o fármaco foi diluído (PBS 1X e/ou DMSO $\leq 1\%$) em concentração e volume igual aos utilizados com os fármacos nos ensaios. Para a análise da VCM em depleção e/ou enriquecimento do conteúdo de colesterol sem tratamento, foi realizado o mesmo procedimento, porém, ao invés dos medicamentos, o meio após o cultivo foi retirado e substituído por meio fresco contendo 10% (v/v) de FBS ou 10% (v/v) de LPDS por 48h. Em seguida, 10% (v/v) LPDS + LDL (1% v/v) foram adicionados às células por 24h para avaliar a recuperação da viabilidade celular em condição experimental rica em lipídios. Os experimentos foram realizados em quadriplicata mecânica e triplicata biológica. A viabilidade celular foi calculada pela medida da absorbância e expressa em porcentagem relativa ao grupo controle usando a seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ relativa = \frac{Absorbância\ do\ grupo\ testado}{Absorbância\ do\ grupo\ controle} \times 100$$

O cálculo da IC₅₀ foi realizado a partir da curva de regressão não linear da concentração logarítmica (x-eixo) do fármaco contra a atividade enzimática representada pela viabilidade (eixo y), prevendo a concentração que mostrará 50% da inibição do controle.

3.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O Sistema de Análise de Células Vivas IncuCyte® S3 foi usado para monitorar o crescimento celular cinético das células e estudo sob as diversas condições experimentais. As células foram semeadas em placas de 96 poços à densidade de $0,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas durante a noite a 37°C em atmosfera umidificada (5% CO₂). Em seguida, o meio de semeadura foi removido e substituído por meio fresco contendo diferentes concentrações dos fármacos específicos para cada experimento. O crescimento celular foi monitorado por 72h. A confluência celular foi representada pela mudança de vezes em relação ao ponto de início (0 hora) para cada tratamento em relação ao grupo controle.

3.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE COLESTEROL E CE

Para a análise do conteúdo intracelular de colesterol e éster de colesterol, foi utilizado o kit Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 6 poços, e após 24h, tratadas com fármaco específico durante 24h. As células foram extraídas em PBS 1X e o conteúdo de proteína celular foi determinado usando ensaio de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Em seguida, os lipídios celulares foram extraídos usando uma extração de Folch (FOLCH et al 1957) e as amostras foram preparadas de acordo com o protocolo do fabricante para medir a fluorescência em um leitor de microplaca de fluorescência em 590 nm.

3.7 ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE COLESTEROL E CE

A síntese de colesterol e CE foi medida nas células cultivadas por método radiométrico, por meio do qual se avaliou a incorporação de [1-14C]-acetato e [3H]-oleato (Perkin Elmer) em colesterol e CE celular, respectivamente. As células foram incubadas em meio DMEM de alta glicose contendo em 0,5 mM de oleato, BSA 2% (p/v), [1-14C]-acetato 0,2 µCi / ml e [3H]-oleato 1 µCi / ml (Perkin Elmer) e incubadas por 4h. Em seguida, as células foram extraídas em PBS para determinar a incorporação de [1-14C]-acetato ou [3H] oleato nos lipídios usando método de extração de Folch (FOLCH et al 1957). Os lipídios intracelulares foram ressuspensos em clorofórmio/metanol (2:1), enriquecidos com colesterol e oleato (Sigma) e separados pelo método de cromatografia em camada delgada usando hexano/éter isopropílico/ácido acético (60:40:3, v/v/v) como o solvente de desenvolvimento. As bandas de colesterol e CE foram visualizadas na luz UV e raspadas da placa de cromatografia. A incorporação dos radioisótopos em bandas de colesterol e CE foi determinada por contagem de cintilação líquida, cujo princípio é baseado na emissão de energia pelo radionuclídeo, a qual é absorvida pelo solvente orgânico (solução cintiladora), provocando ionizações e excitações de suas moléculas emitindo fluorescência que é detectada.

3.8 IMUNOBLOTTING

Para investigar a expressão de proteínas, a proteína total foi extraída de células com tampão de lise de ensaio radioimunoprecipitação (RIPA) (complementado com inibidores de protease e fosfatase), e lisada usando uma seringa de 29G e centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. O teor de proteína das células foi determinado utilizando o ensaio proteico BCA (Thermo Fisher Scientific). Trinta µg de proteína foi carregado em géis SDS-PAGE 10% (p/v) e transferidas para membranas de flúor de polivinida (PVDF) (Merck). As membranas foram bloqueadas por 1h à temperatura ambiente com 5% (p/v) BSA e incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-HMGCR (IgG de coelho, ab174830; 1:1.000; Abcam), anti-ACAT-1 (IgG de camundongo, sc-69836; 1:1.000; Santa Cruz), anti-LDLR (IgG de coelho, ab52818, 1:500; Abcam) e como controle interno anti-14-3-3

(IgG de coelho, #8312S, 1:1000, Cell Signaling Technology). As membranas foram lavadas, incubadas em temperatura ambiente por 1h com os anticorpos secundários anticorpos secundários anti-IgG produzidos em coelho ou camundongo (1:5000, cell signalling). Em seguida, as mesmas foram lavadas novamente e os imunoblottings foram revelados com reagente de quimioluminescência (ECL plus; Merck). As bandas foram visualizadas usando o Sistema ChemiDoc. Os dados foram analisados pelo software de versão ImageLab 5.2 (Bio-Rad Laboratories, Hércules).

3.9 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR: MARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDEO (PI)

Para avaliação de apoptose celular foi realizado ensaio pela marcação com Anexina V-FITC (Becton Dickinson, NJ, EUA) sendo as células em necrose identificadas com iodeto de propídeo (PI) (Sigma, MO, EUA). Resumidamente, as células foram plaqueadas e realizou-se os tratamentos com ATV e CDDP. Após 48 horas, o meio foi coletado, as células lavadas com 1mL de PBS 1x e trpsinizadas. A tripsina foi inativada com meio de cultura, e este centrifugado a 800 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em 100µl de tampão de ligação contendo 10mM de HEPES (pH 7,4), 150mM de Cloreto de Sódio, 5mM de Cloreto de Potássio, 1mM de Cloreto de Magnésio e 1,8mM de Cloreto de Cálcio e incubados com 0,1µg/µL de Anexina V-PE e 0,1µg/µL de PI por 15 minutos no gelo e protegido da luz. Adicionou-se então 400µl de tampão de ligação. As amostras foram mantidas em gelo até o momento da aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo BDAccuri® C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3 utilizando o canal FL1 e FL2. Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra utilizando o canal FL-1 (530nm) para anexina e V-FITC e FL-2 (585nm) para o PI.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram obtidos de pelo menos três repetições experimentais e apresentados como média \pm SEM. A análise de dados foi realizada no GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, LLC). As diferenças entre os grupos foram avaliadas

com testes estatísticos apropriados, incluindo One-Way ANOVA, Two-Way ANOVA e testes post-hoc, anotados nas legendas das figuras.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA CDDP NAS LINHAGENS DE CAM LUMINAL A E TNBC

Para comparar o efeito citotóxico da CDDP nos diferentes subtipos de CAM, as linhagens representativas do subtipo luminal A (MCF-7) e TNBC (MDA-MB-231) foram incubadas com diferentes concentrações de CDDP (2, 20, 40 μ M) e foi realizada a análise da VCM (Figura 8A) e proliferação celular (Figura 8B). Em relação à VCM, a ação da CDDP A demonstrou ser dose e tempo dependente (Figura 8A). 40 μ M de CDDP reduziu a VCM de MCF-7 e MDA-MB-231 para 11% ($p < 0,0001$ vs. controle) e 68% ($p < 0,0001$ vs. controle) após 48h, respectivamente, e para 5% ($p < 0,0001$ vs. controle) e 53% ($p < 0,0001$ vs. controle) após 72h, respectivamente; sendo o efeito mais acentuado em MCF-7 do que em MDA-MB-231 (Figura 8A). Quanto à proliferação celular, a ação da CDDP também demonstrou ser dose e tempo dependente (Figura 8B). Entretanto, diferentemente do observado na VCM em que o efeito foi maior em na linhagem luminal, na proliferação celular observamos perfil semelhante de eficácia de CDDP entre as duas linhagens. A confluência celular diminuiu para 26% na linhagem MCF-7 ($p < 0,0001$ vs. controle) e para 35% na linhagem MDA-MB-231 ($p < 0,0001$ vs. controle) após 48h de tratamento, e para 18% na linhagem MCF-7 ($p < 0,0001$ vs. controle) e 20% na linhagem MDA-MB-231 ($p < 0,0001$ vs. controle) após 72h de exposição à CDDP (Figura 8B). Em conclusão, com foco no TNBC, o efeito da CDDP foi maior na proliferação celular do que no VCM, mostrando que o metabolismo celular dessa célula difere da luminal A e que um possível aumento na atividade metabólica da linhagem MDA-MB-231 pode estar relacionada a diferença de sensibilidade à CDDP.

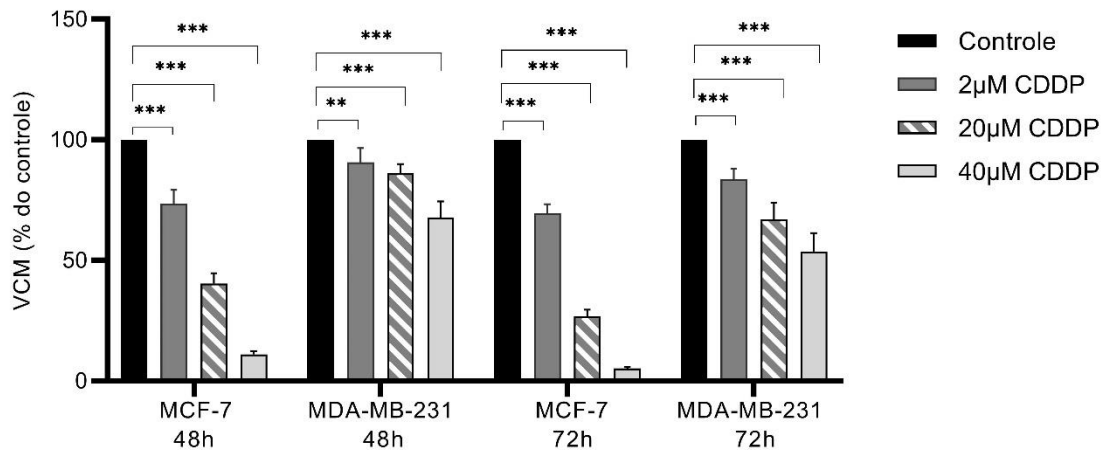
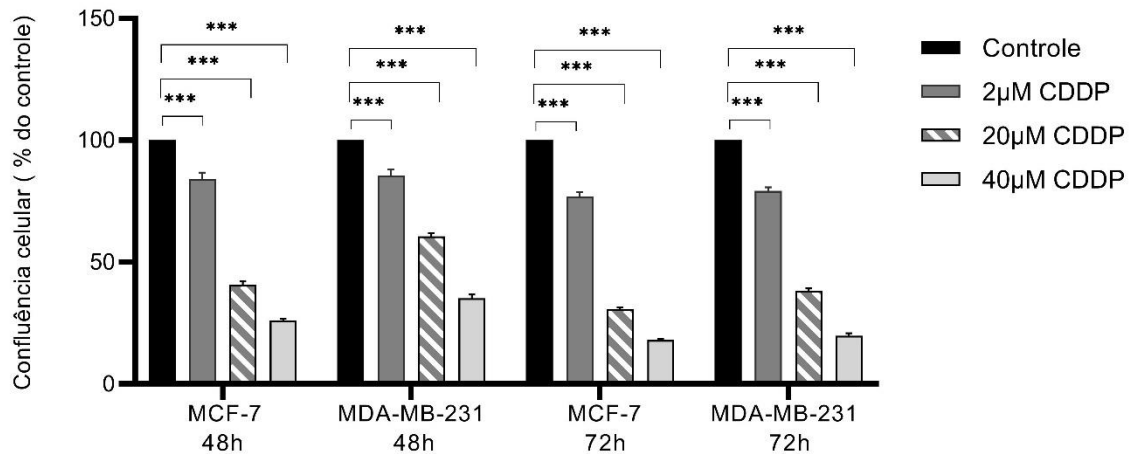
A**B**

Figura 8: Efeito da CDDP nas células MCF-7 e MDA-MB-231. As células de CAM foram plaqueadas em placas de 96-poços e incubadas a 37°C com 5% CO₂. As células foram incubadas com o veículo solvente ou CDDP (2, 20 ou 40 µM) por 48 e 72 horas. Os efeitos citotóxicos foram avaliados por ensaio MTT (A) e a taxa de proliferação foi avaliada em tempo real utilizando o equipamento *Incucyte*. Os valores são expressos em porcentagem em relação às células tratadas com o veículo solvente (controle) e representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizadas em triplicado. ANOVA de duas vias foi utilizada com teste de comparações múltiplas de Sidak *p < 0.05, **p < 0.005, e ***p < 0.0001 quando comparado ao controle.

4.2 A ATV AUMENTA O EFEITO CITOTÓXICO DA CDDP NAS CÉLULAS DE CAM

As estatinas têm demonstrado agir sinergicamente com outros quimioterápicos em diversos tipos de câncer como melanoma, câncer de bexiga e câncer pancreático (FOLLET et al., 2012; HENSLEE; STEELE, 2018). Dessa forma, avaliamos o impacto da ATV na sensibilidade das células de CAM à CDDP. Conduzimos experimentos de VCM com as células MCF-7 e MDA-MB-231, combinando CDDP (0.064 a 40 μ M) com ATV na concentração de IC₅₀ estimado (5 μ M) ou 0,1 μ M de ATV. Ressalta-se que a concentração de 0,1 μ M de ATV utilizada está dentro da faixa de concentrações seguras do fármaco (100mM a 200nM) detectada por meio de estudos farmacocinéticos em pacientes que fazem uso de estatina com fins hipolipidêmicos (CILLA et al., 1996; DULAK; JÓZKOWICZ, 2005).

O esquema de tratamento CDDP+ ATV foi mais efetivo nas linhagens do que o tratamento com CDDP em monoterapia (Figura 9A e 9B). Interessantemente, a linhagem MDA-MB-231 foi mais sensível ao tratamento combinado de CDDP e ATV, quando comparado à MCF-7, de forma dose- e tempo- dependente. De fato, na linhagem MCF-7 (Figura 9A), a combinação de CDDP 0.064 μ M com ATV IC₅₀ por 48 e 72h, reduziu a VCM para aproximadamente 60% ($p < 0,0001$ vs. regime de agente único), enquanto, na linhagem MDA-MB-231 (Figura 9B), sob as mesmas condições, houve uma redução da VCM para 45% e para 25% em 48 e 72h de tratamento, respectivamente. Adicionalmente, diferentemente do observado para a linhagem luminal, o tratamento combinado com ATV IC₅₀ foi estatisticamente mais significativo do que CDDP em monoterapia em todas as combinações na linhagem triplo-negativa (exceto quando utilizada a maior concentração de CDDP 40 μ M). Ademais, o tratamento combinado de CDDP com ATV 5 μ M diminuiu a IC₅₀ de CDDP na linhagem MDA-MB-231 em aproximadamente 75 e 166 vezes após 48h e 72h, respectivamente. Este fato mostra aumento robusto na potência da CDDP induzida por ATV no tratamento de TNBC (Quadro 2).

Como a VCM de MDA-MB-231 foi completamente abolida quando utilizadas concentrações mais altas de CDDP e ATV combinadas por 72h, selecionamos concentrações intermediárias de ATV (0,1, 1 e 10 μ M) e uma concentração constante de CDDP (20 μ M) para os experimentos seguintes. Conforme compilado na Figura 8B, a proliferação celular de MCF-7 e MDA-MB-231 foi significativamente reduzida na presença do tratamento combinado. Após a exposição das células aos fármacos concomitantemente, a proliferação de MCF-7 diminuiu para aproximadamente 50%

em todas as concentrações de ATV ($p < 0,0001$ vs. controle). Por outro lado, a proliferação de células MDA-MB-231 foi nitidamente mais afetada pelo tratamento combinado de uma maneira dependente da dose de ATV. O efeito de CDDP 20 μM combinado com ATV 10 μM foi de maior magnitude em MDA-MB-231 do que em MCF-7; a proliferação celular reduziu para 29% ($p < 0,0001$) e 19% ($p < 0,0001$) em 48 e 72h, respectivamente. Vale ressaltar que mesmo a concentração segura de ATV (0,1 μM) reduziu a proliferação de células MDA-MB-231 para 50% se comparado ao controle ($p < 0,0001$). O fato de o tratamento combinado com ATV ter sido mais eficaz e potente do que o tratamento em monoterapia com CDDP sugere que o metabolismo do colesterol possa ter um papel chave na resistência à CDDP.

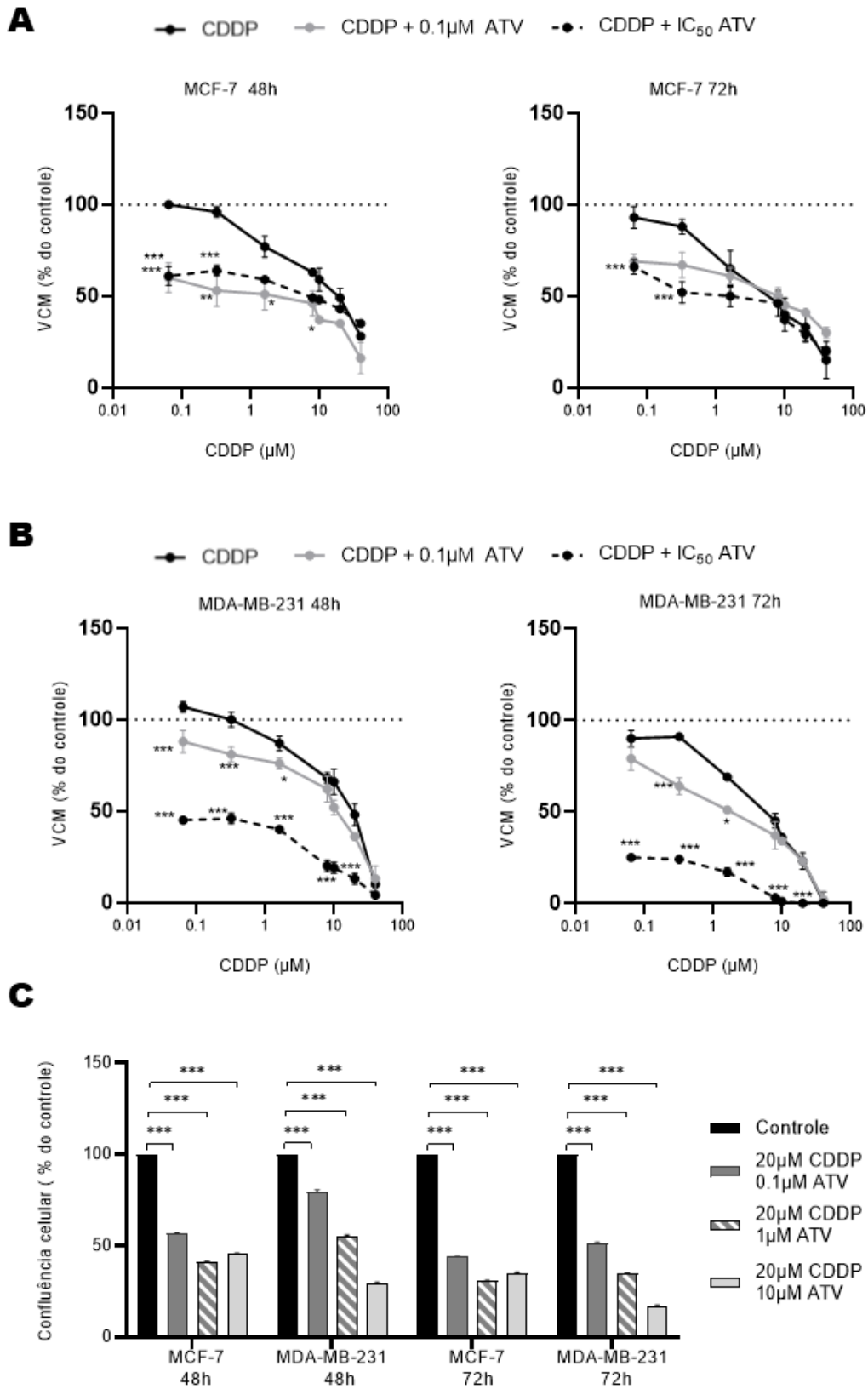


Figura 9: Efeitos citotóxicos da combinação de CDDP e ATV nas células MCF-7 e MDA-MB-231. (A) Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com concentrações crescentes de CDDP com ATV (0,1

μM ou IC_{50}) e a VCM foi avaliada em 48 e 72 horas pelo método de MTT. (B) Efeito do tratamento combinado no crescimento celular em 48h e 72h. Os valores são expressos em relação às células tratadas com o solvente. ANOVA de dois fatores com teste de comparações múltiplas de Sidak foi usado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, e *** $p < 0.0001$.

Quadro 2: Valores de IC_{50} estimados para o tratamento de CDDP e CDDP + ATV

| Condições | MCF-7 | | MDA-MB-231 | |
|------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 48 horas | 72 horas | 48 horas | 72 horas |
| CDDP | 15 μM | 6.2 μM | 15 μM | 5 μM |
| CDDP + 0.1 μM ATV | 3 μM | 8 μM | 10 μM | 2.5 μM |
| CDDP + IC_{50} ATV | 9 μM | 4 μM | 0.2 μM | 0.03 μM |

4.3 EFEITO DA ATV E DA DISPONIBILIDADE DO COLESTEROL NAS LINHAGENS DE CAM

Para examinar o efeito da ATV em monoterapia na VCM, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com concentrações crescentes de ATV (0,1 μM a 100 μM) por 48 e 72h. A ATV diminuiu significativamente a VCM de MCF-7 e de MBA-MB-231 de forma dose- e tempo- dependente (Figura 10A, painéis da esquerda e da direita). Curiosamente, a ATV foi significativamente mais potente na modulação da VCM de MDA-MB-231 do que de MCF-7, conforme constatado pelo valor da IC_{50} de ATV em MCF-7 (50 μM) vs. em MDA-MB-231 (10 μM) em 48h. De relevância clínica, a eficácia do tratamento com ATV foi semelhante em ambas as linhas celulares após 48 horas de tratamento com a droga (uma redução de aproximadamente 60% vs. controle de MCV nas células; $p < 0,0001$), mas não quando expostas à ATV durante 72h, condição em que a eficácia do ATV parece maior em MDA-MB-231 (aproximadamente 90% vs. controle) do que em MCF-7 (aproximadamente 70% vs. controle) ($p < 0,0001$) (Figura 10A).

Para avaliar o efeito da estatina na proliferação de células, o ensaio de proliferação IncuCyte em tempo real foi realizado em células tratadas com ATV por 48h e 72h (Figura 10B). Corroborando com os dados de VCM, o efeito do ATV na proliferação celular foi de maior magnitude na MDA-MB-231 do que na linhagem MCF-7, tanto em 48h quanto em 72h. Após 48h de tratamento, ATV 0,1 μM não alterou a proliferação em nenhuma das linhagens testadas. No entanto, observamos diminuição na proliferação celular quando concentrações mais elevadas de ATV foram utilizadas (1 μM e 10 μM). A proliferação de MCF-7 diminuiu significativamente para 70%

exclusivamente na presença de ATV 10 μ M. Por sua vez, a proliferação de células MDA-MB-231 diminuiu 34% e 77% em comparação com o controle, quando as células foram tratadas com 1 μ M e 10 μ M de ATV, respectivamente. Após 72h de tratamento das células com ATV, nenhuma alteração no perfil de proliferação de MCF-7 foi observada. No entanto, notou-se uma diminuição mais acentuada na taxa de proliferação de MDA-MB-231 quando expostas a 1 μ M e 10 μ M de ATV, em torno de 50% e 86% respectivamente (Figura 10B).

A regulação fina da homeostase do colesterol inclui tanto a síntese quanto a esterificação do colesterol, bem como a síntese do receptor de LDL. Para avaliar se o efeito da ATV foi em consequência da modulação do conteúdo lipídico ou da lipogênese, as células foram cultivadas em condições experimentais ideais para medição bioquímica de CE ou em meio suplementado com isótopos estáveis usados para análise de biossíntese de CE. O conteúdo intracelular de CE (Figura 10C) e a taxa de incorporação de oleato em CE (Figura 10D) após o tratamento das células com ATV diminuíram significativamente em aproximadamente 50% quando comparados com o controle ($p < 0,0001$). Deste modo, o conteúdo reduzido de CE e a síntese de CE em células tratadas com ATV provavelmente contribuem para o efeito anticâncer desse medicamento.

Para explorar se as diferenças na homeostase do colesterol entre as duas linhagens celulares se estenderiam a alterações no suprimento do colesterol exógeno, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em um meio suplementado com FBS ou soro depletado de lipoproteínas (LPDS) na presença ou ausência de LDL humano. Os níveis de CE foram aproximadamente três vezes maiores nas células MDA-MB-231 em comparação com as células MCF-7 quando cultivadas em FBS (Figura 10E). As quantidades de MCF-7 CE não foram alteradas em resposta à cultura de células em meio contendo LPDS ou em meio LPDS suplementado com LDL (Figura 10E), enquanto em células MDA-MB-231, as concentrações de CE foram reduzidas em 90% nas células cultivadas em meio contendo LPDS, que foi parcialmente restaurado após a suplementação de LDL (Figura 10E). Esses resultados sugerem que as células MCF-7 exibem mecanismos compensatórios que superam a depleção de lipoproteínas, enquanto as células MDA-MB-231 são altamente sensíveis, apesar de terem maiores estoques de CE intracelular basal.

Como o colesterol interfere na proliferação celular (WANG, Yan; LIU; HU, 2019), incubamos MCF-7 e MDA-MB-231 em um meio suplementado com FBS ou LPDS na presença ou ausência de LDL, que representa condição experimental enriquecida com colesterol, afim de verificar a modulação da taxa proliferativa nessas linhagens. Experimentos de proliferação celular demonstraram que a taxa de crescimento de MDA-MB-231 foi maior do que a de MCF-7 em 96h (87% vs. 50%, respectivamente) ($p < 0,0001$) quando cultivado em FBS (Figura 10F). Resultados semelhantes foram observados quando as células foram submetidas à privação de colesterol pelo crescimento em LPDS. Sob esta condição experimental, a taxa de crescimento de MDA-MB-231 permaneceu maior do que a de MCF-7 em 96h (79% vs. 34%, respectivamente) ($p < 0,0001$). Quando 1% (v/v) de LDL foi adicionado ao meio de cultura, houve recuperação significativa na proliferação de MCF-7 para 46% ($p < 0,0001$); no entanto, nenhuma diferença foi observada no MDA-MB-231 (Figura 10F). Em qualquer caso, nossos dados mostram que a taxa de proliferação de MDA-MB-231 é maior do que a de MCF-7 e que apenas a proliferação de MCF-7, mas não a de MDA-MB-231, depende da suplementação de LDL exógena com LPDS.

Em relação a modulação da VCM, observamos efeito semelhante ao da proliferação nas células MCF-7, onde comparado ao controle, houve uma redução significativa na VCM de MCF-7 em LPDS em aproximadamente 50% ($p < 0,0001$) e recuperação parcial de mesma quando as células foram cultivadas em LPDS + LDL (76%; $p < 0,0001$) (Figura 10G). Entretanto, observamos um efeito diferente em relação à MDA-MB-231, onde a VCM permaneceu constante quando as células foram cultivadas em FBS ou LPDS, sugerindo a ocorrência de mecanismos compensatórios. Adicionalmente, observou-se aumento de aproximadamente 50% da VCM quando 1% (v/v) de LDL foi adicionado ao LPDS (Figura 10G) na linhagem MDA-MB-231 ($p < 0,0001$).

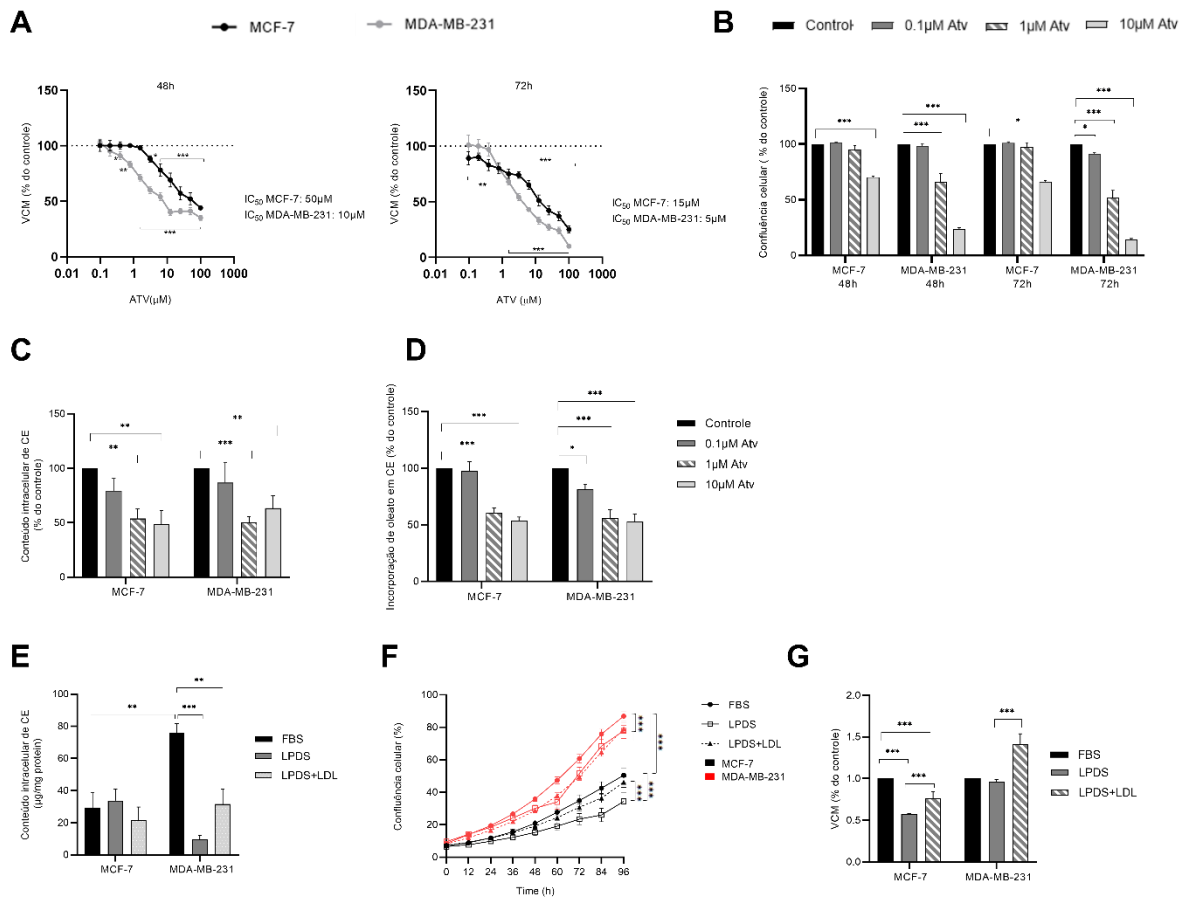


Figura 10: Efeito da ATV e da disponibilidade de colesterol em células MCF-7 e MDA-MB-231. (A) Efeito citotóxico de ATV em células MCF-7 e MDA-MB-231, e os valores de IC₅₀ foram calculados pelo ensaio MTT, usando concentrações que variaram de 0,1 a 100 μ M de ATV em 48h (painel esquerdo) e 72 horas (painel direito). (B) Efeito do tratamento com ATV (0,1, 1 ou 10 μ M) no crescimento celular em 48 e 72h. (C) Efeito do tratamento com ATV no conteúdo de CE. (D) Efeito do tratamento com ATV na incorporação de oleato em CE. (E) Conteúdo de CE de células MCF-7 e MD-MB-231 cultivadas em DMEM contendo FBS, LPDS ou LPDS suplementado de 1% v/v LDL. (F) Decurso do tempo de crescimento de células MCF-7 e MDA-MB231 cultivadas em DMEM contendo FBS, soro LPDS ou LPDS suplementado de 1% v/v LDL e fotografado com IncuCyte. (G) Viabilidade celular metabólica (VCM) de MCF-7 e MDA-MB-231 de células cultivadas em DMEM contendo FBS ou soro LPDS por 48h, então LDL foi adicionado ao meio contendo LPDS por 24h. A análise estatística em A, B, C, D e G foi realizada usando ANOVA de uma via mais o pós-teste de Šídák, e * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0001$ indicam diferenças significativas em comparação com os não tratados (controle) grupo ou grupo FBS. A análise estatística em E e F foi realizada usando o teste ANOVA de duas vias e pós teste Šídák, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0001$ indicam diferenças significativas em comparação com o grupo FBS.

4.4 EFEITO DA CDDP NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO DO CE NAS LINHAGENS DE CAM

Como já mencionado, a quimioterapia citotóxica pode desencadear estresse metabólico em tumores humanos, levando a alterações no equilíbrio entre a síntese endógena e a captação exógena de colesterol que promovem a proliferação e sobrevivência do câncer (TILIGADA E. 2006, SCHULZE A, HARRIS AL. 2012). Essas características metabólicas são frequentemente acompanhadas por um aumento do acúmulo de CE, todos apoiando a proliferação e sobrevivência do câncer (29). Dada a capacidade do ATV de melhorar a eficácia do CDDP em células MDA-MB-231 (Figura 8), medimos a seguir os aspectos do metabolismo CE em células BC após a exposição aguda ao CDDP.

Primeiramente, para testar a hipótese que o diferente efeito citotóxico das drogas observado nas linhagens era decorrente de diferenças no metabolismo, determinamos os níveis de expressão de proteínas chave na via de síntese do colesterol (HMGCR), captação de colesterol (LDLR) e esterificação do colesterol (ACAT-1). Enquanto a análise do Imunoblot mostrou expressão relativa significativamente alta de HMGCR na linhagem MCF-7 quando comparado a MDA-MB-231, a expressão de LDLR e ACAT-1 é maior em MDA-MB-231 (Figura 11A). Após a exposição à CDDP, apesar de ser observada uma tendência ao aumento da expressão de ACAT-1, essa diferença não foi estatisticamente significante em células MCF-7 ou MDA-MB-231 (Figura 11B). Por outro lado, os níveis de proteína HMGCR em células MDA-MB-231 foram reduzidos em 28% e 52% na presença de 2 μ M e 20 μ M CDDP, respectivamente, mas inalterado em células MCF-7 (Figura 11C). Curiosamente, os níveis de proteína LDLR foram reduzidos em MCF-7 para 45% e 29% dos níveis de controle em resposta a 20 μ M e 40 μ M de CDDP, respectivamente; no entanto, o LDLR foi reduzido em 27% nas células MDA-MB-231 apenas na concentração mais alta (Figura 11D). O tratamento com CDDP aumentou os níveis de CE em células MCF-7 de forma significante, mas não em células MDA-MB-231 (Figura 11E), o que não foi associado à taxa de síntese de CE (Figura 11F). Estes resultados demonstram efeitos específicos de CDDP para cada tipo celular no metabolismo do CE, o que pode sustentar a sensibilidade diferencial aos efeitos antiproliferativos da droga.

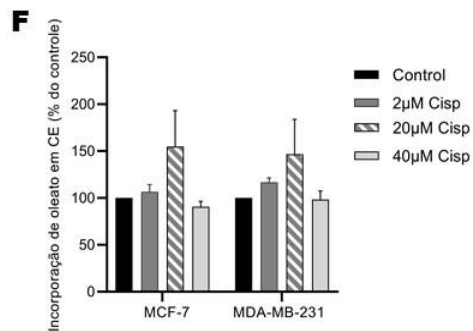
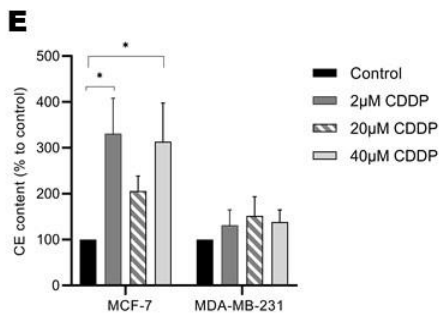
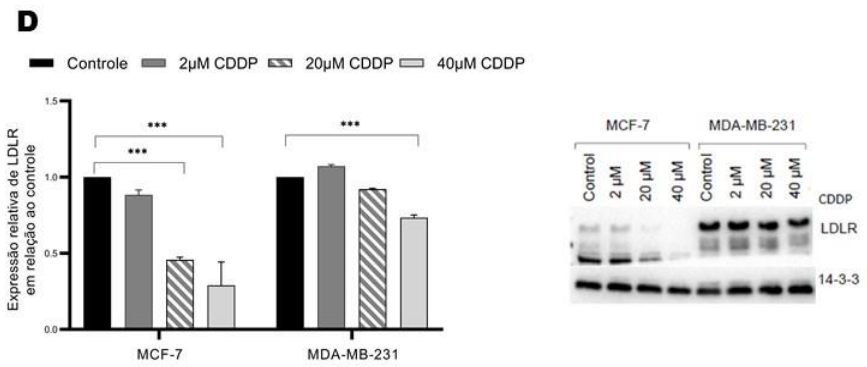
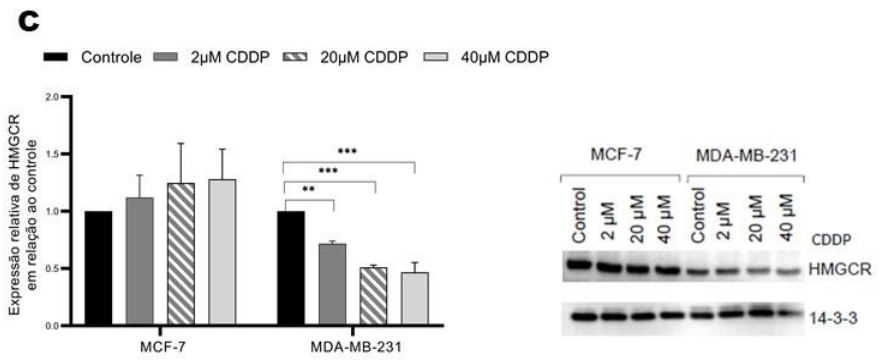
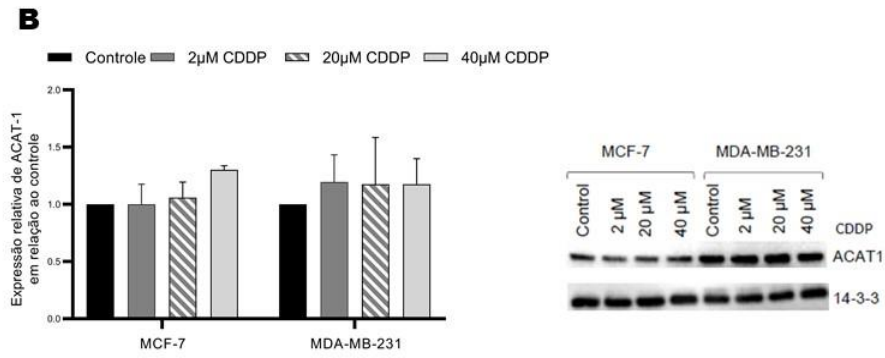
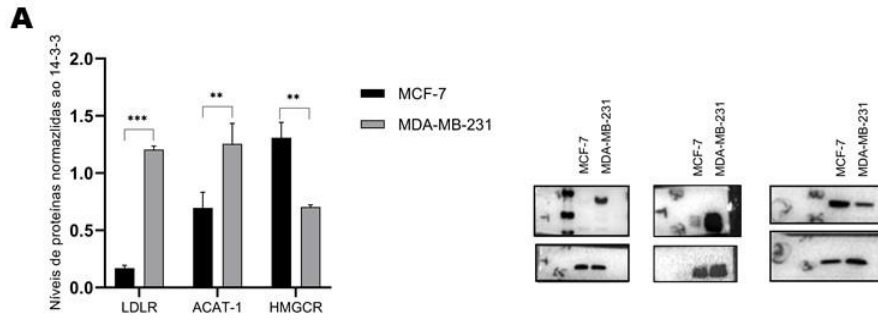


Figura 11: Efeito da CDDP na modulação do metabolismo de CE. (A) Imunoblots representativos e quantificação densitométrica dos níveis de proteína ACAT-1, HMGCR e LDLR em células MCF-7 e MDA-MB-231 cultivadas em DMEM contendo FBS sem nenhum tratamento. Imunoblots representativos e quantificação densitométrica de (B) ACAT-1, (C) HMGCR e (D) LDLR em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com veículo solvente (controle) ou CDDP (2 μ M, 20 μ M ou 40 μ M). 14-3-3 foi usado como o controle de carregamento. (E) conteúdo de CE e (F) esterificação de colesterol em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com veículo solvente (controle) ou CDDP (2 μ M, 20 μ M ou 40 μ M) por 24 h. A análise estatística em A foi realizada usando teste-t não pareado. A análise estatística em B, C, D, E e F foi realizada usando ANOVA de uma via mais o teste de comparações múltiplas de Šídák. *p <0,05, ** p <0,005 e *** p <0,0001 quando comparado ao controle.

Os resultados apresentados até este ponto suportam o potencial papel-chave do metabolismo do CE na MDA-MB-231, considerando os parâmetros lipídicos e mitocondriais. Para explorar ainda mais esse achado, realizamos uma análise *in-silico* em dados extraídos do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) de pacientes com CAM basal e pacientes luminais A, no que diz respeito à baixa e alta expressão de ACAT-1, HMGCR e LDLR. Vale lembrar que, o subtipo de CAM basal inclui o subtipo TNBC. Conforme mostrado na Figura 12, a probabilidade de sobrevivência dos pacientes foi significativamente afetada pela expressão elevada de ACAT-1 e LDLR no CAM basal (100 meses), mas não no câncer de mama A luminal (> 300 meses e 200 meses, respectivamente). Por sua vez, um padrão oposto de probabilidade de sobrevivência dos pacientes foi observado em relação à alta expressão de HMGCR, que foi menor no CAM luminal A (200 meses) em comparação com pacientes com BBC (~300 meses). De notar, os dados da análise de Kaplan-Meyer estão de acordo com os derivados de experiências de transferência de expressão de proteínas *in vitro*. Essa diferença de expressão das referidas proteínas nos tumores, pode estar relacionada à resistência aos tratamentos convencionais como observado na clínica, e, conseqüentemente, à pior desfecho clínico com redução da sobrevida dos pacientes.

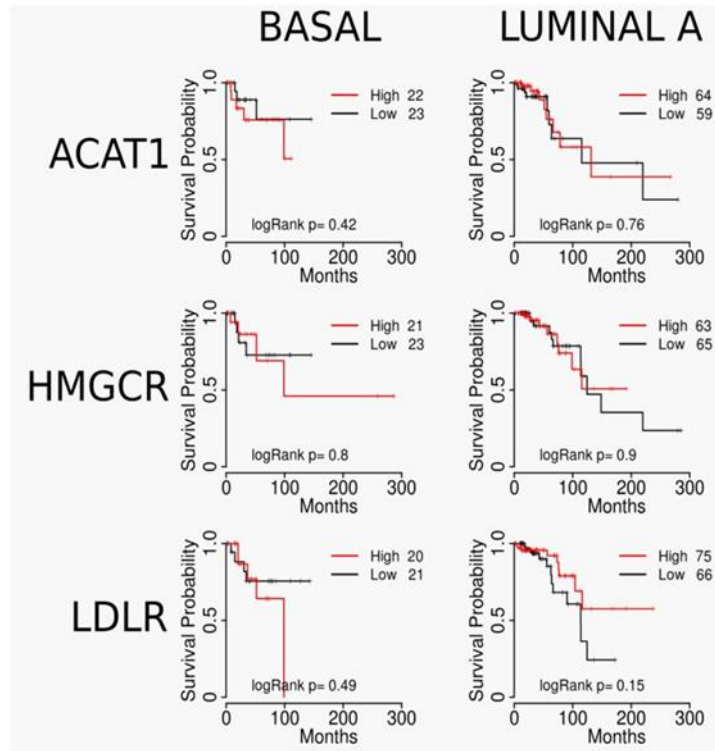


Figura 12: Correlação das principais enzimas e receptor do metabolismo de CE com a sobrevivência de pacientes com CAM basal e luminal A. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram geradas usando o site TCGA. A probabilidade de sobrevivência do paciente foi comparada entre dois grupos divididos no valor mediano da expressão da proteína como superior (vermelho) e inferior (preto) nos dados TCGA usando o plotter Kaplan-Meier com a melhor opção de corte.

4.5 EFEITO DA TERAPIA COMBINADA DE CDDP COM ATV NA MODULAÇÃO DO METABOLISMO DO CE NAS LINHAGENS DE CAM

Em seguida, investigamos o papel do tratamento combinado com 20 μM de CDDP e ATV (0.1, 1 μM ou 10 μM) na esterificação do colesterol e no acúmulo de CE intracelular em células MCF-7 e MDA-MB-231. O conteúdo de CE intracelular na linhagem MCF-7 se manteve inalterado frente a qualquer combinação testada dos fármacos (Figura 13A). Entretanto, CDDP combinado tanto com 1 μM ou 10 μM de ATV reduziu aproximadamente 40% o conteúdo de CE quando comparado ao controle ($p < 0.05$), linhagem MDA-MB-231 (Figura 13A). Por outro lado, a esterificação do colesterol diminuiu notavelmente de maneira dose-dependente em ambas as linhagens celulares, sugerindo que a inibição da esterificação do colesterol parece depender da variação da concentração de ATV em vez da concentração de CDDP,

visto que a concentração de CDDP usada foi constante (Figura 13B). Embora o padrão de redução da síntese de CE tenha sido semelhante em MCF-7 e MDA-MB-231, a combinação dos fármacos foi mais potente em MDA-MB-231, uma vez que 20 μ M de CDDP + 10 μ M de ATV reduziu em torno de 70% a síntese em MDA-MB-231, enquanto a mesma combinação reduziu em torno de 50% na linhagem MCF-7. Devido aos efeitos mais destacados do tratamento combinado em MDA-MB-231 e que a redução do teor de CE induzido pelo mesmo foi observada exclusivamente nesta linhagem, verificamos em seguida a magnitude da expressão de ACAT-1, HMGCR e LDLR na linhagem triplo-negativa após o tratamento combinado. De acordo com os achados anteriores que mostraram diminuição da esterificação do colesterol em MDA-MB-231, o tratamento concomitante com CDDP 20 μ M e ATV 1 μ M reduziu em 60% a expressão de ACAT-1 ($p < 0,0001$) e em 75% quando combinado com ATV 10 μ M ($p < 0,0001$) (Figura 13C). A combinação das duas drogas também inibiu a expressão de HMGCR (Figura 13D) e LDLR (Figura 13E) em 50% ($p < 0,0001$) em MDA-MB-231.

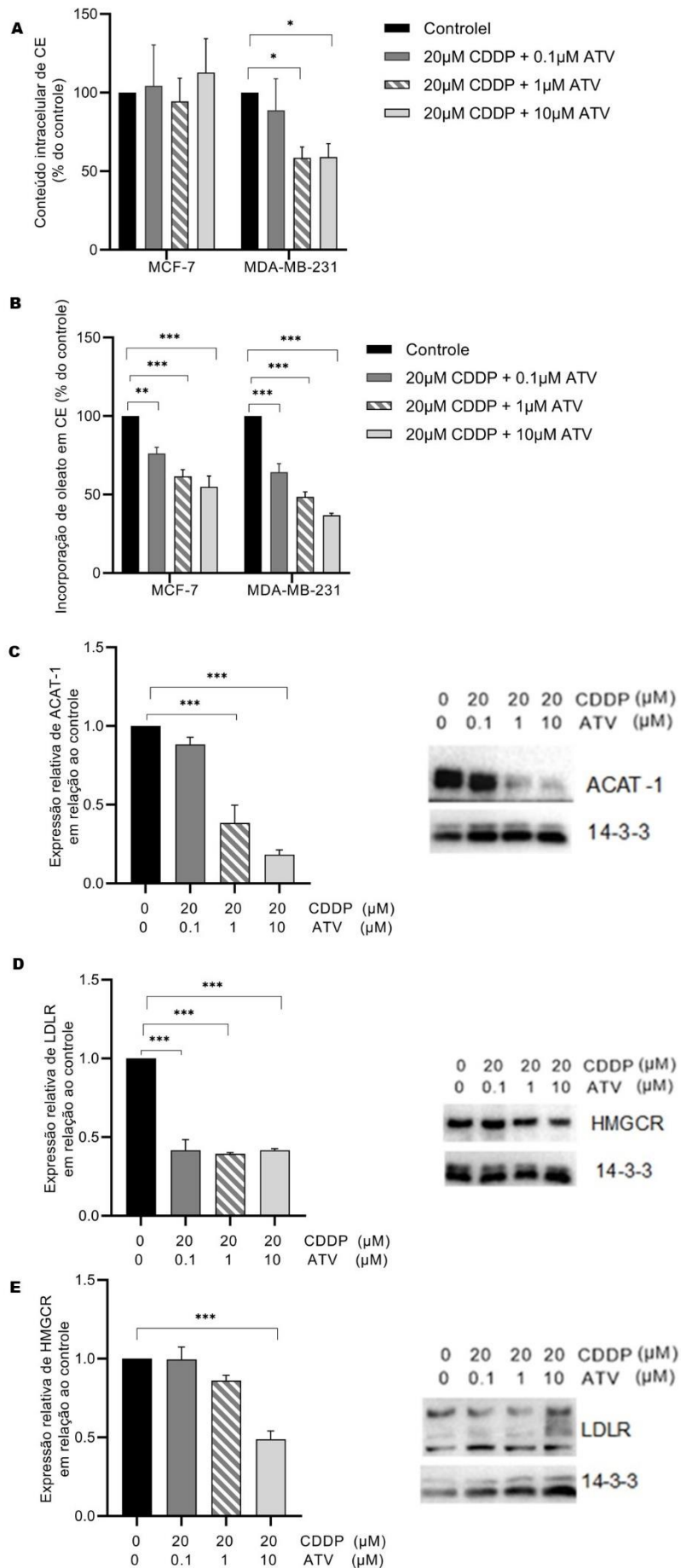


Figura 13: Modulação do metabolismo de CE em células de CAM após terapia combinada com CDDP e ATV. (A) conteúdo de CE e (B) esterificação de colesterol em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com CDDP (20 μ M) mais ATV (0,1 μ M, 1 μ M ou 10 μ M). Immunoblots representativos e quantificação densitométrica dos níveis de proteína (C) ACAT-1, (D) HMGCR e (E) LDLR em células MDA-MB-231 tratadas com o veículo solvente (controle) ou CDDP mais ATV (0,1 μ M, 1 μ M ou 10 μ M) Todos os valores densitométricos foram normalizados para 14-3-3. *p <0,05, ** p <0,005 e *** p <0,0001 indicam diferenças significativas em comparação com células não tratadas (controle).

Com o intuito de confirmar se o mecanismo de ação da combinação de ATV com CDDP era exclusivamente pela modulação do metabolismo do CE em detrimento de outras vias na linhagem MDA-MB-231, realizamos ensaio de Anexina-PI para avaliação de ocorrência de apoptose. Esse ensaio permite a classificação das células viáveis (anexina V FITC⁻ / PI⁻), apoptóticas em estágio inicial (anexina V FITC⁺ / PI⁻), apoptóticas em estágio avançado (anexina V FITC⁺ / PI⁺) e necróticas (anexina V FITC⁻ / PI⁺). As células foram tratadas com CDDP na concentração de IC₅₀ e/ou ATV na concentração de IC₅₀ e na concentração 100nM por 48h. O tratamento combinado não alterou de forma significativa a morte celular em nenhuma das condições testadas (Figura 14). Apenas uma pequena fração do total de células avaliadas foi afetada quando combinado os fármacos nas suas respectivas concentrações de IC₅₀, onde o 19,5% das células sofreram necrose, entretanto, essa indução não foi estatisticamente significativa. Desta forma, postula-se que o mecanismo antiproliferativo da terapia combinada está intimamente ligado comprometimento do metabolismo do colesterol no TNBC, em detrimento de outros mecanismos. Assim, o colesterol pode ser considerado componente chave na mudança metabólica que acompanha a progressão do TNBC.

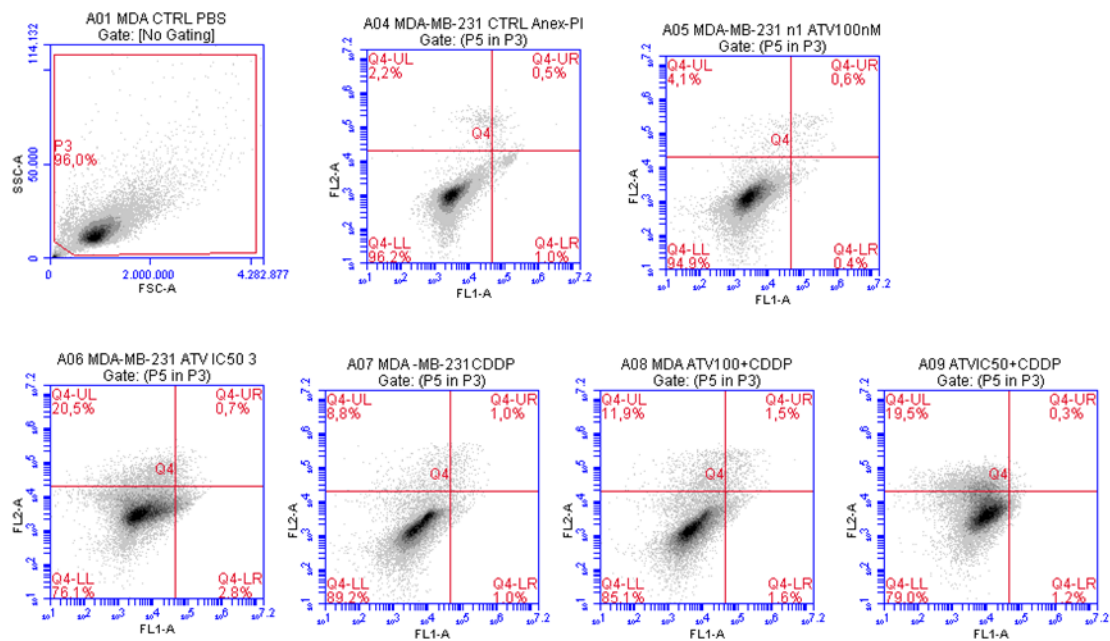


Figura 14: Avaliação de apoptose na linhagem MDA-MB-231 após tratamento com CDDP e ATV por 48h. A análise foi realizada através do ensaio de anexina V/PI. Figuras representativas de 1 experimento biológico.

4.6 A ATV RESENSIBILIZA A LINHAGEM RESISTENTE MDACR À CDDP

Para avaliar a relevância clínica dos nossos resultados, investigamos o efeito do tratamento combinado em linhagem celular resistente à CDDP gerada em nosso laboratório, MDACR, derivada de sua linhagem parental MDA-MB-231. A exposição crônica à CDDP induziu alterações fenotípicas em células MDACR que passaram a exibir fenótipo semelhante a fibroblasto, se comparado à sua linhagem parental MDA-MB-231 (Figura 15)

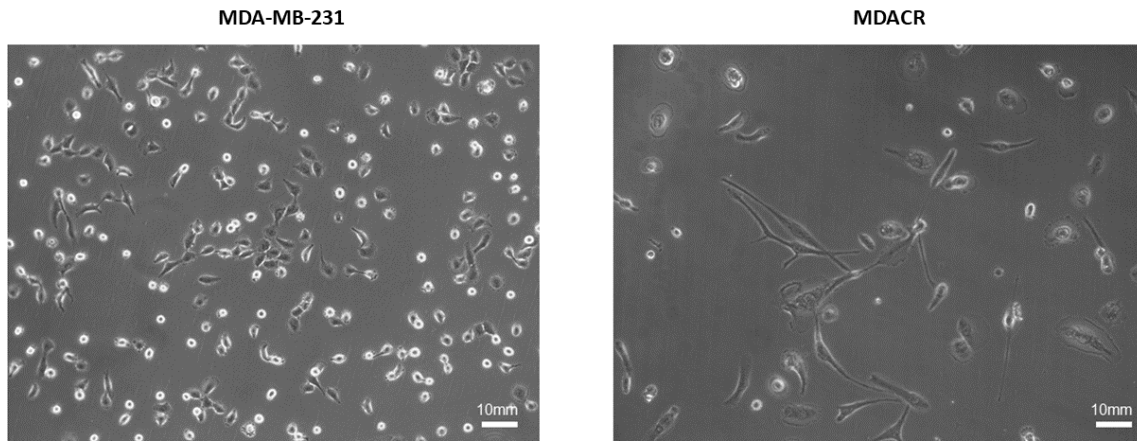


Figura 15: Imagem microscópica das linhagens celulares de TNBC, MDA-MB-231 e MDACR. Ampliação 10x. As barras de escala são de 10 mm.

A resistência à CDDP em MDACR em comparação com MDA-MB-231 foi comprovada por ensaios de VCM (Figura 16A). MDACR exibiu resistência de 5,1 a 11,7 vezes à CDDP e IC_{50} sete vezes maior ($88,2 \mu\text{M}$) do que a linhagem parental ($12,6 \mu\text{M}$) ($p < 0,0001$) (Figura 16A). MDACR também exibiu resistência cruzada a outros quimioterápicos utilizados clinicamente como paclitaxel (Figura 16B) e doxorrubicina (Figura 16C). Interessantemente, a linhagem resistente MDACR não apresentou resistência à ATV (Figura 16D).

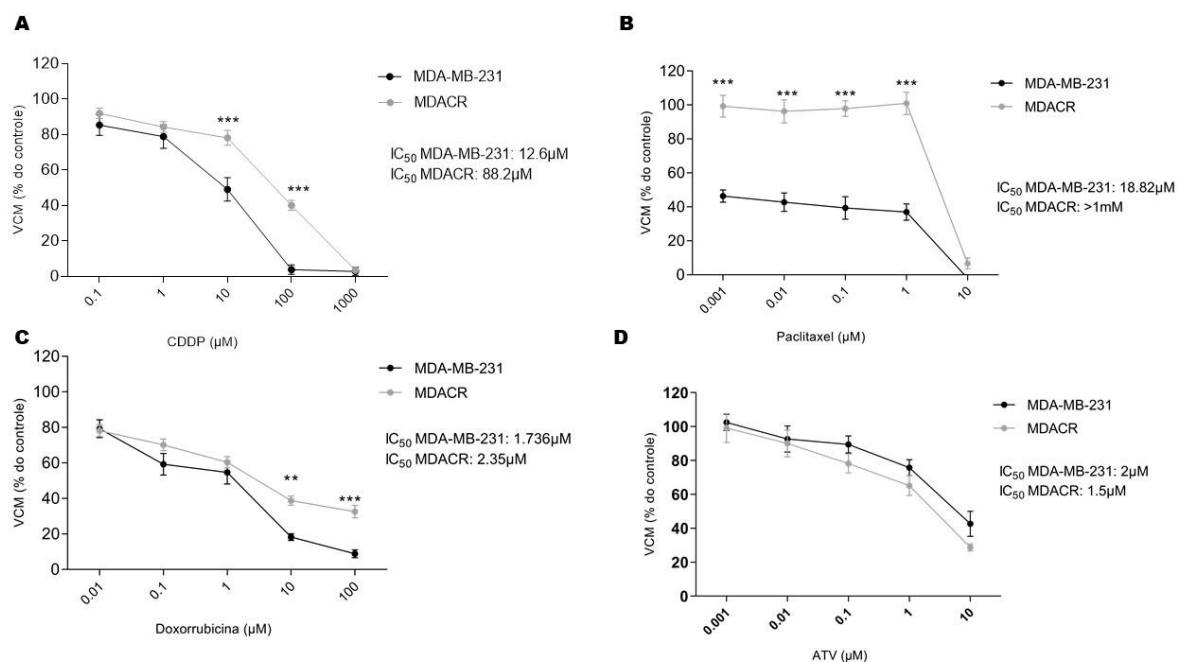


Figura 16: Avaliação da citotoxicidade de diversos fármacos nas linhagens MDA-MB-231 e MDACR. As células MDA-MB-231 e MDACR foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 ° C com 5% de CO₂. As células foram tratadas por 48h com (A) CDDP (0.1µM a 1000µM); (B) paclitaxel (0,001µM a 10µM); (C) doxorubicina (0,1µM a 100µM); (D) ATV (0.001µM a 10µM). O valor de IC₅₀ foi mensurado através de ensaio de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=3). *p < 0.05, **p < 0.005, e ***p < 0.0001 quando comparado ao mesmo tratamento na linhagem MDA-MB-231.

Explorando os mecanismos subjacentes de quimiorresistência, examinamos o perfil da expressão de ACAT-1 na linhagem MDACR que foi 2,5 vezes maior quando comparada à expressão na MDA-MB-231 (p<0,05) (Figura 17A). Posteriormente, argumentamos se ATV poderia modular a resistência adquirida à CDDP pelas células MDACR. Como pode ser observado nas Figuras 17B e C, a adição de ATV re-sensibilizou MDACR à CDDP de maneira dose-dependente. Vale enfatizar que este efeito foi visto mesmo utilizando a concentração empregada clinicamente como agente hipolipidêmico de ATV, 100nM.

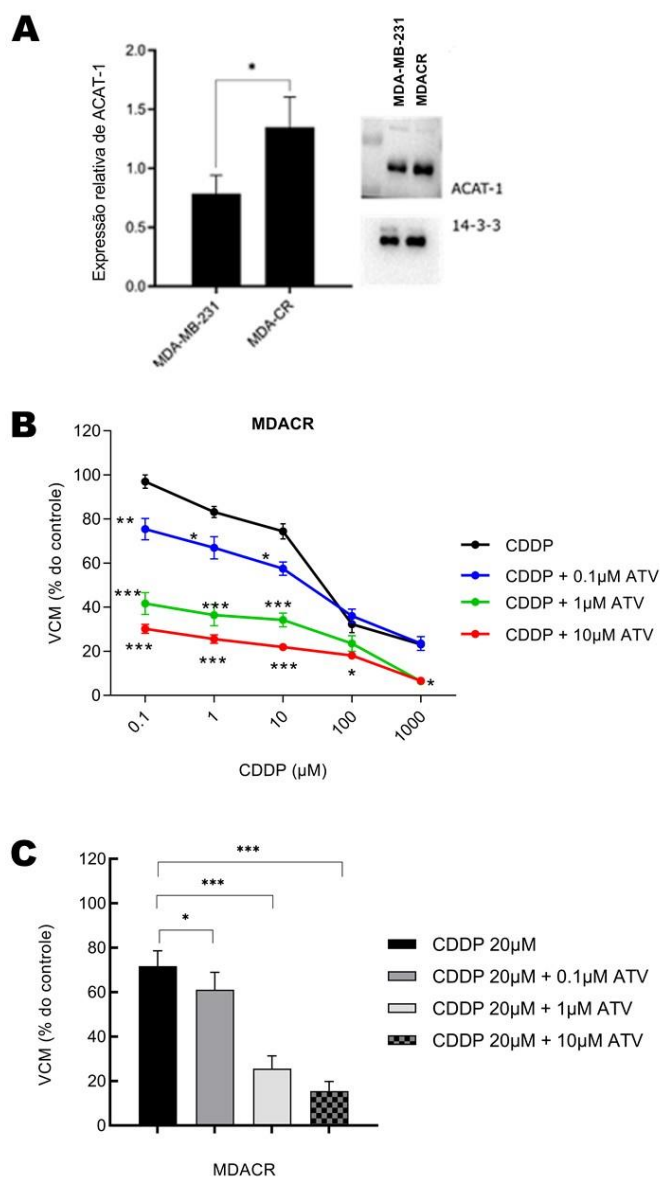


Figura 17: Efeito do tratamento combinado de CDDP com ATV na linhagem MDA-CR. (A) Análise da expressão de ACAT-1 nas células, submetidas em meio de cultivo padrão sem droga, foi determinada por Western Blot e imagem representativa de um ensaio foi utilizada. (B) A linhagem MDACR foi exposta a diferentes concentrações de CDDP e/ou combinada com ATV (0,1, 1 e 10µM) e a VCM foi analisada após 48h de tratamento. (C) A linhagem MDACR foi exposta a concentração constante de CDDP (20µM) e/ou combinada com ATV (0,1, 1 e 10µM) e a VCM foi analisada após 48h de tratamento. A análise estatística em A foi realizada usando teste-t não pareado, * $p < 0.05$ indica diferença de expressão entre as linhagens. A análise estatística em B e C foi realizada por ANOVA de duas vias com teste de comparações múltiplas de Sidak. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, e *** $p < 0.0001$ quando comparado ao tratamento somente com CDDP.

5 DISCUSSÃO

O CAM continua sendo o segundo câncer mais comum em todo o mundo e a quinta causa de morte por câncer na população mundial (OMS, 2020). Segundo dados do INCa, cada ano do triênio 2020-2022 tem risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres no Brasil, sendo a região Sudeste a de destaque, com risco estimado de 81,06 por 100 mil mulheres. Nesse contexto, verificou-se maior tendência do aumento de mortalidade por essa doença em todas as faixas etárias a partir de 30 anos no estado do Espírito Santo, enfatizando a importância do estudo dessa doença no estado (INCa 2020).

Um dos fatores relacionados ao controle da taxa de mortalidade de pacientes com CAM e da progressão da doença é a eficácia do tratamento. Ademais, a eficácia da quimioterapia é severamente limitada por causa da alta toxicidade para o paciente e da resistência inerente ou adquirida pelas células cancerosas, principalmente no subtipo TNBC (CAREY, Lisa A. et al., 2007; LIEDTKE et al., 2008; VENKITARAMAN, 2010). Desta forma, a magnitude e o impacto dessa malignidade ratificam a necessidade de novas estratégias terapêuticas no seu enfrentamento.

Atualmente, 23 ensaios clínicos estão explorando o uso de CDDP para tratar TNBC como agente único ou em combinação com outras terapias (ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>.) No entanto, mesmo após resposta inicial bem-sucedida à quimioterapia baseada em platina, as pacientes desenvolvem quimiorresistência à CDDP após a exposição crônica à substância. Tendo em vista essa circunstância, o colesterol é uma molécula lipídica de extrema importância visto que desempenha papel vital tanto em processos fisiológicos, bem como em processos patológicos. Já foi relatado que as células cancerosas apresentam aumento de colesterol nos microdomínios de membrana, que são essenciais para ligação de fatores de crescimento e ativação de diversas vias relacionadas à proliferação celular (LI, Ying Chun et al., 2006; PATRA, 2008). Seu metabolismo também foi correlacionado com o desenvolvimento da quimiorresistência em diferentes tipos de câncer. Brindisi e colaboradores verificaram que o tratamento com mevalonato e com colesterol aumentou a ativação da via de receptor alfa relacionada ao estrogênio (ERR α) nas células de CAM MCF-7 e MDA-MB-231, resultando em aumento da motilidade, proliferação celular e atividade mitocondrial (BRINDISI et al., 2020). Em outro estudo,

foi demonstrado que a pré-adição de concentrações crescentes de colesterol ao meio de cultura por 24h, reduziu a eficácia de CDDP e de paclitaxel em linhagens de câncer de ovário SKOV-3 e OVCAR-3, com consequente aumento da IC₅₀ (KIM, Soochi et al., 2018). Adicionalmente, o pré-tratamento com colesterol por 24h reduziu a quimiossensibilidade à CDDP e à carboplatina em células de câncer de pulmão A549, sendo o mecanismo sugerido a modulação da expressão do transportador vesicular ABCG2 (WU et al 2015). Nossos dados mostram que as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 respondem diferentemente à CDDP, sendo a linhagem triplo-negativa intrinsecamente mais resistente ao fármaco, especialmente em relação à VCM (Figura 8). O tratamento combinado de CDDP com ATV, foi mais eficaz e potente se comparado à CDDP em monoterapia em ambas as linhagens de CAM. Este foi o primeiro indício de que o metabolismo do colesterol pode estar relacionado à diferença de sensibilidade à CDDP nas linhagens.

Levando em consideração que a ATV apresenta efeito antineoplásico, especialmente em subtipos de CAM mais agressivos e com opções de tratamento mais limitadas como o TNBC, e dado o seu perfil de toxicidade limitado, seu baixo custo e a facilidade de uso, a associação de ATV com terapia convencional pode ter implicações importantes para o desfecho clínico das pacientes e para a saúde pública. Cumpre salientar que a adição de ATV aumentou a eficácia do tratamento mesmo utilizando concentrações baixas de CDDP (0,064µM), resultado de extrema importância, já que a toxicidade dos agentes antineoplásicos convencionais é dose-dependente e se deseja manter a eficácia do tratamento inalterada em detrimento do escalonamento da dose dos fármacos citotóxicos.

Vários estudos já abordaram a eficácia anticâncer das estatinas, entretanto usando concentrações suprafisiológicas dos medicamentos (variando de 20 a 150µM) cuja toxicidade sistêmica permanece desconhecida ou ainda com tempo de tratamento prologando (BECKWITT; SHIRAHA; WELLS, 2018; JONES et al., 2017). Um exemplo é o estudo de Raghu e colaboradores, no qual se analisou o efeito do tratamento por 6 dias com duas estatinas (ATV e rosuvastatina) em painel de linhagens derivadas de diferentes tipos de tumores sólidos a saber: CAM (HS-578T, T47D), câncer de ovário (IGROV1, OVCAR3), câncer de próstata (PC-3, DU-145), câncer de pulmão (HOP-92, NCI-H322M), melanoma (SK-MEL-5, MDA-MB-435) e câncer cerebral (SF-295, SF-539) (RAGHU et al., 2018). A linhagem de CAM T47D também representa CAM

luminal A, assim como a linhagem MCF-7, e a linhagem HS-578T é representativa do TNBC, assim como a MDA-MB-231. O tratamento com 10 μ M de ATV por 6 dias reduziu parcialmente o crescimento de T47D, e esta linhagem foi mais resistente ao tratamento com ATV e com rosuvastatina quando comparada à linhagem HS-578T. Cumpre destacar que, no estudo citado, a ATV foi mais eficaz que a rosuvastatina. Contradizendo os resultados citados, nossos dados de MTT com ATV foram mais promissores para a linhagem triplo-negativa se comparada a linhagem luminal A. Em consonância ao exposto, os resultados obtidos por Smith Chris e seu grupo revelaram que, tanto a ATV como outras estatinas utilizadas no estudo (rosuvastatina, pravastatina e sinvastatina), foram mais eficazes e potentes na redução da VCM da linhagem MDA-MB-231 se comparado à linhagem MCF-7 (SMITH et al., 2020). Vale ressaltar que o valor de IC₅₀ de ATV encontrado para a linhagem MDA-MB-231 (5.36 \pm 0.12 μ M) foi similar ao nosso achado. Adicionalmente, demonstramos que a CDDP combinada com baixas concentrações de ATV (0,1 a 10 μ M) induziu à inibição da proliferação celular e reduziu a VCM das células de CAM em uma magnitude maior do que quando usado sozinho, sugerindo, assim, papel da via do mevalonato na resposta à CDDP. Mesmo as estatinas sendo fármacos bem tolerados e de baixo risco, ainda há chance de ocorrência de efeitos adversos críticos para a descontinuidade do tratamento, como a rabdomiólise por exemplo. É sabido que a intensidade e o risco desse efeito podem ser proporcionais à dose utilizada (SIQUEIRA; FRANCALACCI; PEREIRA, 2008). Dessa forma, quando empregamos concentrações baixas de ATV, e ainda assim, continuamos a observar efeitos satisfatórios, esses resultados se tornam promissores quando prospectados para a clínica.

Devido a importância do metabolismo do colesterol no CAM, este tem sido direcionado no tratamento desta doença, conforme observado por estudos clínicos em andamento, sendo mais de 40 testando os efeitos das estatinas (clinicaltrials.gov). Destes, 14 estão avaliando os benefícios da ATV, dos quais dois são ensaios de fase 2 com pacientes com TNBC (clinicaltrials.gov, NCT03358017; NCT03872388) para investigar a atividade clínica antitumoral do ATV associada ao zoledronato e capecitabine, respectivamente. Entretanto, até o presente momento, poucos trabalhos na literatura descreveram efeito da combinação de ATV com CDDP em algum tipo de câncer. Estudo com a linhagem FaDu (representativa de câncer de cabeça e pescoço) mostrou efeito sinérgico e aditivo do tratamento concomitante de ATV com CDDP conjugada com

microbolhas de albumina (CDDP-MBs) (LIAO et al., 2021). Ainda, esse estudo enfatizou a importância da avaliação do curso temporal, em que a co-administração de ATV com a fármaco teve efeito citotóxico maior e mais significativo na proliferação celular do que o pré-tratamento com ATV. O mecanismo de ação postulado nesse estudo pela combinação de ATV com CDDP-MBs foi por redução dos níveis intracelular de glutathione que, segundo alguns estudos, está também relacionado com a resistência à CDDP (LIAO et al., 2021). Outro estudo que analisou ATV em combinação com CDDP foi o desenvolvido por GUO e colaboradores (GUO et al., 2020). Eles demonstraram que ATV 100 μ M combinada com CDDP inibiu de forma significativa a proliferação das linhagens HepG2 e Huh-7. Apesar de resultados positivos desses estudos, ressalta-se mais uma vez a discrepância entre as concentrações de ATV empregadas em experimentos, cuja toxicidade sistêmica permanece desconhecida, e aquelas detectadas no plasma humano de indivíduos hiperlipidêmicos.

Nas últimas décadas, muitos estudos mostraram que os medicamentos quimioterápicos podem levar a distúrbios metabólicos em pacientes, incluindo alterações nos lipídios e lipoproteínas séricas (ALEXOPOULOS et al., 1992; SHARMA et al., 2016a). Wang e colaboradores (2017) descobriram que camundongos tratados repetidamente com paclitaxel e CDDP tinham níveis circulantes de colesterol aumentados quando comparados aos medicamentos usados isoladamente. O colesterol livre da via do mevalonato e da fonte extracelular é convertido em CE pela ACAT-1 dentro da célula (MCNAMARA, 2005). Enquanto a exposição à CDDP diminuiu o grau de expressão da proteína LDLR em ambas as células estudadas no presente trabalho, uma redução nos níveis de HMGCR foi observada apenas em MDA-MB-231, sugerindo que o processo de síntese de colesterol e CE é dependente do subtipo de CAM.

Dada tendência de aumento da expressão de ACAT-1, concomitantemente com maior teor de CE após o tratamento com CDDP, postula-se que esta enzima desempenha papel importante no desencadeamento de alterações metabólicas nas células CAM, contribuindo para a alta taxa de proliferação de MDA-MB-231 e diferentes respostas à terapia anticâncer. Além disso, a redução da esterificação do colesterol após a exposição ao tratamento combinado de CDDP e ATV contra MDA-MB-231 resulta na

inibição de todas as proteínas-chave envolvidas na formação de CE, destacando a importância de melhorar a resposta da CDDP com ATV na luta contra TNBC.

Múltiplos mecanismos têm sido associados à aquisição do fenótipo quimiorresistente por células cancerosas, incluindo inativação do fármaco, efluxo de compostos ativos, supressão de apoptose, aumento do reparo de DNA (HILL et al., 2019) e, mais recentemente, aumento do conteúdo de CE em células tumorais (YAN et al., 2020). Na verdade, isso é bem documentado em câncer de próstata e de ovário. No entanto, o papel do metabolismo da CE na resistência à CDDP em células de CAM ainda é pouco explorado. Além disso, pacientes obesos são mais propensos a desenvolver CAM com piores desfechos clínicos do que pacientes não obesos tratados com protocolos citotóxicos idênticos (CASTILLO et al., 2016; MENTOOR et al., 2018). Assim, o colesterol e o CE têm papel crítico no microambiente tumoral, afetando o comportamento celular e a resposta à CDDP. Em conjunto com a diferença de sensibilidade à CDDP e as vias metabólicas distintas entre as linhagens estudadas, MCF-7 e MDA-MDA-231 apresentaram expressão diferencial de ACAT-1, LDLR e HMGCR (Figura 14). Além disso, as células de CAM parecem ter fonte de CE de origem distinta, de modo que a maior parte do suprimento de CE para TNBC vem da atividade de ACAT-1 e da superexpressão de LDLR, enquanto, em MCF-7, é principalmente fornecido por HMGCR. A homeostase do colesterol é regulada por mecanismos de feedback, pelos quais o colesterol livre ativa a enzima ACAT-1 que catalisa a esterificação e armazenamento do próprio colesterol, além da inibição do HMGCR (PRAMFALK; ERIKSSON; PARINI, 2012). Neste trabalho, também encontramos que o conteúdo de colesterol livre é 4,6 vezes maior no MDA-MB-231 quando comparado ao MCF-7 ($p < 0,005$) (Figura suplementar 1), corroborando com nossos outros achados. Além disso, as células TNBC, que são intrinsecamente resistentes à CDDP, apresentam maior conteúdo de CE do que MCF-7, corroborando com nossa hipótese de que a CE está envolvida na quimiorresistência. Ademais, nossas descobertas sugerem uma mudança metabólica em direção à produção de colesterol pelas células TNBC sob privação de colesterol (LPDS), permitindo que elas mantenham sua proliferação com eficiência nessa condição. Como as células TNBC superexpressam ACAT-1, é razoável supor que quando as células são cultivadas em LPDS, o CE é hidrolisado para produzir colesterol, reduzindo o pool de CE intracelular e sustentando a proliferação celular (Figura 10).

Estudos anteriores conduzidos por David de Gonzalo-Calvo (2015) em amostras de tecido tumoral demonstraram claramente uma correlação positiva entre o conteúdo de CE e piores parâmetros clínico-patológicos das pacientes, como a ocorrência de tumores de alto grau. Na verdade, as amostras de TNBC expressaram níveis mais elevados de LDLR e ACAT-1, bem como têm mais CE intratumoral do que amostras Luminal A (DE GONZALO-CALVO et al., 2015a). No entanto, nenhuma diferença na expressão do mRNA de HMGCR foi encontrada entre os subtipos de CAM pelos autores, divergindo do nosso estudo. Além disso, estudos anteriores de microarray também demonstraram que o CAM tipo basal superexpressa ACAT-1, corroborando assim com nossos resultados (FARMER et al., 2005; VAN DE VIJVER et al., 2002). No entanto, nossos dados apontam para o fato de que a expressão de ACAT-1 é maior no MDA-MB-231 cronicamente exposto ao tratamento com CDDP (MDACR), mimetizando o que ocorre na clínica. Notavelmente, o ATV ressensibiliza as células MDACR à CDDP.

Três estudos demonstraram o efeito de altas doses de ATV na quimiossensibilidade da CDDP 20 μ M (FROMIGUÉ; HAMIDOUICHE; MARIE, 2008; GUO et al., 2020; LIAO et al., 2021). Fromigue e colaboradores sugeriram que a ATV aumenta a sensibilidade ao fármaco por meio da modulação da metaloprotease 2 da matriz celular em células de osteossarcoma. Por outro lado, Guo e colaboradores mostraram que as células cancerígenas do fígado (Huh-7) se tornam mais sensíveis à CDDP quando 100 μ M de ATV é adicionada ao tratamento, resultando na atenuação da expressão do oncogene YAP1 (GUO et al., 2020). Vale ressaltar que as estatinas em altas doses podem não ser seguras para o paciente (MATUSEWICZ; CZOGALLA; SIKORSKI, 2020). Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a correlacionar a modulação da expressão de ACAT-1 pela CDDP mais ATV em células MDA-MB-231, utilizando uma faixa baixa de concentração de ATV. Além disso, nosso estudo é o primeiro a mostrar a importância dessa proteína na aquisição do fenótipo quimiorresistente à CDDP pelas células TNBC.

Estamos cientes da fragilidade de nosso estudo em relação à falta de elucidação sobre a modulação de ACAT-1 pelo tratamento combinado de MDACR com ATV e CDDP e o mecanismo molecular do tratamento de ATV mais CDDP pela via de esterificação CE. No entanto, ele aponta fortemente para o mecanismo suposto dependente de

ACAT-1 na resistência à CDDP no TNBC e mostra que o ATV ressensibiliza às células ao fármaco.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados mostram que o aumento da expressão do conteúdo de ACAT-1 e CE pode contribuir para o fenótipo agressivo de TNBC. A adição de ATV ao tratamento de CDDP reduziu significativamente a proliferação celular e a viabilidade do TNBC por dois mecanismos principais: redução da expressão de ACAT-1 e redução da esterificação do colesterol e do conteúdo de CE. As células resistentes à CDDP, MDACR, expressam níveis mais elevados de ACAT-1 do que sua parental, sugerindo fortemente que ACAT-1 provavelmente medeia a resistência ao fármaco em TNBC, embora tenha necessidade de investigação mais aprofundada do mecanismo. A ATV mostrou restaurar a eficácia terapêutica da CDDP em células MDACR. Portanto, a ATV surge como uma ferramenta terapêutica potencial contra o TNBC. É relevante observar que, nas condições exploradas neste estudo, não se pode negligenciar que a ATV é uma opção de baixa toxicidade para terapia adjuvante com TNBC, além de um fármaco seguro e com boa relação custo-benefício.

7 PERSPECTIVAS

Dada a relevância clínica do presente estudo, pretendemos prosseguir com as investigações da aplicabilidade de ATV no TNBC, conforme descrito a seguir:

- Finalizar a caracterização da linhagem resistente MDACR em relação a expressão das outras proteínas relacionadas ao metabolismo de colesterol e CE (HMGR, LDLR)
- Avaliar o regime combinado de CDDP com ATV na modulação da expressão das proteínas estudadas em células MDACR
- Confirmar a descoberta em modelos de estudo *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFIZ, Hany. Epigenetic Mechanisms of Tamoxifen Resistance in Luminal Breast Cancer. **Diseases**, v. 5, n. 3, p. 16, 6 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-9721/5/3/16>>.
- ABE, RIKIYA et al. Biological Characteristics of Breast Cancer in Obesity. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 120, n. 4, p. 351–359, 1976. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem1920/120/4/120_4_351/_article>.
- ACHEAMPONG, Teofilia et al. Incidence Trends of Breast Cancer Molecular Subtypes by Age and Race/Ethnicity in the US From 2010 to 2016. **JAMA Network Open**, v. 3, n. 8, p. e2013226, 17 ago. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2769316>>.
- AFONSO, Milessa Silva et al. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 760, 13 jun. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/10/6/760>>.
- AHERN, Thomas P et al. Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 10, p. e461–e468, set. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204514701196>>.
- AL-AZRI, Mohammed et al. Psychosocial Impact of Breast Cancer Diagnosis Among Omani Women. **Oman Medical Journal**, v. 29, n. 6, p. 437–444, 15 nov. 2014. Disponível em: <http://www.omjournal.org/fulltext_PDF.aspx?DetailsID=590&type=fulltext>.
- AL-THOUBAITY, Fatma Khinaifis. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 49, p. 44–48, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S204908011930192X>>.
- ALDOSSARY, Sara A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 07–15, 28 mar. 2019. Disponível em: <<http://biomedpharmajournal.org/vol12no1/review-on-pharmacology-of-cisplatin-clinical-use-toxicity-and-mechanism-of-resistance-of-cisplatin/>>.
- ALEXOPOULOS, C. G. et al. Changes in serum lipids and lipoproteins in cancer patients during chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 30, n. 5, p. 412–416, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00689971>>.
- ALLURI, Prasanna; NEWMAN, Lisa A. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 567–77, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882351>>.
- ANOTHAISINTAWEE, Thunyarat et al. Effect of Lipophilic and Hydrophilic Statins on Breast Cancer Risk in Thai Women: A Cross-sectional Study. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 9, p. 1163–1168, 2016. Disponível em: <<http://www.jcancer.org/v07p1163.htm>>.
- ARIMIDEX, TAMOXIFEN, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group et al.

Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. **The Lancet. Oncology**, v. 9, n. 1, p. 45–53, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083636>>.

BAANDRUP, L et al. Statin use and risk for ovarian cancer: a Danish nationwide case–control study. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 1, p. 157–161, 13 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc2014574>>.

BADANA, Anil et al. Lipid Raft Integrity Is Required for Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells. **Journal of Breast Cancer**, v. 19, n. 4, p. 372, 2016. Disponível em: <<https://ejbc.kr/DOIx.php?id=10.4048/jbc.2016.19.4.372>>.

BAEK, Dong Won et al. Impressive effect of cisplatin monotherapy on a patient with heavily pretreated triple-negative breast cancer with poor performance. **Yeungnam University Journal of Medicine**, v. 37, n. 3, p. 230–235, 31 jul. 2020. Disponível em: <<http://e-yujm.org/journal/view.php?doi=10.12701/yujm.2019.00423>>.

BARBALATA, Cristina I et al. Statins in risk-reduction and treatment of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 8, p. 573–588, 24 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v11/i8/573.htm>>.

BARECHE, Y et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 895–902, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29365031>>.

BECKWITT, Colin H.; SHIRAHARA, Keisuke; WELLS, Alan. Lipophilic statins limit cancer cell growth and survival, via involvement of Akt signaling. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197422, 15 maio 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0197422>>.

BEDI, Onkar et al. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 7, p. 695–712, 5 jul. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00210-016-1252-4>>.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S; VASSEUR, S; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e189–e189, 25 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/oncsis201549>>.

BENGTSSON, Erik et al. HMG-CoA reductase expression in primary colorectal cancer correlates with favourable clinicopathological characteristics and an improved clinical outcome. **Diagnostic Pathology**, v. 9, n. 1, p. 78, 2014. Disponível em: <<http://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1596-9-78>>.

BLUM, A.; SHAMBUREK, R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 2, p. 325–330, abr. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915008006059>>.

BONSU, Kwadwo Osei; REIDPATH, Daniel Diamond; KADIRVELU, Amudha. Effects of Statin Treatment on Inflammation and Cardiac Function in Heart Failure: An Adjusted Indirect Comparison Meta-Analysis of Randomized Trials. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 33, n. 6, p. 338–346, dez. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-5922.12150>>.

BORGES, Tatiane Oliveira et al. Avaliação da taxa de positividade do receptor HER2 e da influência de três tipos de biópsia mamária no resultado imunohistoquímico em mulheres com câncer de mama invasivo no Hospital Universitário de Brasília. **Rev Bras Mastologia**, v. 22, n. 3, p. 83–89, 2012.

BRANDI, Jessica et al. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 310–322, jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916304419>>.

BRASÓ-MARISTANY, Fara et al. Phenotypic changes of HER2-positive breast cancer during and after dual HER2 blockade. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 385, 20 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-019-14111-3>>.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>>.

BRAY, Freddie; MCCARRON, Peter; PARKIN, D Maxwell. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 229, 26 dez. 2004. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr932>>.

BRINDISI, Matteo et al. Cholesterol and Mevalonate: Two Metabolites Involved in Breast Cancer Progression and Drug Resistance through the ER α Pathway. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1819, 31 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/8/1819>>.

BROWN, Michael S.; RADHAKRISHNAN, Arun; GOLDSTEIN, Joseph L. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 783–807, 20 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-062917-011852>>.

BUCHTA ROSEAN, Claire et al. Preexisting Commensal Dysbiosis Is a Host-Intrinsic Regulator of Tissue Inflammation and Tumor Cell Dissemination in Hormone Receptor–Positive Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 14, p. 3662–3675, 15 jul. 2019. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-18-3464>>.

BURKBAUER, Laura et al. Obesity and Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 231, n. 4, p. S38–S39, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751520305925>>.

CAREY, L. A. et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329–2334, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>>.

CAREY, Lisa A. et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329–2334, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>>.

CAREY, Lisa A et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 21, p. 2615–23, 20 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665533>>.

CASTILLO, Jorge J. et al. Relationship between obesity and clinical outcome in adults with acute myeloid leukemia: A pooled analysis from four CALGB (alliance) clinical trials. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 2, p. 199–204, fev. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.24230>>.

CEDRAZ, Isaac Santiago; LAVORATO, Stefânia Neiva. Fármacos utilizados no tratamento de hipercolesterolemia: uma análise histórica e químico-medicinal. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 8983–9004, 2020a. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/13689/11461>>.

_____. Fármacos utilizados no tratamento de hipercolesterolemia: uma análise histórica e químico-medicinal. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 8983–9004, 2020b.

CHAN, Kelvin K W; OZA, Amit M; SIU, Lillian L. The statins as anticancer agents. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 10–9, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538446>>.

CHEANG, Maggie C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 20 maio 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djp082>>.

CHEN, Sheng et al. Obesity or Overweight Is Associated with Worse Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy among Chinese Women with Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41380, 25 jul. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041380>>.

CILLA, Donald D. et al. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 60, n. 6, p. 687–695, dez. 1996. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1016/S0009-9236\(96\)90218-0](http://doi.wiley.com/10.1016/S0009-9236(96)90218-0)>.

CLAVEL-CHAPELON, F; GERBER, M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? **Breast cancer research and treatment**, v. 72, n. 2, p. 107–15, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038701>>.

COLLETT, K. A Basal Epithelial Phenotype Is More Frequent in Interval Breast Cancers Compared with Screen Detected Tumors. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 5, p. 1108–1112, 1 maio 2005. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-04-0394>>.

D'AQUILA, Theresa; ZEMBROSKI, Alyssa S.; BUHMAN, Kimberly K. Diet Induced Obesity Alters Intestinal Cytoplasmic Lipid Droplet Morphology and Proteome in the Postprandial Response to Dietary Fat. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 5 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.00180/full>>.

DALHAIMER, Paul. Lipid Droplets in Disease. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 974, 26 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/974>>.

DARVIN, Pramod et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, p. 1–11, 13 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s12276-018-0191-1>>.

DE GONZALO-CALVO, David et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 460, 9 dez. 2015a. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1469-5>>.

_____. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 460, 9 dez. 2015b. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1469-5>>.

DE TALHOUE, Solene et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7073, 27 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-020-63759-1>>.

DEES, Sundee et al. Emerging CAR-T Cell Therapy for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 12, p. 2409–2421, dez. 2020. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-20-0385>>.

DEGRAFF, William G.; MITCHELL, James B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity. **Cancer Research**, v. 47, n. 4, p. 943–946, 1987.

DENT, R. et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 1 ago. 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>>.

DESMEDT, Christine et al. Differential Benefit of Adjuvant Docetaxel-Based Chemotherapy in Patients With Early Breast Cancer According to Baseline Body Mass Index. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 25, p. 2883–2891, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.19.01771>>.

DIGNAM, J. J. Obesity, Tamoxifen Use, and Outcomes in Women With Estrogen Receptor-Positive Early-Stage Breast Cancer. **CancerSpectrum Knowledge Environment**, v. 95, n. 19, p. 1467–1476, 1 out. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djg060>>.

DITSCH, Nina et al. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2019. **Breast Care**, v. 14, n. 4, p. 224–245, 2019. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/501000>>.

DOGRA, Atika; MEHTA, Anurag; DOVAL, Dinesh Chandra. Are Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancers Really Different? **Journal of Oncology**, v. 2020, p. 1–9, 16 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jo/2020/4061063/>>.

DOS SANTOS GUIMARÃES, Isabella et al. Chemosensitizing effects of metformin on cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 409–417, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734114017304188>>.

DUIJF, Pascal H.G. et al. Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 7, p. 595–611, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491419300905>>.

DULAK, Józef; JÓZKOWICZ, Alicja. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. **Current cancer drug targets**, v. 5, n. 8, p. 579–94, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1391922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ECKSTEIN, Niels. Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 91, 4 dez. 2011. Disponível em: <<https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-30-91>>.

ENDO, Akira. A historical perspective on the discovery of statins. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 5, p. 484–493, 2010. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/86/5/86_5_484/_article>.

ENDO, Akira. Discovery and Development of Statins. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 8, p. 1934578X1701200, 1 ago. 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1701200801>>.

FAIROOZY, Roaa Hani et al. Identifying LDL-C associated variants in the Annexin a2 (ANXA2) gene. **Atherosclerosis**, v. 263, p. e20, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915017303398>>.

FALLONE, Frédérique et al. Cancer du sein, obésité et tissu adipeux. **médecine/sciences**, v. 34, n. 12, p. 1079–1086, 9 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/2018298>>.

FARMER, Pierre et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660–4671, 9 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1208561>>.

FARWELL, W. R. et al. The Association Between Statins and Cancer Incidence in a Veterans Population. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 2, p. 134–139, 16 jan. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djm286>>.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, p. ijc.31937, 6 dez. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.31937>>.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FOLLET, J et al. The association of statins and taxanes: an efficient combination trigger of cancer cell apoptosis. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 4, p. 685–692,

fev. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc20126>>.

FROMIGUÉ, Olivia; HAMIDOUCHE, Zahia; MARIE, Pierre J. Statin-Induced Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Sensitizes Human Osteosarcoma Cells to Anticancer Drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 2, p. 595–600, maio 2008. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.108.136127>>.

GAARD, Maria; TRETLLI, Steinar; URDAL, Petter. Risk of breast cancer in relation to blood lipids: a prospective study of 31,209 Norwegian women. **Cancer Causes & Control**, v. 5, n. 6, p. 501–509, nov. 1994. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01831377>>.

GALLAGHER, E J et al. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. **Oncogene**, v. 36, n. 46, p. 6462–6471, nov. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/onc2017247>>.

GALLAGHER, Emily J. et al. Abstract 1004: LDLR knockdown reduces the growth of Her2 overexpressing breast cancer in mouse models of hyperlipidemia. 1 jul. 2017, [S.l.]: American Association for Cancer Research, 1 jul. 2017. p. 1004–1004. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2017-1004>>.

GARUTTI, Mattia et al. Platinum salts in patients with breast cancer: A focus on predictive factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 2019.

GIRÓ-PERAFITA, Ariadna et al. Preclinical Evaluation of Fatty Acid Synthase and EGFR Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 18, p. 4687–4697, 15 set. 2016. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-3133>>.

GLUCHOWSKI, Nina L. et al. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 343–355, 21 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.32>>.

GÖBEL, Andy et al. Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1873, n. 2, p. 188351, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X1930174X>>.

GONG, Yue et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 51-64.e9, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413120305453>>.

GREIFE, Annemarie et al. Establishment and characterization of a bladder cancer cell line with enhanced doxorubicin resistance by mevalonate pathway activation. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3293–3300, 8 maio 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-014-2959-9>>.

GREWAL, Thomas et al. Desialylated LDL uptake in human and mouse macrophages can be mediated by a lectin receptor. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 151–163, mar. 1996. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021915095057153>>.

GUO, Liwen et al. Atorvastatin potentiates the chemosensitivity of human liver cancer cells to cisplatin via downregulating YAP1. **Oncology Letters**, v. 21, n. 2, p. 82, 1 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.12343>>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: The next generation. Cell**. [S.l: s.n.], 2011

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616318918>>.

HAUGNES, H.S. et al. Components of the metabolic syndrome in long-term survivors of testicular cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 2, p. 241–248, fev. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419375969>>.

HEGEDŰS, Csaba; VIRÁG, László. Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: Relevance to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 2, p. 978–982, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231714000937>>.

HENRIQUES, Taciane Barbosa et al. Inhibition of CXCR2 plays a pivotal role in re-sensitizing ovarian cancer to cisplatin treatment. **Aging**, v. 13, n. 10, p. 13405–13420, 31 maio 2021. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.203074>>.

HENSLEE, Austin B.; STEELE, Timothy A. Combination statin and chemotherapy inhibits proliferation and cytotoxicity of an aggressive natural killer cell leukemia. **Biomarker Research**, v. 6, n. 1, p. 26, 9 dez. 2018. Disponível em: <<https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-018-0140-0>>.

HERSHEY, Benjamin J. et al. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 87, 29 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/9/1/87>>.

HEUER, Timothy S. et al. FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Ex. **EBioMedicine**, v. 16, p. 51–62, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396416305916>>.

HILL, David P. et al. Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: Multiple mechanisms of resistance. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

HINZEY, Adam et al. Breast cancer and social environment: getting by with a little help from our friends. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 54, 26 dez. 2016. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-016-0700-x>>.

HOY, Andrew J.; NAGARAJAN, Shilpa R.; BUTLER, Lisa M. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity. **Nature Reviews Cancer**, 20 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41568-021-00388-4>>.

HUANG, Binlu; SONG, Bao liang; XU, Chenqi. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 132–141, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42255-020-0174-0>>.

HUBALEK, Michael; CZECH, Theresa; MÜLLER, Hannes. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. **Breast Care**, v. 12, n. 1, p. 8–14, 2017. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/455820>>.

HULTSCH, Susanne et al. Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 850, 24 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4757-z>>.

HØYER, Annette Pernille; ENGHOLM, Gerda. Serum lipids and breast cancer risk: a cohort study of 5,207 Danish women. **Cancer Causes and Control**, v. 3, n. 5, p. 403–408, set. 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00051352>>.

IGNATIADIS, Michail; SOTIRIOU, Christos. Luminal breast cancer: from biology to treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 9, p. 494–506, 23 set. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2013.124>>.

IKONEN, Elina. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 125–138, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2336>>.

INIC, Zorka et al. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 8, p. CMO.S18006, 11 jan. 2014. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/CMO.S18006>>.

INWALD, E. C. et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 2, p. 539–552, 16 jun. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-013-2560-8>>.

IORFIDA, Monica et al. Invasive lobular breast cancer: subtypes and outcome. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 2, p. 713–723, 8 jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-012-2002-z>>.

JÄÄSKELÄINEN, Anniina et al. High Parity Predicts Poor Outcomes in Patients With Luminal B-Like (HER2 Negative) Early Breast Cancer: A Prospective Finnish Single-Center Study. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 14 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.01470/full>>.

JOHANSSON, Anna L.V. et al. Breast cancer-specific survival by clinical subtype after 7 years follow-up of young and elderly women in a nationwide cohort. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 6, p. 1251–1261, 15 mar. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31950>>.

JOHNSON, J. A. et al. Diabetes and cancer (1): evaluating the temporal relationship between type 2 diabetes and cancer incidence. **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1607–1618, 4 jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00125-012-2525-1>>.

JONES, Hannah M. et al. Atorvastatin exhibits anti-tumorigenic and anti-metastatic effects in ovarian cancer in vitro. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n.

12, p. 2478–2490, 2017.

JORDAN, Craig T.; GUZMAN, Monica L.; NOBLE, Mark. Cancer Stem Cells. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 12, p. 1253–1261, 21 set. 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra061808>>.

KHOURY, Adonice et al. Pertuzumab and trastuzumab infusion related cytokine release syndrome in a chemotherapy naive patient with metastatic breast cancer. **The Breast Journal**, v. 24, n. 3, p. 383–384, maio 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tbj.12943>>.

KIM, Soochi et al. Activation of LXR α/β by cholesterol in malignant ascites promotes chemoresistance in ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1232, 10 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-5152-5>>.

KIM, Yeonju et al. Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol and Breast Cancer Risk by Menopausal Status, Body Mass Index, and Hormonal Receptor in Korea. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 2, p. 508–515, fev. 2009. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-08-0133>>.

KOREN, Michael J.; FELDMAN, Theodore; MENDES, Robert A. Impact of High-Dose Atorvastatin in Coronary Heart Disease Patients Age 65 to 78 Years. **Clinical Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 256–263, maio 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clc.20448>>.

KORKMAZ, A.; TOPAL, T.; OTER, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 303–312, 15 set. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10565-006-0078-0>>.

KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B et al. Cancer drug development: The missing links. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 8, p. 663–689, 8 maio 2019. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370219839163>>.

LAKE, Diana E; HUDIS, Clifford A. High-Dose Chemotherapy in Breast Cancer. **Drugs**, v. 64, n. 17, p. 1851–1860, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2165/00003495-200464170-00001>>.

LALLOO, F; EVANS, D G. Familial Breast Cancer. **Clinical Genetics**, v. 82, n. 2, p. 105–114, ago. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.2012.01859.x>>.

LARSSON, Susanna C.; MANTZOROS, Christos S.; WOLK, Alicja. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 4, p. 856–862, 15 ago. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22717>>.

LEHMANN, Brian D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 16 jun. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157368>>.

LI, Changkun et al. Systematic review and meta-analysis suggest that dietary

cholesterol intake increases risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 36, n. 7, p. 627–635, jul. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531716300264>>.

LI, Hsin-Hua; LIN, Chih-Li; HUANG, Chien-Ning. Neuroprotective effects of statins against amyloid β -induced neurotoxicity. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 2, p. 198, 2018. Disponível em: <<http://www.nrronline.org/text.asp?2018/13/2/198/226379>>.

LI, Man et al. Enhanced chemo-immunotherapy against melanoma by inhibition of cholesterol esterification in CD8+ T cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 8, p. 2541–2550, nov. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963418305124>>.

LI, Ying Chun et al. Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 1107–1118, abr. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010626909>>.

LIAO, Ai-Ho et al. Synergistic effects of combined treatment with ultrasound-mediated cisplatin-loaded microbubbles and atorvastatin on head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 43, n. 1, p. 15–26, 21 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.26445>>.

LIEDTKE, Cornelia et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1275–1281, 10 mar. 2008. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.14.4147>>.

LIGIBEL, Jennifer. Obesity and breast cancer. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 25, n. 11, p. 994–1000, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22106549>>.

LLAVERIAS, Gemma et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 1, p. 402–12, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224077>>.

LOFTERØD, Trygve et al. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 654, 15 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4568-2>>.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc1074>>.

LONGO, Joseph et al. Statins as Anticancer Agents in the Era of Precision Medicine. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 22, p. 5791–5800, 15 nov. 2020. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-20-1967>>.

LU, Han-hong et al. [Effects of anastrozole on lipid metabolism in Chinese postmenopausal women with breast cancer]. **Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]**, v. 33, n. 7, p. 520–5, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093630>>.

LUQUE-BOLIVAR, Andrea et al. Resistance and Overcoming Resistance in Breast

Cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. Volume 12, p. 211–229, nov. 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/resistance-and-overcoming-resistance-in-breast-cancer-peer-reviewed-article-BCTT>>.

MA, Xingzhe et al. Cholesterol Induces CD8+ T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 143- 156.e5, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311930186X>>.

MALHOTRA, Gautam K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 15 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.10.10.13879>>.

MARUPUDI, Neena I et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, n. 5, p. 609–621, 18 set. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14740338.6.5.609>>.

MASUDA, Takaaki et al. Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. **Cancer Science**, v. 111, n. 4, p. 1039–1046, 11 abr. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.14318>>.

MATUSEWICZ, Lucyna; CZOGALLA, Aleksander; SIKORSKI, Aleksander F. Attempts to use statins in cancer therapy: An update. **Tumor Biology**, v. 42, n. 7, p. 101042832094176, 14 jul. 2020. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428320941760>>.

MAUGHAN, Karen L; LUTTERBIE, Mark A; HAM, Peter S. Treatment of breast cancer. **American family physician**, v. 81, n. 11, p. 1339–46, 1 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521754>>.

MCNAMARA, D.J. CHOLESTEROL | Sources, Absorption, Function and Metabolism. **Encycl. Hum. Nutr.** [S.l.]: Elsevier, 2005. p. 379–385. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122266943000570>>.

MELVIN, Jennifer C. et al. Lipid Profiles and Risk of Breast and Ovarian Cancer in the Swedish AMORIS Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 21, n. 8, p. 1381–1384, ago. 2012. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-12-0188>>.

MENESES-SALAS, Elsa et al. Annexin A6 modulates TBC1D15/Rab7/StARD3 axis to control endosomal cholesterol export in NPC1 cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 2839–2857, 29 jul. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-019-03330-y>>.

MENTOOR, Ilze et al. Chemoresistance: Intricate Interplay Between Breast Tumor Cells and Adipocytes in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 11 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00758/full>>.

MIGLIORETTI, Diana L. et al. Radiation-Induced Breast Cancer Incidence and Mortality From Digital Mammography Screening. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 4, p. 205, 16 fev. 2016. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/M15-1241>>.

MILLER, Todd W et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast

cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 7, p. 2406–13, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530877>>.

MOLLINEDO, Faustino; GAJATE, Consuelo. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 5, p. 611–635, maio 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520436132>>.

MORGAN, Steve et al. The cost of drug development: A systematic review. **Health Policy**, v. 100, n. 1, p. 4–17, abr. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168851010003659>>.

MOSERLE, Lidia et al. Side population and cancer stem cells: Therapeutic implications. **Cancer Letters**, v. 288, n. 1, p. 1–9, fev. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383509003723>>.

MYLAVARAPU, Sanghamitra; DAS, Asmita; ROY, Monideepa. Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 5 fev. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00016/full>>.

NAGARAJAN, Shilpa R.; BUTLER, Lisa M.; HOY, Andrew J. The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism. **Cancer & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 2, 7 dez. 2021. Disponível em: <<https://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40170-020-00237-2>>.

NELSON, Erik R. The significance of cholesterol and its metabolite, 27-hydroxycholesterol in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 466, p. 73–80, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720717305063>>.

NEWSHOLME, E. A.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M. S. M. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. **Bioscience Reports**, v. 5, n. 5, p. 393–400, 1 maio 1985. Disponível em: <<https://portlandpress.com/bioscirep/article/5/5/393/55511/The-role-of-high-rates-of-glycolysis-and-glutamine>>.

NI, Haibo; LIU, Huixiang; GAO, Rong. Serum Lipids and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142669, 10 nov. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0142669>>.

NISHIBORI, Masahiro. The Anti-tumor Activities of Statins. **Current Oncology**, v. 14, n. 6, p. 246–247, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.current-oncology.com/index.php/oncology/article/view/153/159>>.

NISHIMURA, REIKI et al. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 5, p. 747–754, 2010. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2010.133>>.

NOWAK, Christoph; ÄRNLÖV, Johan. A Mendelian randomization study of the effects of blood lipids on breast cancer risk. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3957, 27 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-018-06467-9>>.

O'ROURKE, L.; YEAMAN, S. J.; SHEPHERD, P. R. Insulin and Leptin Acutely Regulate Cholesterol Ester Metabolism in Macrophages by Novel Signaling Pathways. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 955–961, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.50.5.955>>.

OSBORNE, C. Kent; SCHIFF, Rachel. Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 62, n. 1, p. 233–247, 18 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-070909-182917>>.

OUN, Rabbab; MOUSSA, Yvonne E.; WHEATE, Nial J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645–6653, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8DT00838H>>.

OUYANG, Mao et al. MicroRNA Profiling Implies New Markers of Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96228, 2 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0096228>>.

PAJARES, Bella et al. Obesity and survival in operable breast cancer patients treated with adjuvant anthracyclines and taxanes according to pathological subtypes: a pooled analysis. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. R105, 6 dez. 2013. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3572>>.

PALUMBO, Antonio et al. International Myeloma Working Group Consensus Statement for the Management, Treatment, and Supportive Care of Patients With Myeloma Not Eligible for Standard Autologous Stem-Cell Transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 6, p. 587–600, 20 fev. 2014. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.48.7934>>.

PANDIT, Prakash et al. Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Single Institutional Experience of 2062 Patients. **European Journal of Breast Health**, v. 16, n. 1, p. 39–43, 11 mar. 2020. Disponível em: <http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_41938/ejbh-16-39-En.pdf>.

PANDY, Jessa Gilda P. et al. Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1065, 8 dez. 2019. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-6253-5>>.

PAPADIMITRIOU, Marios; MOUNTZIOS, Giannis; PAPADIMITRIOU, Christos A. The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. **Cancer Treatment Reviews**, v. 67, p. 34–44, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737218300549>>.

PAPAEVANGELOU, Efthymia et al. The effect of FASN inhibition on the growth and metabolism of a cisplatin-resistant ovarian carcinoma model. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 4, p. 992–1002, 15 ago. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31392>>.

PATRA, Samir Kumar. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1785, n. 2, p. 182–206, abr. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X07000704>>.

PEART, Olive. Breast intervention and breast cancer treatment options. **Radiologic technology**, v. 86, n. 5, p. 535M-558M; quiz 559–62, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25995413>>.

POYNTER, Jenny N. et al. Statins and the Risk of Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 21, p. 2184–2192, 26 maio 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043792>>.

PRAMFALK, Camilla; ERIKSSON, Mats; PARINI, Paolo. Cholesteryl esters and ACAT. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 6, p. 624–633, 2012.

PRAT, Aleix et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, p. S26–S35, nov. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977615001460>>.

_____. HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, n. 1, p. 46–54, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article/112/1/46/5475264>>.

_____. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2 out. 2010. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2635>>.

RAGHU, Vineet K. et al. Biomarker identification for statin sensitivity of cancer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 659–665, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X1732243X>>.

RAJ, Shashi; FRANCO, Vivian I.; LIPSHULTZ, Steven E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 6, p. 315, 22 jun. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11936-014-0315-4>>.

RAKHA, Emad A. et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. **Cancer**, v. 118, n. 15, p. 3670–3680, 1 ago. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.26711>>.

RAMOS, Carlos V.; TAYLOR, Herbert B. Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathologic analysis of 13 examples. **Cancer**, v. 33, n. 3, p. 812–819, mar. 1974. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(197403\)33:3%3C812::AID-CNCR2820330328%3E3.0.CO;2-4](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(197403)33:3%3C812::AID-CNCR2820330328%3E3.0.CO;2-4)>.

RAY, Gibanananda; HUSAIN, Syed A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 71–76, fev. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912000002009>>.

REDDY, S M et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 1, p. 17–23, 12 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc2017379>>.

REYNOLDS, Peggy. Smoking and Breast Cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 15–23, 23 mar. 2013. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10911-012-9269-x>>.

RHODES, Daniel R. et al. ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining Platform. **Neoplasia**, v. 6, n. 1, p. 1–6, jan. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558604800472>>.

RISCAL, Romain; SKULI, Nicolas; SIMON, M. Celeste. Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! **Molecular Cell**, v. 76, n. 2, p. 220–231, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276519306938>>.

ROBSON, Mark et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 523–533, 10 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1706450>>.

RODRIGUES DOS SANTOS, Catarina et al. LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 16, 2014. Disponível em: <<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-13-16>>.

RYE, Kerry-Anne; GARRETY, Karin H.; BARTER, Philip J. Preparation and characterization of spheroidal, reconstituted high-density lipoproteins with apolipoprotein A-I only or with apolipoprotein A-I and A-II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1167, n. 3, p. 316–325, abr. 1993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276093902352>>.

SANCHO-GARNIER, Hélène; COLONNA, Marc. Épidémiologie des cancers du sein. **La Presse Médicale**, v. 48, n. 10, p. 1076–1084, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0755498219304105>>.

SANTOS GUIMARES, Isabella dos et al. Conventional Cancer Treatment. **Cancer Treat. - Conv. Innov. Approaches**. [S.l.]: InTech, 2013. . Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/conventional-cancer-treatment>>.

SARKAR, Reith R et al. Cost-Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Pediatric Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 7, p. 719–726, 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article/111/7/719/5240701>>.

SAYED, Shahin et al. Breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes in breast cancer patients from Kenya. **Breast Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 68, 26 dez. 2021. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-021-01446-3>>.

SCHETTINI, Francesco et al. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 84, p. 101965, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737220300037>>.

SCHWENTNER, Lukas et al. Adherence to treatment guidelines and survival in triple-negative breast cancer: a retrospective multi-center cohort study with 9156 patients. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 487, 21 dez. 2013. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-487>>.

SECKL, Michael J. et al. Multicenter, Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-

Controlled Trial of Pravastatin Added to First-Line Standard Chemotherapy in Small-Cell Lung Cancer (LUNGSTAR). **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 14, p. 1506–1514, 10 maio 2017. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.69.7391>>.

SERRANO-GOMEZ, Silvia Juliana et al. High prevalence of luminal B breast cancer intrinsic subtype in Colombian women. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 7, p. 669–676, jul. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgw043>>.

SHARMA, Monika et al. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148049, 25 jan. 2016a. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148049>>.

_____. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148049, 25 jan. 2016b. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148049>>.

SHARP, Adam; HARPER-WYNNE, Catherine. Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): The Expanding Landscape of Targeted Therapies. **Journal of Cancer Biology & Research**, v. 2, n. 1, p. 106, 2014. Disponível em: <<https://www.jscimedcentral.com/CancerBiology/cancerbiology-2-1036.php>>.

SHARPE, Laura J.; BROWN, Andrew J. Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 18707–18715, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820457278>>.

SIQUEIRA, Maria Eduarda Menezes de; FRANCALACCI, Luis Claudio; PEREIRA, Camila Girardi. Insuficiência renal aguda e rabiomiólise induzida pelo uso de estatina: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, n. 47, p. 273–275, 2008.

SITAUOLA, S.; BURRIS, T.P. Cholesterol and Other Steroids. **Encycl. Cell Biol.** [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 173–179. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944474100215>>.

SIVANAND, Sharanya; VANDER HEIDEN, Matthew G. Emerging Roles for Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Cancer. **Cancer Cell**, v. 37, n. 2, p. 147–156, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610819305811>>.

SMITH, Chris et al. Abstract P3-11-17: Statins suppress the aggressive phenotype of triple negative breast cancer cells via modulation of EGFR signalling. 15 fev. 2020, [S.l.]: American Association for Cancer Research, 15 fev. 2020. p. P3-11-17-P3-11-17. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.SABCS19-P3-11-17>>.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 11 set. 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.191367098>>.

SPOLITU, Stefano et al. Multidrug resistance P-glycoprotein dampens SR-BI

- cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins in human leukemia cells. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 615–627, 2016.
- SUGIE, Tomoharu. Immunotherapy for metastatic breast cancer. **Chinese Clinical Oncology**, v. 7, n. 3, p. 28–28, jun. 2018. Disponível em: <<http://cco.amegroups.com/article/view/19854/19896>>.
- SUN, Xiangyu et al. Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 31 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00428/full>>.
- SUNG, Hyuna et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>>.
- SWINNEN, Johannes V; BRUSSELMANS, Koen; VERHOEVEN, Guido. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, n. 4, p. 358–365, jul. 2006. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00075197-200607000-00005>>.
- TANG, Ping; SKINNER, Kristin A.; HICKS, David G. Molecular Classification of Breast Carcinomas by Immunohistochemical Analysis. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 18, n. 3, p. 125–132, set. 2009. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00019606-200909000-00001>>.
- TARIQ, Syed Maaz et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: A Beacon of Hope in the Fight Against Cancer. **Cureus**, 23 out. 2018. Disponível em: <<https://www.cureus.com/articles/15684-chimeric-antigen-receptor-t-cell-therapy-a-beacon-of-hope-in-the-fight-against-cancer>>.
- TATIDIS, Loukas; MASQUELIER, Michèle; VITOLS, Sigurd. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 2169–2180, jun. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295202010183>>.
- THOMPSON, Gilbert; MABUCHI, Hiroshi. AKIRA ENDO: THE DISCOVERY OF STATINS. **Pioneers Med. Without a Nobel Prize**. [S.l.]: IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2014. v. 86. p. 251–269. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/86/5/86_5_484/_article>.
- TIAN, Wei et al. Changes in lipid profiles during and after (neo)adjuvant chemotherapy in women with early-stage breast cancer: A retrospective study. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221866, 29 ago. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0221866>>.
- TOSI, Maria R.; TUGNOLI, Vitaliano. Cholesteryl esters in malignancy. **Clinica Chimica Acta**, v. 359, n. 1–2, p. 27–45, set. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898105002421>>.
- TRABERT, Britton et al. Progesterone and Breast Cancer. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 2, p. 320–344, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article/41/2/320/5568276>>.
- TREMONT, Alexander; LU, Jonathan; COLE, John T. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. **The Ochsner journal**, v. 17, n. 4, p. 405–411,

2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29230126>>.

TRIVERS, Katrina F. et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. **Cancer Causes & Control**, v. 20, n. 7, p. 1071–1082, 3 set. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10552-009-9331-1>>.

TUNG, Nadine M.; GARBER, Judy E. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 2, p. 141–152, 5 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41416-018-0127-5>>.

UPADHYAY, Ankur Kumar et al. Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: Involvement of Akt, NF- κ B and Bcl-2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, n. 2, p. 177–185, out. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X06001852>>.

VAN DE VIJVER, Marc J. et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999–2009, 19 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021967>>.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1160809>>.

VENKITARAMAN, Ramachandran. Triple-negative/basal-like breast cancer: clinical, pathologic and molecular features. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 10, n. 2, p. 199–207, 10 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/era.09.189>>.

VIDAL, Maria; PARÉ, Laia; PRAT, Aleix. Molecular classification of breast cancer. **Management of Breast Diseases: Second Edition**, v. 27, n. 1, p. 203–219, 2016.

VINOGRADOVA, Yana; COUPLAND, Carol; HIPPISEY-COX, Julia. Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. **BMJ**, p. m3873, 28 out. 2020. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.m3873>>.

VOORNEVELD, Philip W. et al. Statin Use After Diagnosis of Colon Cancer and Patient Survival. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 470- 479.e4, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851735597X>>.

WAHBA, Hanan Ahmed; EL-HADAAD, Hend Ahmed. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Biology and Medicine**, v. 12, n. 2, p. 106–116, 2015.

WANG, Ange et al. Statin use and all-cancer survival: prospective results from the Women's Health Initiative. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 129–135, 9 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc2016149>>.

WANG, Guoping; SU, Chao; YIN, Tao. Paclitaxel and platinum-based chemotherapy results in transient dyslipidemia in cancer patients. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 6, n. 2, p. 261–265, fev. 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2016.1107>>.

- WANG, Jinghua; ZHOU, Penghui. New Approaches in CAR-T Cell Immunotherapy for Breast Cancer. [S.l: s.n.], 2017. p. 371–381. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-6020-5_17>.
- WANG, Yan; LIU, Chengxin; HU, Likuan. Cholesterol regulates cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer by modulating miR-33a-PIM3 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 511, n. 3, p. 685–692, abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19303249>>.
- WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev. 1956. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.123.3191.309>>.
- WARMOES, Marc et al. Proteomics of Genetically Engineered Mouse Mammary Tumors Identifies Fatty Acid Metabolism Members as Potential Predictive Markers for Cisplatin Resistance. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 5, p. 1319–1334, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535947620311142>>.
- WEAVER, Beth A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 15 set. 2014. Disponível em: <<https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e14-04-0916>>.
- WEI, Lengyun et al. Cholesteryl Ester Promotes Mammary Tumor Growth in MMTV-PyMT Mice and Activates Akt-mTOR Pathway in Tumor Cells. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 853, 8 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/6/853>>.
- WEIDERPASS, Elisabete; MEO, Margrethe; VAINIO, Harri. Risk Factors for Breast Cancer, Including Occupational Exposures. **Safety and Health at Work**, v. 2, n. 1, p. 1–8, mar. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2093791111210011>>.
- WESTERINK, N.L. et al. Cancer treatment induced metabolic syndrome: Improving outcome with lifestyle. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 108, p. 128–136, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104084281630275X>>.
- XIAN, Guozhe et al. Simvastatin attenuates macrophage-mediated gemcitabine resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the TGF- β 1/Gfi-1 axis. **Cancer Letters**, v. 385, p. 65–74, jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438351630684X>>.
- XU, Liuyue et al. Dynamic Changes of Blood Lipids in Breast Cancer Patients After (Neo)adjuvant Chemotherapy: A Retrospective Observational Study. **International Journal of General Medicine**, v. Volume 13, p. 817–823, out. 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/dynamic-changes-of-blood-lipids-in-breast-cancer-patients-after-neoadj-peer-reviewed-article-IJGM>>.
- XU, Shimeng; ZHANG, Xuelin; LIU, Pingsheng. Lipid droplet proteins and metabolic diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 5, p. 1968–1983, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443917302454>>.
- YAN, Aiwen et al. Cholesterol metabolism in drug-resistant cancer (Review).

International Journal of Oncology, v. 57, n. 5, p. 1103–1115, 2020.

YANG, Jie; WANG, Lihua; JIA, Renbing. Role of de novo cholesterol synthesis enzymes in cancer. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 7, p. 1761–1767, 2020. Disponível em: <<http://www.jcancer.org/v11p1761.htm>>.

YANG, Wei et al. Potentiating the antitumour response of CD8+ T cells by modulating cholesterol metabolism. **Nature**, v. 531, n. 7596, p. 651–655, 31 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature17412>>.

YIN, Li et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 61, 9 dez. 2020. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-020-01296-5>>.

YOUNG, Stephen G.; FONG, Loren G. Lowering Plasma Cholesterol by Raising LDL Receptors — Revisited. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 12, p. 1154–1155, 22 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMe1202168>>.

YUAN, PENG et al. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. **Oncology Letters**, v. 11, n. 3, p. 2101–2105, mar. 2016. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.4199>>.

ZABIELSKA, JUDYTA; SLEDZINSKI, TOMASZ; STELMANSKA, EWA. Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase Inhibition in Cancer Treatment. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3385–3394, 1 jul. 2019. Disponível em: <<http://ar.iijournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.13482>>.

ZEINOMAR, Nur et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and familial breast cancer risk: findings from the Prospective Family Study Cohort (ProF-SC). **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 128, 28 dez. 2019. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-019-1213-1>>.

ZHAO, Guodong et al. Effect of statins use on risk and prognosis of breast cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. Publish Ah, 16 ago. 2021. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1097/CAD.0000000000001151>>.

ZHAO, Zhenhui et al. Engineered IL-7 Receptor Enhances the Therapeutic Effect of AXL-CAR-T Cells on Triple-Negative Breast Cancer. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–13, 8 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/4795171/>>.

ZHENG, Lei et al. SREBP2 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 7, p. 655–662, 22 abr. 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370218760283>>.

ZHU, Yuyan et al. In vitro exploration of ACAT contributions to lipid droplet formation during adipogenesis. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 5, p. 820–829, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520331175>>.

ANEXO I

FIGURA SUPLEMENTAR

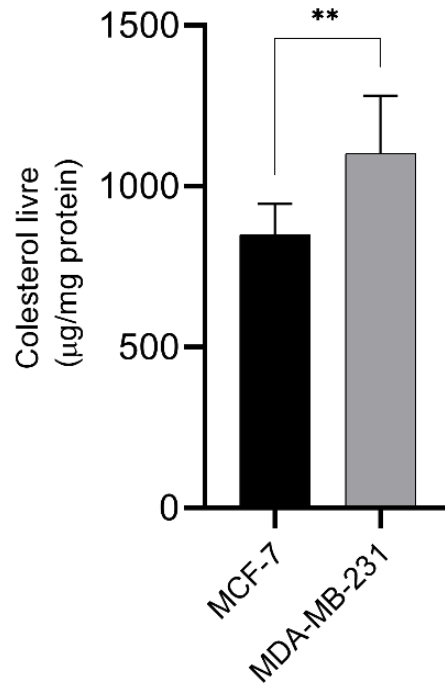


Figura suplementar 1: Análise do conteúdo de colesterol livre intracelular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. As linhagens de CAM foram plaqueadas e cultivadas em meio de cultivo padrão por 24h e, em seguida, o conteúdo de colesterol foi determinado com o Amplex® Red Cholesterol Assay Kit. Teste t não pareado bicaudal foi utilizado para análise de significância estatística de comparação entre as duas linhagens (**p <0,005).

ANEXO II

1 Comprovante de submissão do artigo I

Annals of Nutrition and Metabolism

| | |
|--------------------|---|
| Manuscript: | ANM-0-0-0 |
| Title: | LIPID METABOLISM IS A PUTATIVE TARGET AGAINST BREAST CANCER |
| Authors(s): | Diandra Zipinotti dos Santos (Corresponding Author), Nayara Gusmão Tessarollo (Co-author), Paulo Cilas Morais Lyra Junior (Co-author), Ian Victor Silva (Co-author), Leticia Batista Azevedo Rangel (Co-author) |
| Keywords: | Cancer, Lipids, Metabolism |
| Type: | Review Article |

Review Article
LIPID METABOLISM IS A PUTATIVE TARGET AGAINST BREAST CANCER

Diandra Z. dos Santos¹, Nayara G. Tessarolo², Paulo C. M. Lyra Jr³, IanVictor Silva⁴, Leticia B.A.
Rangel^{1,5,6}

¹Biotechnology Program/RENORBIO, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria (Espirito Santo), Brazil

²Viral Vector Laboratory, Center for Translational Investigation in Oncology, Cancer Institute of São Paulo/LIM24, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo,(São Paulo), Brazil

³College of Education and Environment (FAEMA), Ariquemes, (Rondônia), Brazil

⁴Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, (Espirito Santo), Brazil

⁵Biochemistry Program, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, Brazil

⁶Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitória, (Espirito Santo), Brazil

Short Title: LIPID METABOLISM RELATED SUBTYPE SIGNATURE IN BREAST CANCER

Corresponding Author:

Diandra Zipinotti dos Santos

Biotechnology Program/RENORBIO, Health Sciences Center

Federal University of Espirito Santo

Av. Fernando Ferrari, 514, Vitória, Espirito Santo, 29075-910, Brazil

Tel: +55(27)99977-3898

E-mail: diandrzas@hotmail.com

Number of Figures: 4

Word count: 3797.

Keywords: lipid, metabolism, breast cancer subtype.

Abstract

Background: Breast cancer (BC) is the second most frequent type of cancer in the world and most common among women, configuring one a major challenge to global health. BC is a complex and heterogeneous disease, that can be subdivided into distinct tumor types based upon the expression of molecular markers predicting patient outcomes and response to therapy. A growing number of studies have tried to expand the known markers by investigating the association of altered lipid metabolism with BC proliferation and metastasis. **Summary:** In this review, we describe the metabolic peculiarities of each cancer subtype, understanding how this influences its aggressiveness and identifying whether these intrinsic vulnerabilities of each subtype can play a role in the therapeutic management. **Key Messages:** The evidence suggests so far that when changes occur on lipid pathways, it can affect the availability of structural lipids for membrane synthesis, lipid synthesis, and degradation that contribute to energy homeostasis and cell signaling functions. These findings will guide the next steps on the path to understanding the mechanisms underlie how lipids alterations are related to disparities in chemotherapeutic response in BC, particularly for triple-negative breast cancer (TNBC) subtype, one the most aggressive, relapsed and loser treatment options compared to other subtypes.

Introduction

Breast cancer (BC) remains the second common cancer worldwide and fifth leading cause of cancer-related death in 2020, being, therefore, a global health problem [1]. Moreover, significant proportion of women with BC will ultimately develop disease recurrence and chemo-resistance [2,3], what increase the need for new clinical strategies to prevent such scenario. Because patients with triple negative breast cancer (TNBC) are more susceptible poor prognosis disease, the referred advances would directly impact it [4]. Perhaps this is the time to broaden the investigation for non-canonical strategies, as well as novel clinical approaches to fight the disease.

Since obesity is one of the most common diseases nowadays and is defined by the increase in fat mass, resulting from energy imbalance, it can be considered a risk factor in the development of several cancers, including BC [5, 6]. Indeed, several studies in animals and humans have demonstrated the correlation of obesity on the BC phenotype and the pathological role of lipids in the disease. The association between overweight and BC was first reported in 1976, where obese BC patients had considerably larger and more invasive tumors, in addition to a 25.3% lower survival rate compared to the control group [7]. Since then, an unbridled search has begun to better understand the association between the lipid profile of patients and BC.

A retrospective study conducted by Pajares et al (2013) in 5,683,000 patients in clinical trials with BC under systemic adjuvant chemotherapy based on anthracyclines and taxanes clearly showed the correlation of obesity and worse clinical outcome of the obese patients in comparison with the non-obese ones [8]. Patients with characterized obesity had a higher recurrence (hazard ratio = 1.26, $p = 0.048$) and mortality rate (hazard ratio = 1.35, $p = 0.016$) when compared to non-obese patients. Another retrospective study carried out with 4,077 women with estrogen receptor (ER) positive BC undergoing treatment with various chemotherapy agents also reinforced this association when it showed that the overall mortality of obese patients was higher than that of non-obese patients (hazard ratio = 1.31, 95% confidence interval = 1.12 to 1.54) [9]. Furthermore, many studies address that obese and other alterations in metabolic functions may be related to different BC subtypes. Agresti and colleagues (2016) revealed that high waste circumference (≥ 80 cm) was associated with increased risk to develop luminal B BC histotype. Moreover, women with a body mass index (BMI) higher than 25 kg/m² had increased risk of developing basal-type TNBC than the ones with lower BMI. [10].

Although the attention of studies has been on obesity, topics about lipid metabolic changes within tumors cells are being investigated to verify the association with worse prognosis and treatment efficacy. Recently, a study conducted by Maiti et al (2010) revealed that dyslipidemia, which is strongly associated with obesity, may also relate to poor outcome of TNBC patients [11]. Triglycerides are an independent source for fatty acids (FAs) oxidation, which have a critical role in promoting cell

proliferation and tumor growth [12], thereby proposing a carcinogenic potential of lipids when not well balanced. Based on these data, the relationship between lipid metabolism and BC aggressiveness gains relevance for further research. Recently, various studies have correlated dyslipidemia to an increased risk of TNBC to progress to worse conditions, while patients with ER negative and progesterone receptor (PR) positive BC seem to have no such correlation [10, 13, 14, 15, 16].

Based on the analysis of the current data available, there is evidence to support the hypothesis that a better understanding of the implications of lipids in the development of TNBC can be converted into supportive strategies in the clinical management of the patient carrying the disease.

The essence of lipids

Lipids are crucial components of the physiological system of the body. According to “Comprehensive Classification System for Lipids” published in 2005, lipids are hydrophobic or amphipathic small molecules that originate by carbanion-based condensations of thioesters and/or by carbocation-based condensations of isoprene units [17]. There are eight categories into which lipids can be classified: FAs, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, saccharolipids, polyketides, sterol lipids, and prenol lipids.

Our body can obtain FAs from endogenous synthesis, mainly in the liver, in adipocytes, and lactating breast tissues [18], and exogenous dietary intake as free FAs or complexed to proteins such as low-density lipoproteins [19]. Generally, normal cells use exogenous sources and little endogenous FAs synthesis occurs. The lipids, when not used, can be stored in intracellular structures called lipid droplets. When in action, lipids molecules exert diverse biological functions in the cells, such as triacylglycerides employed for energy storage or phosphoglycerides, sterols, and sphingolipids involved in structural components of cellular membranes. It is also important to mention that they also play an important role acting as metabolic signaling messengers and as hormones [20].

In normal conditions, the lipid synthesis occurs into the cytosol by condensation reaction of two-carbon units to form of component acetyl Coenzyme A (acetyl-CoA). Acetyl-CoA is generated from citrate by the enzyme ATP-citrate lyase (ACLY) and then converted to malonyl-CoA by the enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Figure 1). FAs are synthesized by a repetitive sequence of reactions catalyzed by an enzyme complex, acyl-carrier protein domain of the multifunctional enzyme fatty-acid synthase (FASN). ACC is the rate-limiting enzyme in fatty acid synthesis in this pathway [21]. All the reactions generate a basic 16-carbon saturated FA denominated palmitic acid, which can be elongated and desaturated to generate the diverse spectrum of saturated and unsaturated FAs [22].

The main source of carbon to FA synthesis is derived from glucose. The first step occurs in mitochondrial matrix, where the glucose is converted to acetyl-CoA and it is used to synthesize citrate

in mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle. Most cells proliferating under conditions of high adenosine 5'-triphosphate (ATP)/adenosine 5'-diphosphate (ADP) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH /NAD⁺), where citrate is excreted back into the cytosol and the lipids are generated [23].

FAs enter the composition of different types of lipids. They can be converted into diacylglycerides and triacylglycerides via the glycerol phosphate pathway. Intermediates of this pathway can be converted into different phosphoglycerides, including phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol and phosphatidylserine, which are structural components of biological membranes [22]. Sphingolipids, phosphoinositides and eicosanoids, other class of lipids, are also generated from FAs. Eicosanoids are produced from arachidonic acid that is converted into prostaglandin H₂ by cyclooxygenases (COX1 and COX2), or into leukotrienes by leukotriene synthases. Prostaglandin H₂ can be converted into prostaglandin E₂ (PGE₂), prostacyclin and thromboxanes [24].

Another important lipid that plays an important role in cells is cholesterol. Cholesterol is a membrane component, modulating the fluidity of the lipid bilayer, and forms lipid rafts that act in the activation of determinate signal transduction pathways [25]. Also, it can be implicated for synthesis of steroid hormones such as estrogen and progesterone. Cells can synthesize cholesterol through mevalonate pathway, or it can be obtained from extracellular source through transmembrane receptor proteins, mainly LDLR. Cholesterol is synthesized from acetyl-CoA by condensation with acetoacetyl-CoA to form 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA by HMG-CoA synthase [19] and then, into mevalonate by HMG-CoA reductase (HMGCR) [22]. This step is the rate-limiting reaction of the cholesterol synthesis pathway [26]. Subsequently, the mevalonate is phosphorylated to isopentyl pyrophosphate, which is converted to geranyl pyrophosphate. With another isopentyl pyrophosphate molecule, it is converted to farnesyl pyrophosphate. Two molecules of farnesyl pyrophosphate are condensed into squalene from the catalyzation of the squalene synthase. Squalene is then cyclized to form lanosterol and, finally, lanosterol is converted into cholesterol in a series of 19 other reactions [27, 28] (shown in Fig. 1). In normal conditions, excess of cholesterol can be toxic for cells. Thus, the excessive cholesterol is converted either to cholesterol ester (CE) by acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT-1) or to its primary metabolite 27-hydroxycholesterol (27HC) by CYP27A1. CEs are subsequently storage in lipid-droplets, which also sequester excess FAs [29]. It is important to emphasize that both dietary cholesterol and de novo synthesized cholesterol are necessary to maintain its homeostasis [30]. It is seen that uncontrolled lipids in sensitive tissues may be associated with disease progression.

In tumor cells and precancerous tissues endogenous FA, cholesterol and CE synthesis are upregulated to promote cell growth, proliferation, differentiation, and motility of tumor cells [19]. Thus, to

understand how lipid metabolism influences malignant cells behavior we must first better understand how it is programmed in normal mammalian cells.

Lipid homeostasis and its role in tumorigenesis

Several studies have shown that the metabolism of proliferating tumor cells is different from the normal tissues [31]. In general, two classifications for metabolic changes in cancer are described: metabolic changes at the level of the cancer cell and those secondary to the presence of the tumor (they are manifested in a systemic way). Metabolic changes in the cancer cell were initially observed in the 1920s by Shields Warren who described the hypothesis that cancer lethality is related to tumor cell nutrient depletion. Later, Otto Warburg won the Nobel Prize for demonstrating that cancer cells use glucose more efficiently compared to normal cells, especially simple sugars for energy supply even in the presence of normal levels of oxygen, phenomena designated as the Warburg effect. For a long time, researchers emphasize the importance of glucose in the aggressiveness of cancer, however, the change in lipid metabolism is also relevant to promote tumor growth, cell migration, invasion, and metastasis. The high rate of cell proliferation requires in addition to an increase in demand for glucose, glutamine, amino acid and, the reprogramming of lipid metabolic [32]. While normal mammalian cells obtain FAs mostly from exogenous uptake, the cancer cells use de novo FA and cholesterol synthesis [33]. For this, BC cells can increase the activity of FASN and upregulate monoacylglycerol lipase (MAGL) expression, which controls the intracellular release of FAs [34, 35, 36]. Also, cancer cells can utilize FAs obtained from exogenous source through the upregulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) [37, 38]. Together, all these alterations aim the mobilization of FAs and, consequently, tumor development.

Indeed, FA synthesis inhibition in vitro and in vivo xenografts by C75 can reduce cell proliferation and tumor growth [39, 40]. It is known that FASN and ACC have similar expression and localization pattern in normal breast tissue, both restricted to cell cytoplasm. Intriguingly, expression of FASN and ACC analyzed by immunohistochemical of in situ and infiltrating carcinoma revealed an increment of their expression in both disease stages [21]. Upregulation of FASN and ACC seems an early event in BC development, and the molecule could be explored as a disease diagnosis marker.

Another study conducted by Magnard et al [41] had shown interaction between ACC- α (ACC α) and BRCA1 through the BRCA1 C-Terminal (BRCT) domain. BRCA1 mutation may lead to a disruption of BRCA1-ACC α complex, which, in turn, increases ACC α release and lipogenesis in breast tumor cells, indicating that the CC α activity could be essential for BC cells survival. Besides, mammary carcinomas present different membrane lipid composition with higher incorporation of endogenous FAs as palmitate-containing phosphatidylcholine. These alterations are correlated with tumor progression, hormone receptor and patient survival [42]. Study of lipidomic conducted in 267 human breast tissues

showed that genes related to lipid metabolism were found highly expressed in clinical BC samples [42]. Gene silencing of ACC α , elongation of very long chain fatty acid-like 1 (ELOVL1), FASN, insulin-induced gene 1 (INSIG1), sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP), stearyl-CoA desaturase (SCD), and thyroid hormone-responsive protein (THRSP) reduced the lipidomic profiles and viability of the BC cells.

MAGL is another key enzyme that also demonstrated involvement in tumor progression through energy supply by FA oxidation and increased malignancy of cancer cells, facilitating proliferation and aggressiveness through the production of signaling lipids including monoacylglycerol, free FAs, and secondary lipid metabolites [43, 44]. Another evidence in support of this was demonstrated by Nomura et al [36], which have identified increased levels of MAGL levels in aggressive BC cells (231MFP) compared to a nonaggressive model (MCF-7).

In addition, dysregulation in the cholesterol pathway have been associated as risk factor for several malignancies, including BC. Meta-analysis data indicated that dietary cholesterol was associated with an increased risk to develop BC [45]. BC cells incorporate more LDL-cholesterol, which induces cell lines proliferation, migration, and metastasis [46, 47]. Reduced cell viability and migration in BC cells were observed following membrane cholesterol depletion by cyclodextrin [48]. Membrane fluidity control kept by cholesterol is implicated in drug absorption by cancer cells. Depletion of membrane cholesterol in MCF-7 cells enhanced cellular uptake of doxorubicin [49].

Besides all the links between the lipogenic enzymes and BC development and aggressiveness, we need to consider the heterogeneous nature of the disease, in which the expression and the role of these proteins can vary for each subtype.

Insights on the Role of Lipid Metabolism by specific BC subtype

As we demonstrated in the overview of the lipid pathways, three important steps are involved in the functionality of the cell: lipid uptake, de novo lipogenesis, and β -oxidation. This way, a cancer cell can develop multiples strategies changes that run through uptake, anabolism, and catabolism of lipids to maintain their high energetic need [50]. However, it is worth to point out that a solid tumor presents itself as a complex system, with the presence of heterogeneous microenvironment, which contain areas of hypoxia, low pH, necrosis, and nutrient deprivation. In response to these factors, and to meet the demand of different tumor cells, cell metabolism undergoes several changes manifested in a systemic way for each subtype of BC. These peculiarities should be used as targeted application of metabolic inhibitors that block specific pathways involved in lipid metabolism.

Currently, luminal A, luminal B, HER2-enriched, and basal-like (that also comprises TNBC) are the molecular subtypes frequently recognized at clinical diagnosis. Concerning the luminal group, major

differences in metabolites were found for 27-HC [51]. This cholesterol metabolite is part of a group called selective estrogen receptor modulators (SERMs), and acts as estrogen receptor agonist, enhancing proliferation of luminal ER+ BC cells (MCF-7) in vitro [52] and tumor growth in mice [53, 54]. The 27-HC is metabolized by CYP7B1. Interestingly, ER+ breast tumors with elevated expression of CYP7B1 were positively correlated with higher rates of disease-free survival than the ones with low levels of the molecule [51]. It is likely that luminal tumors use 27-HC as fuel for cancer progression.

Apart from classical characteristics already known for TNBC as high expression of proliferation and cell cycle-related genes, they are also distinguished by tumor metabolites. It was shown that lipid metabolite was altered in triple negative tumors compared to normal adjacent tissue ($p=0.001$) [55]. On the other hand, this distinct phenotype was not statistically significant for luminal A BC compared to normal tissue [55]. Analysis of 62 breast cancer tissue by Wang et al (2017) revealed that ACLY expression is three times higher in tumor tissue than in normal tissue [56]. Although they did not observe a relation between ACLY expression and ER, PR or HER2 status, a positive correlation was found between p-ACLY expression and ki67 levels ($p<0.05$), tumor size ($p<0.05$) and higher histological grade ($p<0.05$). In contrast with other subtypes, TNBC is often diagnosed with a high-grade ductal histology and high Ki-67 [57, 58]. In contrast to this fact, it was revealed that HER2-enriched subtype expresses more ACLY mRNA than TNBC and luminal tumors [59].

In a recent study by Eiriksson et al. [60], the authors showed the same lipid types synthesized by BC cell lines MCF-7, luminal A subtype, and MDA-MB-231, TNBC subtype as models, mainly the ones called phosphatidylcholines. Compared to the MCF-10A normal tissue cell line, the cancer cells showed higher amounts of this lipid type. It is worth mentioning that a higher amount of phosphatidylcholine was observed in TNBC cells, comparing to the luminal A cells [60]. It is hypothesized that the reason for the observation is because phosphatidylcholines participate in the formation processes of structures as HDL and LDL, indispensable for the cholesterol metabolism [61]. Therefore, one can speculate that the vesicles responsible for the drugs expelling mechanisms could interfere in the regular transport of the chemotherapy drugs and, thus, could contribute to the development of chemoresistance in BC cells.

Studies have also demonstrated the correlation between the cholesterol metabolism and BC subtypes. One of the studies indicated that high levels of the ACAT-1 enzyme, which is responsible for the conversion of cholesterol in cholesterol ester (CE), are associated with a proliferation mechanism mediated by LDL [62]. Moreover, high levels of oxysterol, a cholesterol metabolite, was found in the plasma of luminal B BC patients [63].

Besides that, a study organized by Catusus and colleagues [64] associated the low-density lipoprotein receptor-related protein 1, also known as apolipoprotein E (ApoE) receptor, with the proliferation and the invasiveness potentials in HER2-enriched and TNBC cell lines.

Gonzalo-Calvo and colleagues [65] correlated the accumulation of intratumor CE to the proliferation and aggressive potential of human BC. Therefore, this study demonstrated that HER2 enriched and TNBC patients presented higher accumulation of intratumor CE comparing to the luminal A patients. Each subtype has different metabolic genotypes and phenotypes which influence proliferation, metastasis capabilities and contribute to chemotherapy resistance (shown in Fig. 2). All these studies and findings suggest that the impact of cholesterol metabolism in BC, especially in the most aggressive subtypes requires more research because it includes a variety of possible therapeutic targets that could improve the treatment of the disease, thus patients' overall survival and quality of life.

What does the clinical evidence tell us?

To further explore the linear correlations between the different metabolic profiles and the clinical outcome amongst different subtypes of BC, we collected the data from Cancer Genome Atlas (TCGA) to compare the survival pattern for BC molecular subtypes with low and high expression of aforementioned lipogenic enzymes. It is worthwhile to inform that basal breast cancer includes the TNBC subtype. FASN expression did not appear to affect patients' survival probability according to BC subtype (shown in Fig. 3). Interestingly, despite of patients with high and low ACLY expression in the basal group have similar overall survival reaching more than 200 months of follow-up, high ACLY expression markedly reduce 50% of patients' survival probability (logRank $p=0.03$), suggesting it served as a poor prognostic marker in patients with basal subtype of BC (shown in Fig. 3).

Regarding the proteins involved in cholesterol metabolism, our in-silico data matches with the studies cited before that demonstrated upregulation of LDLR and high cholesterol levels in TNBC. Turns out that patients' survival probability is reduced to 50% after 100 months by ACAT-1 and HMGCR high expression in basal BC but not in other subtypes (shown in Fig. 4). On the other hand, an opposite pattern of patients' probability survival was seen in relation to LDLR high expression, which dropped dramatically in 100 months (shown in Fig. 4). Taken together, this evidence highlights the complexity behind the expression of the different protein related to lipid metabolism regarding BC subtype.

Future directions

For highly lethal diseases, such as metastatic cancer like TNBC, a subgroup subjected to a new treatment may have a survival advantage in the first years of the disease. We demonstrate the involvement of the lipid metabolism pathway in the pathogenesis of BC regarding the peculiarities of subtypes, affecting overall survival probability in BC patients, especially for the basal group. But what

are the perspectives on the metabolic management of BC? To the moment, there are few studies targeting the mentioned enzymes in BC therapy. The clinical trial NCT02595372 recently ended on April 2021, suggested that proton pump inhibitor omeprazole, which is recognized to effectively inhibit FASN, may improve the efficacy of neoadjuvant chemotherapy based on paclitaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide. Another clinical trial ongoing in phase II for HER2+ breast cancers patients is investigating the use of FASN inhibitor in combination with trastuzumab, paclitaxel, and endocrine therapy. When considering BC and lipids, cholesterol metabolism seems to play an important role in the development of resistance to tamoxifen in luminal A BC [66], leading to a plausible hypothesis that it might also be involved in other subtypes of BC acquisition of chemoresistant phenotype to other drugs. In this regard, HMGCR has been targeted in BC treatment as noted by ongoing clinical trials, of which over 40 trials are testing the effects of statins in BC (clinicaltrials.gov). Of these, 14 are evaluating the benefits of atorvastatin in association with conventional chemotherapy, two being in phase 2 trials with TNBC patients (clinicaltrials.gov, NCT03358017; NCT03872388). Regarding the ACLY, hydroxycitric acid and cucurbitacin B are the two drugs tested against this enzyme, however in lung and bladder cancer [67]. It was demonstrated that the inhibition of ACLY in combination with conventional chemotherapeutic drugs can increase treatment efficacy [61]. However, to the moment, no clinical trials target the important enzymes mentioned in this review. Since these proteins can activate fatty acids and cholesterol deriving both from de novo and exogenous sources, a combined inhibition of relevant enzymes may result in a significant anti-tumor response. Therefore, although functional studies on the influence of genotypes on staging are necessary for a better understanding of their roles, we suggest special attention in differentiated therapy for patients with ACYL, ACAT-1 and LDLR expression altered.

Statements

Conflict of Interest Statement

The authors declared no conflicts of interest.

Funding Sources

No financial support was received for this work.

Author Contributions

Diandra Z. dos Santos conceived the review topic, wrote, edited the text, and prepared the figures; Nayara G. Tessarollo and Paulo C. M. Lyra wrote and edited the text, Ian Victor Silva and Leticia B.A. Rangel checked and edited the text. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

1. World Health Organization: Clinical management of COVID-19: interim guidance. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (2020). Accessed 28 July 2020.
2. Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2015 Jun;12(2):106-16. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030. PMID: 26175926; PMCID: PMC4493381.
3. Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, Hsu L, Moulder SL, Tripathy D, Hortobagyi GN, Valero V. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. *Br J Cancer*. 2018 Jan;118(1):17-23. doi: 10.1038/bjc.2017.379. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29235566; PMCID: PMC5765226.
4. Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008 Oct;22(11):1233-9; discussion 1239-40, 1243. PMID: 18980022; PMCID: PMC2868264..
5. De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease?. *J Transl Med*. 2019;17(1):169. Published 2019 May 22. doi:10.1186/s12967-019-1919-y
6. Ligibel J. Obesity and breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2011 Oct;25(11):994-1000. PMID: 22106549.
7. Abe R, Kumagai N, Kimura M, Hirosaki A, Nakamura T. Biological characteristics of breast cancer in obesity. *Tohoku J Exp Med*. 1976 Dec;120(4):351-9. doi: 10.1620/tjem.120.351. PMID: 1014000.
8. Pajares B, Pollán M, Martín M, Mackey JR, Lluch A, Gavila J, Vogel C, Ruiz-Borrego M, Calvo L, Pienkowski T, Rodríguez-Lescure Á, Seguí MA, Tredan O, Antón A, Ramos M, Cámara Mdel C, Rodríguez-Martín C, Carrasco E, Alba E. Obesity and survival in operable breast cancer patients treated with adjuvant anthracyclines and taxanes according to pathological subtypes: a pooled analysis. *Breast Cancer Res*. 2013 Nov 6;15(6):R105. doi: 10.1186/bcr3572. PMID: 24192331; PMCID: PMC3978725.
9. Dignam JJ, Wieand K, Johnson KA, Fisher B, Xu L, Mamounas EP. Obesity, tamoxifen use, and outcomes in women with estrogen receptor-positive early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Oct 1;95(19):1467-76. doi: 10.1093/jnci/djg060. PMID: 14519753; PMCID: PMC4676737.
10. Agresti R, Meneghini E, Baili P, Minicozzi P, Turco A, Cavallo I, Funaro F, Amash H, Berrino F, Tagliabue E, et al. Association of adiposity, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast

- cancer subtypes: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(1):179–189. doi: 10.1007/s10549-016-3802-3.
11. Maiti B, Kundranda MN, Spiro TP, Daw HA. The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jun;121(2):479-83. doi: 10.1007/s10549-009-0591-y. Epub 2009 Oct 23. PMID: 19851862.
 12. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2017 Dec 12;8(1):1-8. doi: 10.1002/cphy.c170012. PMID: 29357123; PMCID: PMC6376873.
 13. Suzuki Y, Tsunoda H, Kimura T, Yamauchi H. BMI change and abdominal circumference are risk factors for breast cancer, even in Asian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Dec;166(3):919-925. doi: 10.1007/s10549-017-4481-4. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28861658.
 14. Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Aug;1856(1):73-85. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.002. Epub 2015 Jun 10. PMID: 26071880.
 15. Gershuni V, Li YR, Williams AD, So A, Steel L, Carrigan E, Tchou J. Breast cancer subtype distribution is different in normal weight, overweight, and obese women. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Jun;163(2):375-381. doi: 10.1007/s10549-017-4192-x. Epub 2017 Mar 14. PMID: 28293912.
 16. Laura Burkbauer, Macy Goldbach, Kelly C. Allison, Julia C. Tchou, Obesity and Prognosis in Triple Negative Breast Cancer, *Journal of the American College of Surgeons*, Volume 231, Issue 4, Supplement 1, 2020, Pages S38-S39, ISSN 1072-7515, <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2020.07.017>.
 17. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJ, Dennis EA. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S9-14. doi: 10.1194/jlr.R800095-JLR200. PMID: 19098281.
 18. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):763-77. doi: 10.1038/nrc2222. PMID: 17882277.
 19. Song CW, Lee H, Dings RP, Williams B, Powers J, Santos TD, Choi BH, Park HJ. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci Rep.* 2012;2:362. doi: 10.1038/srep00362. Epub 2012 Apr 12. PMID: 22500211; PMCID: PMC3324825.
 20. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):112-24. doi: 10.1038/nrm2330. PMID: 18216768; PMCID: PMC2642958.

21. Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997 Nov;3(11):2115-20. PMID: 9815604.
22. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech.* 2013 Nov;6(6):1353-63. doi: 10.1242/dmm.011338. PMID: 24203995; PMCID: PMC3820259.
23. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell.* 2005 Oct;8(4):311-21. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.008. PMID: 16226706.
24. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):162-76. doi: 10.1038/nrm2335. PMID: 18216772.
25. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 2010 Jan 1;327(5961):46-50. doi: 10.1126/science.1174621. PMID: 20044567.
26. Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:129-57. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656. PMID: 16753029.
27. Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem.* 2013 Jun 28;288(26):18707-15. doi: 10.1074/jbc.R113.479808. Epub 2013 May 21. PMID: 23696639; PMCID: PMC3696645.
28. Billon C, Sitaula S, Burriss TP. Inhibition of ROR α/γ suppresses atherosclerosis via inhibition of both cholesterol absorption and inflammation. *Mol Metab.* 2016 Jul 25;5(10):997-1005. doi: 10.1016/j.molmet.2016.07.001. PMID: 27689012; PMCID: PMC5034492.
29. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Mar;20(3):137-155. doi: 10.1038/s41580-018-0085-z. PMID: 30523332; PMCID: PMC6746329.
30. Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. *Annu Rev Biochem.* 2018 Jun 20;87:783-807. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011852. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28841344; PMCID: PMC5828883.
31. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. PMID: 19460998; PMCID: PMC2849637.
32. Fu, Y, Zou, T, Shen, X, et al. Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm.* 2021; 2: 27– 59. <https://doi.org/10.1002/mco2.27>

33. Chen WL, Jin X, Wang M, Liu D, Luo Q, Tian H, Cai L, Meng L, Bi R, Wang L, Xie X, Yu G, Li L, Dong C, Cai Q, Jia W, Wei W, Jia L. GLUT5-mediated fructose utilization drives lung cancer growth by stimulating fatty acid synthesis and AMPK/mTORC1 signaling. *JCI Insight*. 2020 Feb 13;5(3):e131596. doi: 10.1172/jci.insight.131596. PMID: 32051337; PMCID: PMC7098789.
34. Louie SM, Roberts LS, Nomura DK. Mechanisms linking obesity and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1831(10):1499-508. doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.02.008. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23470257; PMCID: PMC3766377.
35. Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2013 Oct;52(4):585-9. doi: 10.1016/j.plipres.2013.08.005. Epub 2013 Aug 31. PMID: 24001676; PMCID: PMC4002264
36. Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell*. 2010 Jan 8;140(1):49-61. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.027. PMID: 20079333; PMCID: PMC2885975.
37. Balaban S, Shearer RF, Lee LS, van Geldermalsen M, Schreuder M, Shtein HC, Cairns R, Thomas KC, Fazakerley DJ, Grewal T, Holst J, Saunders DN, Hoy AJ. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer Metab*. 2017 Jan 13;5:1. doi: 10.1186/s40170-016-0163-7. PMID: 28101337; PMCID: PMC5237166.
38. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS, Yamada SD, Peter ME, Gwin K, Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011 Oct 30;17(11):1498-503. doi: 10.1038/nm.2492. PMID: 22037646; PMCID: PMC4157349.
39. Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):213-8. PMID: 10667561.
40. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3450-4. doi: 10.1073/pnas.050582897. PMID: 10716717; PMCID: PMC16260.

41. Magnard C, Bachelier R, Vincent A, Jaquinod M, Kieffer S, Lenoir GM, Venezia ND. BRCA1 interacts with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains. *Oncogene*. 2002 Oct 3;21(44):6729-39. doi: 10.1038/sj.onc.1205915. PMID: 12360400.
42. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Müller B, Brockmöller S, Seppänen-Laakso T, Budczies J, Bucher E, Yetukuri L, Castillo S, Berg E, Nygren H, Sysi-Aho M, Griffin JL, Fiehn O, Loibl S, Richter-Ehrenstein C, Radke C, Hyötyläinen T, Kallioniemi O, Iljin K, Oresic M. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res*. 2011 May 1;71(9):3236-45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3894. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21415164.
43. Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell*. 2010 Jan 8;140(1):49-61. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.027. PMID: 20079333; PMCID: PMC2885975.
44. Lin Ye, Bo Zhang, Elena G Seviour, Kai-xiong Tao, Xing-hua Liu, Yan Ling, Jian-ying Chen, Guo-bin Wang, Monoacylglycerol lipase (MAGL) knockdown inhibits tumor cells growth in colorectal cancer, *Cancer Letters*, Volume 307, Issue 1, 2011, Pages 6-17, ISSN 0304-3835, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.03.007>
45. Changkun Li, Li Yang, Dongfeng Zhang, Wenjie Jiang, Systematic review and meta-analysis suggest that dietary cholesterol intake increases risk of breast cancer, *Nutrition Research*, Volume 36, Issue 7, 2016, Pages 627-635, ISSN 0271-5317, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.04.009>.
46. dos Santos CR, Domingues G, Matias I, Matos J, Fonseca I, de Almeida JM, Dias S. LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion. *Lipids Health Dis*. 2014 Jan 15;13:16. doi: 10.1186/1476-511X-13-16. PMID: 24428917; PMCID: PMC3896822.
47. Guan X, Liu Z, Zhao Z, Zhang X, Tao S, Yuan B, Zhang J, Wang D, Liu Q, Ding Y. Emerging roles of low-density lipoprotein in the development and treatment of breast cancer. *Lipids Health Dis*. 2019 Jun 10;18(1):137. doi: 10.1186/s12944-019-1075-7. PMID: 31182104; PMCID: PMC6558919.
48. Sharma A, Bandyopadhyaya S, Chowdhury K, Sharma T, Maheshwari R, Das A, Chakrabarti G, Kumar V, Mandal CC. Metformin exhibited anticancer activity by lowering cellular cholesterol content in breast cancer cells. *PLoS One*. 2019 Jan 9;14(1):e0209435. doi: 10.1371/journal.pone.0209435. PMID: 30625181; PMCID: PMC6326520.
49. Weber P, Wagner M, Schneckenburger H. Cholesterol dependent uptake and interaction of doxorubicin in mcf-7 breast cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2013 Apr 16;14(4):8358-66. doi: 10.3390/ijms14048358. PMID: 23591847; PMCID: PMC3645747.

50. Yoon S, Lee MY, Park SW, Moon JS, Koh YK, Ahn YH, Park BW, Kim KS. Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2007 Sep 7;282(36):26122-31. doi: 10.1074/jbc.M702854200. Epub 2007 Jul 13. PMID: 17631500.
51. DuSell CD, Umetani M, Shaul PW, Mangelsdorf DJ, McDonnell DP. 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Mol Endocrinol*. 2008 Jan;22(1):65-77. doi: 10.1210/me.2007-0383. Epub 2007 Sep 13. PMID: 17872378; PMCID: PMC2194632.
52. Cruz P, Torres C, Ramírez ME, Epuñán MJ, Valladares LE, Sierralta WD. Proliferation of human mammary cancer cells exposed to 27-hydroxycholesterol. *Exp Ther Med*. 2010 May;1(3):531-536. doi: 10.3892/etm_00000084. Epub 2010 May 1. PMID: 22993572; PMCID: PMC3445871.
53. Wu Q, Ishikawa T, Sirianni R, Tang H, McDonald JG, Yuhanna IS, Thompson B, Girard L, Mineo C, Brekken RA, Umetani M, Euhus DM, Xie Y, Shaul PW. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep*. 2013 Nov 14;5(3):637-45. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.006. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24210818; PMCID: PMC3950897.
54. Wu Q, Ishikawa T, Sirianni R, Tang H, McDonald JG, Yuhanna IS, Thompson B, Girard L, Mineo C, Brekken RA, Umetani M, Euhus DM, Xie Y, Shaul PW. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep*. 2013 Nov 14;5(3):637-45. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.006. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24210818; PMCID: PMC3950897.
55. Tayyari F, Gowda GAN, Olopade OF, Berg R, Yang HH, Lee MP, Ngwa WF, Mittal SK, Raftery D, Mohammed SI. Metabolic profiles of triple-negative and luminal A breast cancer subtypes in African-American identify key metabolic differences. *Oncotarget*. 2018 Feb 7;9(14):11677-11690. doi: 10.18632/oncotarget.24433. PMID: 29545929; PMCID: PMC5837744.
56. Wang et al (2017) Wang J, Li M, Chen D, Nie J, Xi Y, Yang X, Chen Y, Yang Z. Expression of C-myc and β -catenin and their correlation in triple negative breast cancer. *Minerva Med*. 2017 Dec;108(6):513-517. doi: 10.23736/S0026-4806.17.05213-2. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28889723.
57. Soliman, N. A., & Yussif, S. M. (2016). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biology and Medicine*, 13(4), 496–504. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066>
58. Pan Y, Yuan Y, Liu G, Wei Y. P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. *PLoS One*. 2017 Feb 24;12(2):e0172324. doi: 10.1371/journal.pone.0172324. PMID: 28235003; PMCID: PMC5325264.

59. Giró-Perafita A, Sarrats A, Pérez-Bueno F, Oliveras G, Buxó M, Brunet J, Viñas G, Miquel TP. Fatty acid synthase expression and its association with clinico-histopathological features in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug 10;8(43):74391-74405. doi: 10.18632/oncotarget.20152. PMID: 29088795; PMCID: PMC5650350.
60. Eiriksson FF, Nøhr MK, Costa M, Bödvarsdóttir SK, Ögmundsdóttir HM, Thorsteinsdóttir M. Lipidomic study of cell lines reveals differences between breast cancer subtypes. *PLoS One*. 2020 Apr 14;15(4):e0231289. doi: 10.1371/journal.pone.0231289. PMID: 32287294; PMCID: PMC7156077.
61. Cotte AK, Aires V, Fredon M, Limagne E, Derangère V, Thibaudin M, Humblin E, Scagliarini A, de Barros JP, Hillon P, Ghiringhelli F, Delmas D. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nat Commun*. 2018 Jan 22;9(1):322. doi: 10.1038/s41467-017-02732-5. PMID: 29358673; PMCID: PMC5778070.
62. Antalis CJ, Arnold T, Rasool T, Lee B, Buhman KK, Siddiqui RA. High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;122(3):661-70. doi: 10.1007/s10549-009-0594-8. Epub 2009 Oct 23. PMID: 19851860.
63. Kloudova-Spalenkova A, Ueng YF, Wei S, Kopeckova K, Peter Guengerich F, Soucek P. Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020 Mar;197:105566. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105566. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31874216; PMCID: PMC7015808.
64. Catusus L, Gallardo A, Llorente-Cortes V, Escuin D, Muñoz J, Tibau A, Peiro G, Barnadas A, Lerma E. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is associated with proliferation and invasiveness in Her-2/neu and triple-negative breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2011 Nov;42(11):1581-8. doi: 10.1016/j.humpath.2011.01.011. Epub 2011 Apr 14. PMID: 21496869.
65. de Gonzalo-Calvo D, López-Vilaró L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vázquez T, Escuin D, Badimon L, Barnadas A, Lerma E, Llorente-Cortés V. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer*. 2015 Jun 9;15:460. doi: 10.1186/s12885-015-1469-5. PMID: 26055977; PMCID: PMC4460760.
66. Hultsch S, Kankainen M, Paavolainen L, Kovanen RM, Ikonen E, Kangaspeska S, Pietiäinen V, Kallioniemi O. Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018 Aug 24;18(1):850. doi: 10.1186/s12885-018-4757-z. PMID: 30143015; PMCID: PMC6109356.

67. Guais A, Baronzio G, Sanders E, Campion F, Mainini C, Fiorentini G, Montagnani F, Behzadi M, Schwartz L, Abolhassani M. Adding a combination of hydroxycitrate and lipoic acid (METABLOC™) to chemotherapy improves effectiveness against tumor development: experimental results and case report. *Invest New Drugs*. 2012 Feb;30(1):200-11. doi: 10.1007/s10637-010-9552-x. Epub 2010 Oct 8. PMID: 20931262.

Figure

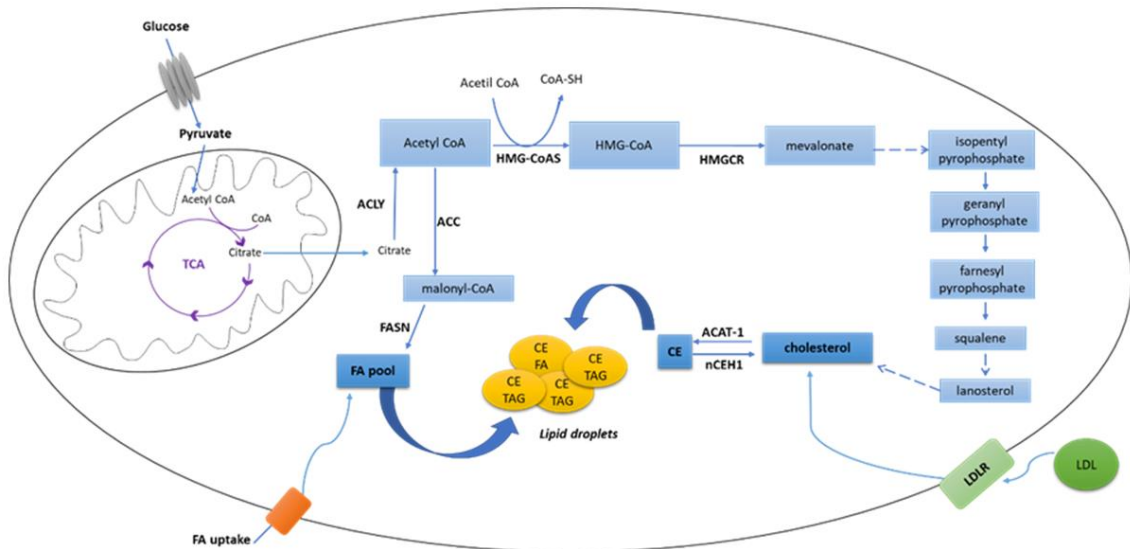


Fig. 1. An overview of the cross-link between glucose and lipid metabolism. The glycolytic pathway mainly provides citrate for acetyl-CoA production via TCA cycle. Acetyl-CoA is key molecule for fatty acid (FA) pool and cholesterol synthesis. Free cholesterol, coming from both an exogenous and endogenous source from mevalonate pathway, is esterified by ACAT-1 and stored in the form of CE in lipid droplets. Free FAs are also esterified to TAG for lipid droplet incorporation. The neutral cholesteryl ester hydrolase (nCEH) enzyme acts opposite to ACAT-1, hydrolyzing CE and generating free cholesterol and FAs.

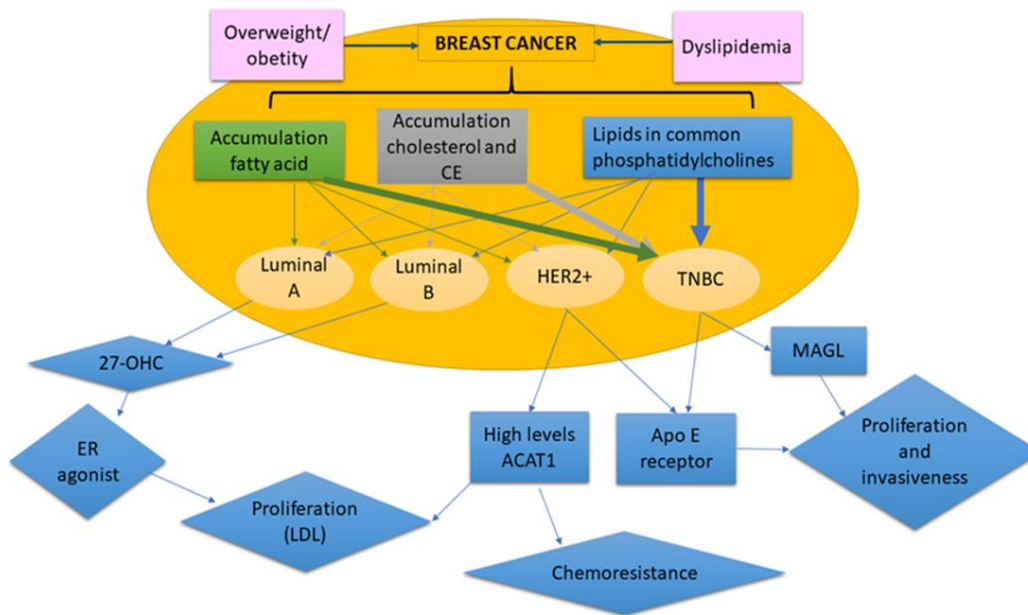


Fig. 2. Schematic profiling of integrated lipid metabolism within BC subtypes. Overall studies have suggested that general obesity and dyslipidemia are associated with an increased risk for breast cancer, resulting in accumulation of certain lipids with different magnitude in different types of breast cancer. Fatty acid, cholesterol ester (CE) and phosphatidylcholines have major role in TNBC development. The proliferation of cancer cells in the subtypes are enhanced by different key enzymes. While luminal cells are strongly modulated by the metabolite of cholesterol, 27-OHC (ER agonist), the TNBC and HER2+ cells share similar profiles being higher in ACAT-1 expression and ApoE content. Being more expressive in TBNC, MAGL can also contribute for an aggressive profile of this cancer.

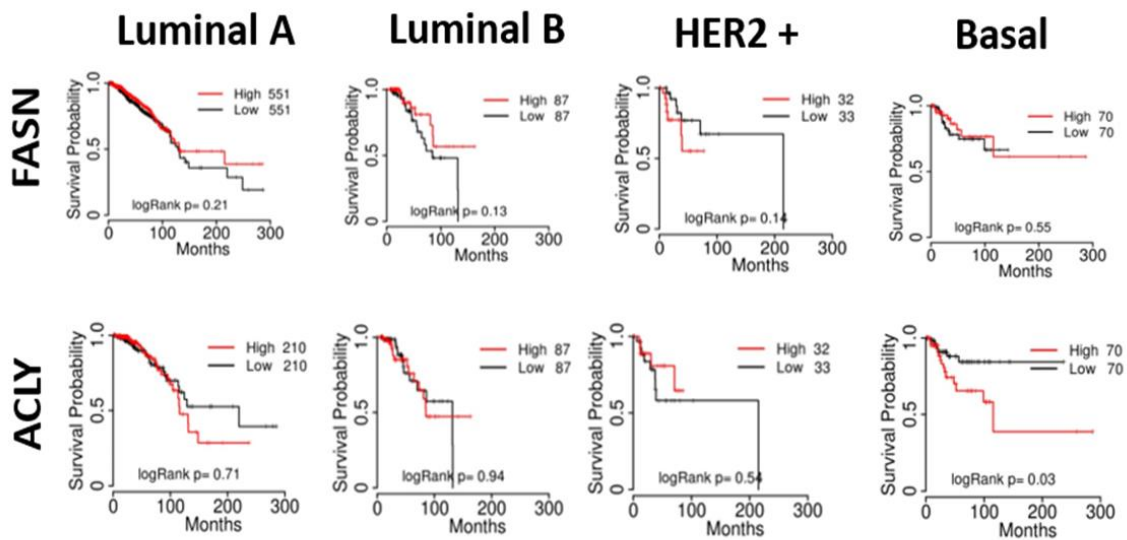


Fig. 3. Correlation of key enzymes of fatty acid metabolism and patient survival in luminal A, luminal B, HER2+ and basal BC. Kaplan-Meier survival curves were generated using the TCGA website. Patient's survival probability was compared between two groups divided at median value of protein expression as higher (red) and lower (blue) in TCGA data using Kaplan-Meier plotter with best cut-off option.

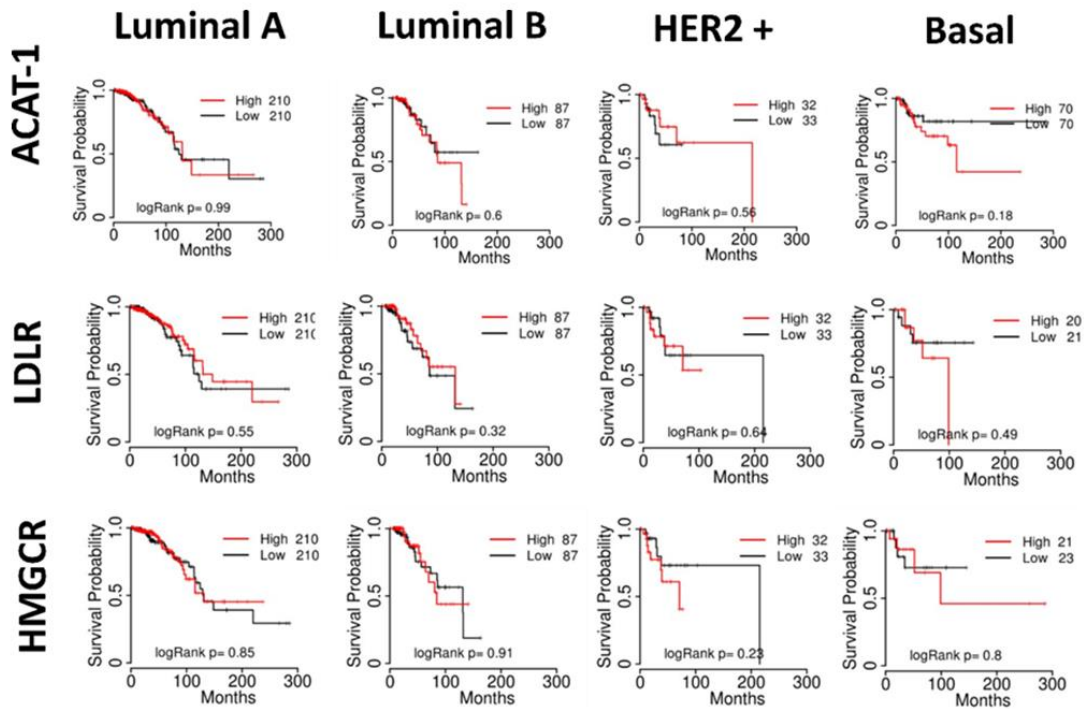


Fig. 4. Correlation of key enzymes of cholesterol metabolism and patient survival in luminal A, luminal B, HER2+ and basal BC. Kaplan-Meier survival curves were generated using the TCGA website. Patient's survival probability was compared between two groups divided at median value of protein expression as higher (red) and lower (blue) in TCGA data using Kaplan-Meier plotter with best cut-off option.

2 Comprovante de submissão do artigo II

Neoplasia

ATORVASTATIN IMPROVES CISPLATIN SENSITIVITY THROUGH MODULATION OF CHOLESTERYL ESTER HOMEOSTASIS IN BREAST CANCER CELLS –Manuscript Draft–

| | |
|------------------------------|--|
| Manuscript Number: | |
| Article Type: | Original Research Article |
| Keywords: | cisplatin; atorvastatin; cholesteryl ester; ACAT-1; chemoresistance; breast cancer |
| Corresponding Author: | Leticia Batista Azevedo Rangel Universidade Federal do Espírito Santo BRAZIL |
| First Author: | Diandra Zipinotti dos Santos |
| Order of Authors: | Diandra Zipinotti dos Santos Isabella dos Santos Guimaraes Mariam F. Hakeem-Sanni Blake J. Cochran Kerry-Anne Rye Thomas Grewal Andrew James Hoy Leticia Batista Azevedo Rangel |
| Abstract: | Acquired treatment resistance is a major problem in breast cancer management. In some cancers, alterations in lipid metabolism contribute to tumor progression and development of drug resistance. The present study aimed to identify the role of cholesteryl ester (CE) metabolism in MCF-7 and MDA-MB-231 cell response to cisplatin (CDDP) treatment in the acute setting. MCF-7 (luminal A), MDA-MB-231 (TNBC) and CDDP-resistant MDA-MB-231 (MDACR) cell lines grown in the presence or absence of CDDP in combination with atorvastatin (ATV), lipid depletion or low-density lipoprotein loading were analyzed by a variety of biochemical and radiometric techniques. We report that CDDP increased CE esterification CE in MCF-7 and MDA-MB-231. Co-administration of CDDP and ATV strongly reduced cell proliferation and viability to a greater extent than CDDP alone, especially in MDA-MB-231 cells. These findings were associated with a strong reduction in CE synthesis and storage only in MDA-MB-231. In the cisplatin-resistant MDA-MB-231 cell line MDACR, acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT-1) was upregulated. Moreover, ATV treatment restored CDDP sensitivity, suggesting that aberrant ACAT-1 expression contributes to CDDP-resistance in TNBC cells. These findings indicate that the elevated susceptibility of MDA-MB-231 cells to co-administration of CDDP and ATV, is associated with an increased reliance on CE availability. Our data from these cell culture-based studies supports upregulation of cholesterol homeostasis as an adaptive response that contributes to aggressiveness and chemotherapy resistance. |
| Suggested Reviewers: | Robson de Queiroz Monteiro Universidade Federal do Rio de Janeiro robsonqm@bioqmed.ufrj.br Christopher Ormandy University of New South Wales c.ormandy@garvan.org.au Alexander Swarbrick Garvan Institute of Medical Research a.swarbrick@garvan.org.au |
| Opposed Reviewers: | |

Research article
***ATORVASTATIN IMPROVES CISPLATIN SENSITIVITY THROUGH
MODULATION OF CHOLESTERYL ESTER HOMEOSTASIS IN BREAST
CANCER CELLS***

Diandra Zipinotti dos Santos¹, Isabella dos Santos Guimaraes², Mariam F. Hakeem-Sanni³,
Blake J. Cochran⁴, Kerry-Anne Rye⁴, Thomas Grewal⁵, Andrew J. Hoy^{3#}, Leticia B.A. Rangel^{1,6#}

¹ Biotechnology Program/RENORBIO, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil

² Division of Clinical Research, Research Center, Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, Brazil

³ School of Medical Sciences, Charles Perkins Centre, Faculty of Medicine and Health, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia.

⁴ School of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia

⁵ School of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia

⁵ Biochemistry Program, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil

⁶Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitória, Brazil

Corresponding co-authors: Andrew J. Hoy (andrew.hoy@sydney.edu.au), Leticia B.A. Rangel (lbarangel@yahoo.com),

Number of Figures: 6 primary, 4 supplementary

Word count: 4466 words for main section

Abstract

Acquired treatment resistance is a major problem in breast cancer management. In some cancers, alterations in lipid metabolism contribute to tumor progression and development of drug resistance. The present study aimed to identify the role of cholesteryl ester (CE) metabolism in MCF-7 and MDA-MB-231 cell response to cisplatin (CDDP) treatment in the acute setting. MCF-7 (luminal A), MDA-MB-231 (TNBC) and CDDP-resistant MDA-MB-231 (MDACR) cell lines grown in the presence or absence of CDDP in combination with atorvastatin (ATV), lipid depletion or low-density lipoprotein loading were analyzed by a variety of biochemical and radiometric techniques. We report that CDDP increased CE esterification CE in MCF-7 and MDA-MB-231. Co-administration of CDDP and ATV strongly reduced cell proliferation and viability to a greater extent than CDDP alone, especially in MDA-MB-231 cells. These findings were associated with a strong reduction in CE synthesis and storage only in MDA-MB-231. In the cisplatin-resistant MDA-MB-231 cell line MDACR, acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT-1) was upregulated. Moreover, ATV treatment restored CDDP sensitivity, suggesting that aberrant ACAT-1 expression contributes to CDDP-resistance in TNBC cells. These findings indicate that the elevated susceptibility of MDA-MB-231 cells to co-administration of CDDP and ATV, is associated with an increased reliance on CE availability. Our data from these cell culture-based studies supports upregulation of cholesterol homeostasis as an adaptive response that contributes to aggressiveness and chemotherapy resistance.

Key words: cisplatin, atorvastatin, cholesteryl ester, ACAT-1, chemoresistance, breast cancer

Introduction

Breast cancer (BC) is a heterogeneous disease composed of five major biological subtypes based on microarray gene classifications (SORLIE et al., 2001). Many of these subtypes can be successfully treated; however, despite well-established molecular targets in most BC subtypes, the development of drug resistance still occurs. In particular, the treatment of triple negative BC (TNBC) remains challenging due to the lack of the druggable targets estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2. As such, TNBC, as well as any other BCs that do not respond well to inhibitors of the abovementioned targets, are commonly treated with non-specific chemotherapy, like cisplatin (CDDP) (PANDY et al., 2019). However, these treatments also result in the development of resistance and disease relapse, leading to a poor prognosis of drug-resistant BCs, in particular TNBC (REDDY et al., 2018). Hence, a better understanding of BC biology, including TNBC, and the mechanisms that associate with treatment resistance to improve patient outcomes is still required.

Anomalous lipid metabolism and signaling have been implicated in oncogenesis (NAGARAJAN; BUTLER; HOY, 2021) and changes in tumor cholesterol metabolism are often associated with disease progression. In general, cholesterol homeostasis is maintained by a balance between *de novo* biosynthesis, mainly regulated by 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR), the uptake of exogenous low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol by LDL-receptor (LDLR), and esterification of endogenous as well as LDL-derived cholesterol by acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT-1). Many cancers exhibit increased lipoprotein receptor expression and activity, LDL uptake, and upregulated cholesterol synthesis and esterification (WEI et al., 2021)(GALLAGHER, E J et al., 2017). At the whole-body level, elevated LDL was associated with poor disease prognosis (KIM, Yeonju et al., 2009), elevated levels of circulating 27-hydroxycholesterol, a common oxysterol derived from cholesterol, correlated with estrogen receptor (ER)-positive BC tumor growth and metastasis (NELSON, 2018). In contrast, statin use was associated with lower BC recurrence and cancer-specific mortality (AHERN et al., 2014; ZHAO, Guodong et al., 2021). In fact, targeting key cholesterol metabolic pathways in cancer cells slowed proliferation(WEI et al., 2021), migration/invasion, and tumor size in mouse models of BC (GALLAGHER, E J et al., 2017)(WEI et al., 2021)(GALLAGHER, Emily J. et al., 2017; RAGHU et al., 2018). Altered cholesterol metabolism has also been linked to the development of treatment resistance (HOY; NAGARAJAN; BUTLER, 2021). More specifically, changes in cholesterol metabolism coincide with the development of resistance to tamoxifen in luminal A BC (HULTSCH et al., 2018), and drug resistant leukemic cell lines (SPOLITU et al., 2016; TATIDIS; MASQUELIER; VITOLS, 2002). However, the role of cholesterol metabolism in cancer cells, in particular other BC subtypes, and its potential contribution to treatment resistance against non-specific chemotherapy is less well

described and a better understanding of cholesterol metabolism and its functionalities may lead to effective therapeutic strategies.

In this study, we explored aspects of CE metabolism as potential adaptive mechanisms in response to CDDP treatment in BC cell lines. Further, we evaluated the efficacy of targeting cholesterol availability to improve CDDP sensitivity, both acutely and in CDDP-resistant cells. We hypothesize that changes in CE metabolism is an adaptive response to CDDP treatment and that cholesterol lowering using statins may improve CDDP sensitivity and can overcome CDDP resistance.

Materials and Methods

Cell culture and Reagents

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were purchased from ATCC. The CDDP-resistant cell line, MDACR, was generated in-house from its parental lineage MDA-MB-231 and selected for progressive resistance to CDDP following a protocol previously described (DOS SANTOS GUIMARÃES et al., 2018). Cells were grown in high glucose DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% v/v of Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen), 10,000 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich) under 5% CO₂, at 37°C. Lipoprotein-deficient fetal bovine serum (LPDS) was produced through ultracentrifugation of FBS as described (MENESES-SALAS et al., 2020). LDL (density 1.019-1.055 g/ml) was prepared from the plasma of healthy volunteers by three sequential density gradient ultracentrifugation in KBR gradients (RYE; GARRETY; BARTER, 1993). Pure atorvastatin (ATV) calcium salt was kindly donated by Dr. Paulo Alexandre Palacio (O2 Manipulação, Brazil). CDDP was purchased from Cayman Chemical. ATV was diluted in DMSO (final concentration \leq 1% v/v) (Sigma-Aldrich) and CDDP in phosphate buffered saline (PBS).

Cell viability

Cell viability was evaluated by the thiazolyl blue tetrazolium blue (MTT) assay performed as described previously (DOS SANTOS GUIMARÃES et al., 2018) and it was run accordingly to Carmichael (DEGRAFF; MITCHELL, 1987). Impact of lipid depletion or LDL loading on cell viability, 0.5×10^5 cells/mL were plated and incubated overnight, the seeding medium was removed and replaced with fresh medium containing 10% v/v FBS or 10% v/v LPDS for 48h. Following, 50 μ g/ml 1%v/v LDL were added to LPDS-preincubated cells for additional 24h to evaluate the recovery of cell viability in LDL-cholesterol-enriched conditions.

Cell confluency

The IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System was used to measure cell confluency according to the manufacturer's instructions. Therefore, 0.5×10^5 cells were seed in 96-well plates and incubated overnight at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂). Seeding medium was replaced the next day with fresh medium containing different concentrations of the drugs of interest or medium with 10%

v/v FBS, 10% v/v LDPS or 10% v/v LPDS + 1%v/v LDL. Cell confluency was calculated as -fold change relative to t = 0h for each treatment at 48 and 72h.

Determination of cellular CE levels

Cellular CE levels were measured using the Amplex[®] Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen). Briefly, cells were harvested, washed with PBS and an aliquot used for protein quantitation by BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific). Next, cellular lipids were extracted following the Folch extraction method (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957) and samples were prepared according to the manufacturer's protocol to measure the fluorescence at 590 nm in a microplate reader.

Determination of cholesterol esterification

Cells were incubated in high glucose DMEM containing 0.5 mM oleate, 2% w/v bovine serum albumin (BSA; Sigma), 0.2 μ Ci/ml [1-¹⁴C]-acetate and 1 μ Ci/ml [3H]-oleate (Perkin Elmer) for 4h under 5% CO₂, at 37°C. Cells were harvested and washed with PBS and lipids extracted to determine [1-¹⁴C]-acetate or ³H-oleate incorporation into the complex lipids using the Folch extraction method (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957). Intracellular lipids were resuspended in a chloroform/methanol (2:1) mixture, spiked with cholesterol and cholesteryl oleate (Sigma), and separated by thin-layer chromatography (TLC), using hexane/isopropyl ether/acetic acid (60:40:3) as the solvent system. ¹⁴C and ³H activity in cholesterol and CE bands was determined by liquid scintillation counting.

Immunoblotting

Protein extraction from cultured cells was performed as described previously (HENRIQUES et al., 2021). 30 μ g protein/sample were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Merck). Membranes were blocked for 1h at room temperature (RT) with 5% w/v BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against HMGCR (rabbit anti-HMGCR; ab174830; 1:1,000; Abcam), ACAT-1 (mouse anti-ACAT-1; sc-69836; 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), LDLR (rabbit anti-LDLR; ab52818, 1:500; Abcam), and 14-3-3 (rabbit anti-14-3-3, #8312S, 1:1000, Cell Signaling Technology). Membranes were washed, incubated for 1h with the appropriate secondary antibodies at RT, and the immunoblots were developed using enhanced chemiluminescence reagent (ECL plus; Merck). Bands were visualized using the ChemiDoc System. Densitometry of the bands was performed by ImageLab 5.2 version software (Bio-Rad Laboratories, Hercules).

Statistical analysis

All data were obtained from at least three independent experimental replicates and presented as mean \pm SEM, unless otherwise indicated. Data analysis was performed using Graphpad Prism 9.0

(GraphPad Software). Differences among groups were assessed with appropriate statistical tests, including One-Way ANOVA, Two-Way ANOVA and post-hoc tests, noted in figure legends.

Results

Effect of CDDP treatment upon MCF-7 and MDA-MB-231 proliferation and viability

To compare the cytotoxicity of CDDP in cell culture models of luminal A and TNBC cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were incubated with CDDP (2, 20, 40 μ M) and the cell viability and cell growth was determined. As expected, CDDP reduced MCF-7 and MDA-MB-231 cell viability (Figure 1A) and confluency (Figure 1B) in a dose-dependent manner. There were cell-specific differences in the magnitude of the response in cell viability by MTT, with MCF-7 cells being highly sensitive to increased CDDP concentrations (Figure 1A), but these differences between the two cell lines were not as striking when measuring cell growth by IncuCyte (Figure 1B), suggesting that metabolic rearrangements in TNBC cells could be related to CDDP-reduced cytotoxicity.

ATV enhanced the cytotoxic effect of CDDP in BC cells

Statins have shown potential to improve therapeutic outcomes of chemotherapy regimens in bladder cancer (GREIFE et al., 2015), osteosarcoma (FROMIGUÉ; HAMIDOUCHE; MARIE, 2008), liver (GUO et al., 2020), and pancreatic cancer (XIAN et al., 2017). As such, we evaluated the effect of ATV on CDDP sensitivity in BC cells. We conducted experiments combining CDDP (0.064 to 40 μ M) with 0.1 μ M ATV, which is comparable to several other pharmacokinetics studies conducted in hyperlipidemic patients (100-200 nM) (DULAK; JÓZKOWICZ, 2005) or 5 μ M ATV, which reflects the estimated IC_{50} ,

In line with the findings described above (Figure 1), CDDP alone reduced MCF-7 and MDA-MB-231 cell viability in a dose-responsive manner and the combination of CDDP+ATV was more effective than CDDP alone (Figure 2A and 2B). Interestingly, MDA-MB-231 cells were more sensitive to the combined treatment of CDDP and ATV (Figure 2B) compared to MCF-7 cells (Figure 2A). Indeed, the low dose of CDDP (0.064 μ M) together with 5 μ M ATV lowered MCF-7 cell viability to approximately 60% of control (Figure 2A). Yet, the same drug combination reduced MDA-MB-231 cell viability to only 45% and 25% of control after 48h and 72h, respectively. Additionally, we observed that the combined treatment of CDDP and 5 μ M ATV decreased the IC_{50} of CDDP by approximately 75- and 166-times after 48 h and 72 h, respectively in MDA-MB-231 cells, thus showing a robust increase in CDDP potency in this TNBC cell model upon co-treatment with ATV.

To further characterize the impact of CDDP effectiveness in the presence of ATV, we next compared cell viability using intermediate concentrations of ATV (0.1, 1, and 10 μ M) and a constant concentration of CDDP (20 μ M). The latter concentration was chosen as MDA-MB-231 cell viability was completely abolished at higher concentrations of combinatorial CDDP and ATV treatment (Figure 2B). Proliferation

of MCF-7 and MDA-MB-231 cells was decreased in the presence of CDDP and ATV (Figure 2C). Of interest, MCF-7 cell proliferation was lowered by approximately 50% at all ATV concentrations analyzed. On the other hand, MDA-MB-231 cell proliferation was affected by the combined treatment in an ATV dose-dependent manner. At both 48 h and 72 h time points, the growth inhibitory effect of 20 μ M CDDP plus 10 μ M ATV was greater in MDA-MB-231 cells (29%) than in MCF-7 cells (19%) (Figure 2C). The additive inhibitory effect of ATV with CDDP treatment on cell proliferation suggests that cholesterol metabolism is a possible adaptive mechanism to CDDP treatment in BC cells.

The differential response between MDA-MB-231 and MCF-7 cells to the combination of CDDP and ATV suggested potential inherent differences in the sensitivity to ATV and thereby cholesterol availability. To examine the effect of ATV alone on cancer cell viability and proliferation, MCF-7 and MDA-MB-231 BC cell lines were treated with increasing concentrations of ATV (0.1 μ M to 100 μ M) for 48 and 72h. ATV significantly decreased MCF-7 and MDA-MB-231 cell viability in a dose and time-dependent manner (Figure 3A). Interestingly, ATV was significantly more potent in reducing MDA-MB-231 cell viability compared to MCF-7 cells, as evidenced by the IC_{50} of ATV in MCF-7 (50 μ M) vs. MDA-MB-231 (10 μ M) at 48h. The efficacy of ATV to reduce cell viability was similar in both cell lines following 48h of drug treatment (approx. 60% vs. control), but not when cell lines were exposed to ATV for 72h, where ATV efficacy to reduce cell viability appeared higher in MDA-MB-231 cells (approx. 90% vs. control) compared to MCF-7 cells (approx. 70% vs. control, Figure 3B).

In line with the MTT data, ATV reduced MDA-MB-231 cell growth in a dose and time-responsive manner (Figure 3B). In contrast, in MCF-7, ATV did not cause a time-dependent inhibition of cell proliferation (Figure 3B). However, this was less pronounced in MCF-7 cells as ATV 10 μ M reduced MCF-7 viability to approximately 30% of control after 48h (Figure 3B). There was no notable variation on MCF-7 proliferation when the drug incubation was extended to 72h.

Cholesterol homeostasis is influenced by *de novo* cholesterol synthesis, uptake of extracellular cholesterol and CE turnover. To examine whether the effect of ATV on cell viability was due to reduced cholesterol synthesis and esterification, cells treated without or with 0.1-10 μ M ATV were cultured in media supplemented with [14 C]-acetate and [3 H]-oleate to determine cholesterol and CE synthesis. Indeed, CE content (Figure 3C) and the rate of oleate incorporation into CE (Figure 3D) was significantly decreased in both cell lines by approximately 50% after treatment with ATV compared to the control cells. These findings suggest that the reduced CE content and CE synthesis in ATV-treated cells are likely to contribute to an increased efficacy of anticancer drugs.

To explore if differences in cholesterol homeostasis between the two cell lines would extend to alterations in the handling of the physiological exogenous source of cholesterol, LDL, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were cultured in a medium supplemented with FBS or lipoprotein-depleted serum (LPDS)

in the presence or in the absence of human LDL. CE levels were approximately four times higher in MDA-MB-231 cells compared to MCF-7 cells when cultured in FBS (Figure 3E). CE levels were not altered in MCF-7 cells cultured in LPDS or in LPDS media supplemented with LDL (Figure 3E). In contrast, cellular MDA-MB-231 CE levels were reduced by 90% when cultured in LPDS containing media, which was partially restored upon LDL supplementation (Figure 3E). These results suggest MCF-7 cells exhibit compensatory mechanisms that can overcome cholesterol and lipoprotein depletion to maintain cellular cholesterol levels. On the other hand, cellular cholesterol levels in MDA-MB-231 cells are highly responsive to a lipid-depleted environment and the availability of LDL-derived cholesterol, despite having higher basal intracellular cholesterol stores.

Cholesterol availability can influence cell proliferation (RISCAL; SKULI; SIMON, 2019). Here, the growth rate of MDA-MB-231 was higher than that of MCF-7 after 96h (87% vs. 50%,) when cultivated in FBS (Figure 3F). Interestingly, both MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation kinetics were reduced when cultured in LPDS, and only MCF-7 cell proliferation was restored upon LDL supplementation and comparable to FBS-related growth kinetics (Figure 3F). These results strongly suggest that proliferation of MCF-7, but not MDA-MB-231 cells, can be stimulated by the increased supply with exogenous and LDL-derived cholesterol. Consistent with the IncuCyte results, MCF-7 cell viability was reduced by approximately 50% when cultured in LPDS compared to FCS, and partially recovered when LDL was added to LPDS-pretreated cells for additional 24h (76%; Figure 3G). Interestingly, MDA-MB-231 cell viability was comparable in FBS and LPDS-containing media but was increased by 50% when LPDS was supplemented with LDL (Figure 3G), further supporting that an LDL-rich environment is capable to increase BC growth and progression.

CDDP sensitivity is associated with cholesterol regulating proteins in BC cells

Cytotoxic chemotherapy can trigger metabolic adaptations in human tumors, and often include changes in lipid homeostasis, such as the upregulation of cholesterol synthesis, uptake and esterification (SHARMA et al., 2016b). These metabolic features are often accompanied by CE accumulation, all of which supporting cancer proliferation and survival (TOSI; TUGNOLI, 2005). Given the ability of ATV to improve CDDP efficacy in MDA-MB-231 cells (Figure 2), we next measured aspects of CE metabolism in BC cells after acute CDDP exposure. We hypothesized that differences in the expression levels of key players in cholesterol synthesis (HMGCR), cholesterol uptake (LDLR) and cholesterol esterification (ACAT-1), leading to changes in lipid metabolism, could in part explain the disparate cytotoxic effect of CDDP on BC cells proliferation and viability. The protein levels of HMGCR were 1.8-fold higher in MCF-7 cells compared to MDA-MB-231 cells, whereas LDLR (7.5-fold) and ACAT-1 (1.6-fold) were elevated in MDA-MB-231 cells compared to MCF-7 cells (Figure 4A). CDDP treatment did not alter ACAT-1 protein levels in MCF-7 or MDA-MB-231 cells (Figure 4B), whereas HMGCR protein

levels in MDA-MB-231 cells were reduced by 28% and 52% in the presence of 2 μ M and 20 μ M CDDP, respectively, but unaltered in MCF-7 cells (Figure 4C). Interestingly, LDLR protein levels were reduced in MCF-7 to 45% and 29% of control levels in response to 20 μ M and 40 μ M CDDP, respectively; however, LDLR was reduced by 27% in MDA-MB-231 cells only at the highest concentration (Figure 4D). CDDP treatment significantly increased CE levels in MCF-7 cells, and an increasing trend of CE levels was observed in MDA-MB-231 cells (Figure 4E), which was not associated with the rate of CE synthesis (Figure 4F). The fluctuation trend of CE levels in these cells could be the potential explanation for decrease the cytotoxic effect of CDDP in MDA-MB-231 because cells can rely on CE to satisfy their increased nutrient demands and to support their growth.

ATV impacted CDDP sensitivity in TNBC by regulating key enzymes involved in CE metabolism

Next, we investigated the effect of CDDP and ATV co-treatment on cholesterol metabolism in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. There was no change in the CE levels of MCF-7 cells in response to 20 μ M CDDP when combined with increasing concentrations of ATV (0.1 μ M to 10 μ M; Figure 5A), whereas CE levels in MDA-MB-231 cells were reduced to approximately 60% of control (Figure 5A). This reduction in CE levels in MDA-MB-231 cells was associated with a reduction in the cholesterol esterification rate (Figure 5B), suggesting that the reduced supply of endogenous cholesterol due to ATV exposure, but not CDDP, was responsible for this observation. Interestingly, despite the reduction in cholesterol esterification rate in MCF-7 cells co-treated with CDDP and ATV, this did not result in a reduction in total CE levels (Figure 5A). These observations suggest that MCF-7 and MDA-MB-231 cells appear to differently store and metabolize esterified cholesterol in the presence of CDDP and ATV, which could contribute to the differential anticancer drug sensitivity observed above (Figure 2).

Due to the more prominent effects of CDDP and ATV in MDA-MB-231 than in MCF-7, we next compared expression levels of LDLR, ACAT-1, and HMGCR in those cell lines when exposed to CDDP and ATV. In agreement with the previous findings that showed decreased cholesterol esterification in MDA-MB-231 cells (Figure 5B), ACAT-1 protein levels were reduced by 70% following treatment with 20 μ M CDDP and 1 μ M or 10 μ M ATV concomitantly for 24 h (Figure 5C). The combination of CDDP and ATV also downregulated the expression of LDLR (Figure 5D) and HMGCR (Figure 5E) by 50% in MDA-MB-231 cells. As CDDP acute treatment alone did not modulate the expression of ACAT-1 (Figure 4B), one might postulate an additive effect of CDDP and ATV in MDA-MB-231 cells that leads to a major deregulation of cholesterol homeostasis, compromising cholesterol uptake, synthesis, and esterification, that ultimately leads to CE depletion and cholesterol availability, resulting in increased cell death as cholesterol is a key requirement to sustain the metabolic requirements that accompanies BC progression (GÖBEL et al., 2020).

ATV re-sensitized MDACR cells to CDDP

Based on the experiments described above, implicating a combination of CDDP and AVT to modulate MCF-7 and MDA-MB-231 cell cholesterol metabolism and cell viability in the acute setting, we next examined if changes in cholesterol metabolism could represent adaptive mechanisms to CDDP treatment. To further test this hypothesis and consider the clinical challenge of treatment resistance, we investigated the effect of the combined treatment in an in-house generated CDDP-resistant cell line (MDACR) derived from the parental MDA-MB-231 lineage. The MDACR cell line exhibited a 5 to 12-fold resistance to CDDP and an IC_{50} seven times higher (88.2 μ M) than its parental cell line (12.6 μ M) (Figure 6A). Interestingly, MDACR cells also displayed a fibroblast-like phenotype (Suppl. Fig. 1), as well as cross-resistance to other chemotherapeutic drugs (Suppl. Fig. 2) but not to ATV (Suppl. Fig 3). This correlated with had a striking increase in ACAT-1 protein levels in the MDACR cell line (2.5-fold increase) compared to the parental MDA-MB-231 cells (Figure 6B). As such, we tested whether ATV treatment could modulate the CDDP-resistant phenotype in MDACR cells. In fact, ATV co-treatment re-sensitized MDACR cells to CDDP in a dose-dependent fashion (Figure 6C and 6D). Hence, administration of cholesterol-lowering statins might be a powerful approach to overcome acquired CDDP resistance.

Discussion

Treatment resistance is a major clinical challenge in BC management and contributes to poor patient outcomes (LUQUE-BOLIVAR et al., 2020). The results of this study emphasize the important role that cholesterol metabolism could play in BC progression as an adaptive mechanism in response to CDDP treatment. We showed that CDDP alters cholesterol metabolism in luminal A (MCF-7) and TNBC (MDA-MB-231) cell models, and that CDDP together with ATV reduced cell proliferation and cell viability to a greater extent than CDDP alone, especially in MDA-MB-231 cells. The combination of CDDP and ATV dramatically altered cell cholesterol metabolism, in particular in MDA-MB-231 cells. These findings indicate that the elevated susceptibility of MDA-MB-231 cells to co-administration of CDDP and ATV, compared to MCF-7 cells, was associated with an increased reliance on CE availability. Moreover, ATV restored CDDP sensitivity in CDDP-resistant MDA-MB-231 cells. Collectively, our data implicate the upregulation of cholesterol homeostasis as an adaptive response that contributes to chemotherapy resistance.

Recently, CDDP has been used in the neoadjuvant setting against TNBC (BAEK et al., 2020). However, despite the initial successful response to platinum-based chemotherapy, TNBC often relapses aggressively. Thus, CDDP resistance is a limitation of chemotherapy (HILL et al., 2019). Herein, MDA-MB-231 was intrinsically more resistant to CDDP than MCF-7, concerning cancer cell's metabolic cell viability (Figure 1). This was the first hint that CDDP possibly acts differentially in triple-negative cell metabolism. In this regard, cholesterol metabolism has been targeted in BC treatment as noted by

ongoing clinical trials, of which over 40 trials are testing the effects of statins in BC (clinicaltrials.gov). Of these, two are evaluating the benefits of ATV in association with conventional chemotherapy in TNBC patients (NCT03358017; NCT03872388). Nonetheless, whether cholesterol metabolism contributes to the development of chemoresistance towards CDDP in TNBC cells remains unexplored.

In the past decades, many studies have shown that chemotherapeutic drugs can lead to metabolic disorders in patients, including changes in serum lipids and lipoproteins (ALEXOPOULOS et al., 1992; SHARMA et al., 2016a). Mice treated repeatedly with paclitaxel and CDDP had increased cholesterol circulating levels (WANG, Guoping; SU; YIN, 2017). Lei Zheng et al (ZHENG et al., 2018) detected 19 differentially expressed genes in CDDP-resistant ovarian cancer cells. Of this, SREBP2, LDLR, and HMGCR were increased, suggesting that alteration of cholesterol metabolism might contribute to CDDP resistance in ovarian cancer (ZHENG et al., 2018). While acute CDDP exposure decreased LDLR protein levels in both cell models studied in the present work, a reduction in HMGCR levels was observed only in MDA-MB-231, suggesting the occurrence of cancer cell type-specific changes in cholesterol handling and CE synthesis. Given a trend of increased ACAT-1 expression, concomitantly with higher CE content after CDDP treatment, this enzyme plays an important role in triggering metabolic changes in BC cells, contributing to the high proliferation rate of MDA-MB-231 and different responses to anti-cancer therapy.

Because cancer cells may use metabolic reprogramming to utilize lipid metabolism for tumor development and progression, targeting these pathways by a combination of low-toxic compounds may be an alternative therapeutic intervention. Emerging evidence has suggested that a decrease of CE accumulation via ACAT-1 inhibition appeared to significantly improve chemotherapy in melanoma (LI, Man et al., 2018). Moreover, reducing fatty acid metabolism by inhibiting fatty acid synthase (FASN), enhanced the response to CDDP and sensitized resistant ovarian and mammary cells to CDDP (PAPAEVANGELOU et al., 2018; WARMOES et al., 2013). In BC models FASN inhibition improved doxorubicin, docetaxel, paclitaxel, and vinorelbine chemotherapy (GIRÓ-PERAFITA et al., 2016; HEUER et al., 2017). In this study, the reduction of cholesterol esterification in MDA-MB-231 cells following exposure to combined treatment with CDDP and ATV resulted in the inhibition of all key proteins involved in CE formation (Figure 5), highlighting the potential significance of improving CDDP response with ATV in the fight against TNBC.

Multiple mechanisms have been associated with the acquisition of the chemoresistant phenotype by cancer cells, including drug inactivation, drug efflux, apoptosis suppression, increased DNA repair (HILL et al 2019). However, the role of CE metabolism in CDDP resistance in BC cells remains unclear. In addition, obese patients were more prone to develop BC with worse clinical outcomes than non-obese

patients treated under identical cytotoxic protocols (CHEN et al., 2012). Thus, cholesterol and CE can play a critical role in the tumor microenvironment, and influence cell behavior and response to CDDP. In agreement with the metabolic distinct pathways among the lineages studied, MCF-7 and MDA-MDA-231, they displayed differential expression of ACAT-1, LDLR, and HMGCR (Figure 4A). Moreover, BC cells seem to have distinct CE etiology so that most of the CE supply in TNBC models like MDA-MB-231 requires elevated ACAT-1 activity and overexpression of LDLR while, in MCF-7, cholesterol and CEs are mostly provided by the cholesterol synthesis route, requiring elevated HMGCR activity. Cholesterol homeostasis is fine-tuned and regulated by feedback mechanisms that allow elevated free cholesterol levels to activate ACAT-1 to catalyze its esterification and storage, while simultaneously inhibiting HMGCR (BROWN; RADHAKRISHNAN; GOLDSTEIN, 2018). We also showed that the free cholesterol (Suppl. Fig 4), is substantially higher in MDA-MB-231 when compared to MCF-7 (Suppl. Fig 4) Also, our findings suggest a shift towards cholesterol production by TNBC cells under cholesterol deprivation, allowing them to recover efficiently from this condition. Because TNBC cells overexpress ACAT-1 coupled with a higher growth rate, it is reasonable to suppose that CE is hydrolyzed to produce cholesterol, reducing the pool of intracellular CE, and sustaining cell proliferation.

The regulation of cholesterol homeostasis in the various BC subtypes and its contribution to resistance against therapy remains to be fully understood. Previous studies conducted in tumor tissue samples demonstrated a positive correlation between CE content and worse patients' clinicopathological parameters, such as the occurrence of high-grade tumors (DE GONZALO-CALVO et al., 2015b). Indeed, TNBC specimens expressed higher levels of LDLR and ACAT-1, and display elevated intratumoral CE levels than Luminal A BC (DE GONZALO-CALVO et al., 2015b). However, no difference in HMGCR mRNA levels were found between the BC subtypes by the forementioned authors, diverging from our study. Furthermore, previous microarray studies also demonstrated that basal-like BC overexpress ACAT-1, thus corroborating our results (FARMER et al., 2005; VAN DE VIJVER et al., 2002). Nonetheless, our data point to the fact that ACAT-1 expression is greater in MDA-MB-231 chronically exposed to CDDP treatment (MDACR), as patients are submitted in the oncology clinic setting. Remarkably, as shown here, ATV re-sensitized MDACR cells to CDDP. Fromigué et al (FROMIGUÉ; HAMIDOUCHE; MARIE, 2008) suggested that high doses of ATV increased drug sensitivity through the modulation of cellular matrix metalloprotease 2 in osteosarcoma cells. On the other hand, Guo and collaborators (GUO et al., 2020) showed that liver cancer cells (Huh-7) became more sensitive to CDDP in the presence of 100 μ M ATV. To the best of our knowledge, this is the first work to correlate the modulation of ACAT-1 expression by CDDP plus ATV in MDA-MB-231 BC cells, using a low range of concentration of ATV. Moreover, our study is the first to demonstrate the importance of ACAT-1 and cholesterol availability in the acquisition of chemoresistance to CDDP in a TNBC cell model. Considering that inhibition of

ACAT-1 was a possible mechanism for the enhanced anti-tumor activity of the drug combination (CDDP+ATV) in MDA-MB-231, it is possible that the enhanced CDDP activity by ATV in MDACR also results from downregulation of ACAT-1.

In summary, this study has identified cholesterol metabolism as an adaptive mechanism to overcome cytotoxicity of CDDP in luminal A and TNBC cell lines and that ATV co-treatment restores CDDP sensitivity in a TNBC drug-resistant cell line. These findings further support concepts targeting cholesterol metabolism, which is safe and cost-effective, as adjuvant therapy for platinum-based chemotherapeutics in BC.

Abbreviations

ACAT-1: acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1; ATV: atorvastatin; BC: breast cancer; CE: cholesteryl ester; CDDP: cisplatin; FBS: fetal bovine serum; HMGCR: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; LDL: low-density lipoprotein; LDLR: low-density lipoprotein receptor; LPDS: lipoprotein-deplete serum; MTT: thiazolyl blue tetrazolium blue; TNBC: triple negative breast cancer.

Statements

Acknowledgments

We thank Pharmacist Paulo Palácio for providing Atorvastatin. Jaimy Jose for the support with the LPDS production.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil – Finance Code 001. AJH is supported by a Robinson Fellowship and funding from the University of Sydney.

Author Contributions

D.Z.S performed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. I.G.S and M.H responsible for data collection. KA. R supplied the LDL used in experiments. T.G provided expertise and intellectual input. A.J.H and L.B.A.R. supervised all studies and the drafting of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Data Availability Statement

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary material.

References

- ABDEL-HAFIZ, Hany. Epigenetic Mechanisms of Tamoxifen Resistance in Luminal Breast Cancer. **Diseases**, v. 5, n. 3, p. 16, 6 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-9721/5/3/16>>.
- ABE, RIKIYA et al. Biological Characteristics of Breast Cancer in Obesity. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 120, n. 4, p. 351–359, 1976. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem1920/120/4/120_4_351/_article>.
- ACHEAMPONG, Teofilia et al. Incidence Trends of Breast Cancer Molecular Subtypes by Age and Race/Ethnicity in the US From 2010 to 2016. **JAMA Network Open**, v. 3, n. 8, p. e2013226, 17 ago. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2769316>>.
- AFONSO, Milessa Silva et al. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 760, 13 jun. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/10/6/760>>.
- AHERN, Thomas P et al. Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 10, p. e461–e468, set. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204514701196>>.
- AL-AZRI, Mohammed et al. Psychosocial Impact of Breast Cancer Diagnosis Among Omani Women. **Oman Medical Journal**, v. 29, n. 6, p. 437–444, 15 nov. 2014. Disponível em: <http://www.omjournal.org/fulltext_PDF.aspx?DetailsID=590&type=fulltext>.
- AL-THOUBAITY, Fatma Khinaifis. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 49, p. 44–48, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S204908011930192X>>.
- ALDOSSARY, Sara A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 07–15, 28 mar. 2019. Disponível em: <<http://biomedpharmajournal.org/vol12no1/review-on-pharmacology-of-cisplatin-clinical-use-toxicity-and-mechanism-of-resistance-of-cisplatin/>>.
- ALEXOPOULOS, C. G. et al. Changes in serum lipids and lipoproteins in cancer patients during chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 30, n. 5, p. 412–416, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00689971>>.
- ALLURI, Prasanna; NEWMAN, Lisa A. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 567–77, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882351>>.
- ANOTHASINTAWEE, Thunyarat et al. Effect of Lipophilic and Hydrophilic Statins on Breast Cancer Risk in Thai Women: A Cross-sectional Study. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 9, p. 1163–1168, 2016. Disponível em: <<http://www.jcancer.org/v07p1163.htm>>.
- ARIMIDEX, TAMOXIFEN, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. **The Lancet. Oncology**, v. 9, n. 1, p. 45–53, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083636>>.
- BAANDRUP, L et al. Statin use and risk for ovarian cancer: a Danish nationwide case–control study. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 1, p. 157–161, 13 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc2014574>>.
- BADANA, Anil et al. Lipid Raft Integrity Is Required for Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells. **Journal of Breast Cancer**, v. 19, n. 4, p. 372, 2016. Disponível em: <<https://ejbc.kr/DOIx.php?id=10.4048/jbc.2016.19.4.372>>.
- BAEK, Dong Won et al. Impressive effect of cisplatin monotherapy on a patient with heavily pretreated triple-negative breast cancer with poor performance. **Yeungnam University Journal of Medicine**, v. 37, n. 3, p. 230–235, 31 jul. 2020. Disponível em: <<http://e-yujm.org/journal/view.php?doi=10.12701/yujm.2019.00423>>.
- BARBALATA, Cristina I et al. Statins in risk-reduction and treatment of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 8, p. 573–588, 24 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v11/i8/573.htm>>.
- BARECHE, Y et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 895–902, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29365031>>.
- BECKWITT, Colin H.; SHIRAHARA, Keisuke; WELLS, Alan. Lipophilic statins limit cancer cell growth and survival, via involvement of Akt signaling. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197422, 15 maio 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0197422>>.
- BEDI, Onkar et al. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 7, p. 695–712, 5 jul. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00210-016-1252-4>>.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S; VASSEUR, S; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e189–e189, 25 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/oncsis201549>>.

BENGTSSON, Erik et al. HMG-CoA reductase expression in primary colorectal cancer correlates with favourable clinicopathological characteristics and an improved clinical outcome. **Diagnostic Pathology**, v. 9, n. 1, p. 78, 2014. Disponível em: <<http://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1596-9-78>>.

BLUM, A.; SHAMBUREK, R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 2, p. 325–330, abr. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915008006059>>.

BONSU, Kwadwo Osei; REIDPATH, Daniel Diamond; KADIRVELU, Amudha. Effects of Statin Treatment on Inflammation and Cardiac Function in Heart Failure: An Adjusted Indirect Comparison Meta-Analysis of Randomized Trials. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 33, n. 6, p. 338–346, dez. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-5922.12150>>.

BORGES, Tatiane Oliveira et al. Avaliação da taxa de positividade do receptor HER2 e da influência de três tipos de biópsia mamária no resultado imunohistoquímico em mulheres com câncer de mama invasivo no Hospital Universitário de Brasília. **Rev Bras Mastologia**, v. 22, n. 3, p. 83–89, 2012.

BRANDI, Jessica et al. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 310–322, jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916304419>>.

BRASÓ-MARISTANY, Fara et al. Phenotypic changes of HER2-positive breast cancer during and after dual HER2 blockade. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 385, 20 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-019-14111-3>>.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>>.

BRAY, Freddie; MCCARRON, Peter; PARKIN, D Maxwell. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 229, 26 dez. 2004. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr932>>.

BRINDISI, Matteo et al. Cholesterol and Mevalonate: Two Metabolites Involved in Breast Cancer Progression and Drug Resistance through the ERR α Pathway. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1819, 31 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/8/1819>>.

BROWN, Michael S.; RADHAKRISHNAN, Arun; GOLDSTEIN, Joseph L. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 783–807, 20 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-062917-011852>>.

BUCHTA ROSEAN, Claire et al. Preexisting Commensal Dysbiosis Is a Host-Intrinsic Regulator of Tissue Inflammation and Tumor Cell Dissemination in Hormone Receptor–Positive Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 14, p. 3662–3675, 15 jul. 2019. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-18-3464>>.

BURKBAUER, Laura et al. Obesity and Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 231, n. 4, p. S38–S39, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751520305925>>.

CAREY, L. A. et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329–2334, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>>.

CAREY, Lisa A. et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329–2334, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>>.

CAREY, Lisa A et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 21, p. 2615–23, 20 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665533>>.

CASTILLO, Jorge J. et al. Relationship between obesity and clinical outcome in adults with acute myeloid leukemia: A pooled analysis from four CALGB (alliance) clinical trials. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 2, p. 199–204, fev. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.24230>>.

CEDRAZ, Isaac Santiago; LAVORATO, Stefânia Neiva. Fármacos utilizados no tratamento de hipercolesterolemia: uma análise histórica e químico-medicinal. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 8983–9004, 2020a. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/13689/11461>>.

- _____. Fármacos utilizados no tratamento de hipercolesterolemia: uma análise histórica e químico-medicinal. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 8983–9004, 2020b.
- CHAN, Kelvin K W; OZA, Amit M; SIU, Lillian L. The statins as anticancer agents. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 10–9, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538446>>.
- CHEANG, Maggie C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 20 maio 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djp082>>.
- CHEN, Sheng et al. Obesity or Overweight Is Associated with Worse Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy among Chinese Women with Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41380, 25 jul. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041380>>.
- CILLA, Donald D. et al. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 60, n. 6, p. 687–695, dez. 1996. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1016/S0009-9236\(96\)90218-0](http://doi.wiley.com/10.1016/S0009-9236(96)90218-0)>.
- CLAVEL-CHAPELON, F; GERBER, M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? **Breast cancer research and treatment**, v. 72, n. 2, p. 107–15, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038701>>.
- COLLETT, K. A Basal Epithelial Phenotype Is More Frequent in Interval Breast Cancers Compared with Screen Detected Tumors. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 5, p. 1108–1112, 1 maio 2005. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-04-0394>>.
- D'AQUILA, Theresa; ZEMBROSKI, Alyssa S.; BUHMAN, Kimberly K. Diet Induced Obesity Alters Intestinal Cytoplasmic Lipid Droplet Morphology and Proteome in the Postprandial Response to Dietary Fat. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 5 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.00180/full>>.
- DALHAIMER, Paul. Lipid Droplets in Disease. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 974, 26 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/974>>.
- DARVIN, Pramod et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, p. 1–11, 13 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s12276-018-0191-1>>.
- DE GONZALO-CALVO, David et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 460, 9 dez. 2015a. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1469-5>>.
- _____. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 460, 9 dez. 2015b. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1469-5>>.
- DE TALHOUE, Solene et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7073, 27 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-020-63759-1>>.
- DEES, Sundee et al. Emerging CAR-T Cell Therapy for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 12, p. 2409–2421, dez. 2020. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-20-0385>>.
- DEGRAFF, William G.; MITCHELL, James B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity. **Cancer Research**, v. 47, n. 4, p. 943–946, 1987.
- DENT, R. et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 1 ago. 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>>.
- DESMEDT, Christine et al. Differential Benefit of Adjuvant Docetaxel-Based Chemotherapy in Patients With Early Breast Cancer According to Baseline Body Mass Index. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 25, p. 2883–2891, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.19.01771>>.
- DIGNAM, J. J. Obesity, Tamoxifen Use, and Outcomes in Women With Estrogen Receptor-Positive Early-Stage Breast Cancer. **Cancer Spectrum Knowledge Environment**, v. 95, n. 19, p. 1467–1476, 1 out. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djg060>>.
- DITSCH, Nina et al. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2019. **Breast Care**, v. 14, n. 4, p. 224–245, 2019. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/501000>>.
- DOGRA, Atika; MEHTA, Anurag; DOVAL, Dinesh Chandra. Are Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancers Really Different? **Journal of Oncology**, v. 2020, p. 1–9, 16 mar. 2020. Disponível em:

<<https://www.hindawi.com/journals/jo/2020/4061063/>>.

DOS SANTOS GUIMARÃES, Isabella et al. Chemosensitizing effects of metformin on cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 409–417, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734114017304188>>.

DUIJF, Pascal H.G. et al. Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 7, p. 595–611, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491419300905>>.

DULAK, József; JÓZKOWICZ, Alicja. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. **Current cancer drug targets**, v. 5, n. 8, p. 579–94, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1391922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ECKSTEIN, Niels. Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 91, 4 dez. 2011. Disponível em: <<https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-30-91>>.

ENDO, Akira. A historical perspective on the discovery of statins. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 5, p. 484–493, 2010. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/86/5/86_5_484/_article>.

ENDO, Akira. Discovery and Development of Statins. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 8, p. 1934578X1701200, 1 ago. 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1701200801>>.

FAIROOZY, Roaa Hani et al. Identifying LDL-C associated variants in the Annexin a2 (ANXA2) gene. **Atherosclerosis**, v. 263, p. e20, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915017303398>>.

FALLONE, Frédérique et al. Cancer du sein, obésité et tissu adipeux. **médecine/sciences**, v. 34, n. 12, p. 1079–1086, 9 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.medicinesciences.org/10.1051/medsci/2018298>>.

FARMER, Pierre et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660–4671, 9 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1208561>>.

FARWELL, W. R. et al. The Association Between Statins and Cancer Incidence in a Veterans Population. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 2, p. 134–139, 16 jan. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djm286>>.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, p. ijc.31937, 6 dez. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.31937>>.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FOLLET, J et al. The association of statins and taxanes: an efficient combination trigger of cancer cell apoptosis. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 4, p. 685–692, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc20126>>.

FROMIGUÉ, Olivia; HAMIDOUCHE, Zahia; MARIE, Pierre J. Statin-Induced Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Sensitizes Human Osteosarcoma Cells to Anticancer Drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 2, p. 595–600, maio 2008. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.108.136127>>.

GAARD, Maria; TRETTLI, Steinar; URDAL, Petter. Risk of breast cancer in relation to blood lipids: a prospective study of 31,209 Norwegian women. **Cancer Causes & Control**, v. 5, n. 6, p. 501–509, nov. 1994. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01831377>>.

GALLAGHER, E J et al. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. **Oncogene**, v. 36, n. 46, p. 6462–6471, nov. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/onc2017247>>.

GALLAGHER, Emily J. et al. Abstract 1004: LDLR knockdown reduces the growth of Her2 overexpressing breast cancer in mouse models of hyperlipidemia. 1 jul. 2017, [S.l.]: American Association for Cancer Research, 1 jul. 2017. p. 1004–1004. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2017-1004>>.

GARUTTI, Mattia et al. Platinum salts in patients with breast cancer: A focus on predictive factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 2019.

GIRÓ-PERAFITA, Ariadna et al. Preclinical Evaluation of Fatty Acid Synthase and EGFR Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 18, p. 4687–4697, 15 set. 2016. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-3133>>.

GLUCHOWSKI, Nina L. et al. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 343–355, 21 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.32>>.

GÖBEL, Andy et al. Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1873, n. 2, p. 188351, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X1930174X>>.

GONG, Yue et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 51- 64.e9, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413120305453>>.

GREIFE, Annemarie et al. Establishment and characterization of a bladder cancer cell line with enhanced doxorubicin resistance by mevalonate pathway activation. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3293–3300, 8 maio 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-014-2959-9>>.

GREWAL, Thomas et al. Desialylated LDL uptake in human and mouse macrophages can be mediated by a lectin receptor. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 151–163, mar. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915095057153>>.

GUO, Liwen et al. Atorvastatin potentiates the chemosensitivity of human liver cancer cells to cisplatin via downregulating YAP1. **Oncology Letters**, v. 21, n. 2, p. 82, 1 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.12343>>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: The next generation**. **Cell**. [S.l.: s.n.], 2011

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616318918>>.

HAUGNES, H.S. et al. Components of the metabolic syndrome in long-term survivors of testicular cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 2, p. 241–248, fev. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419375969>>.

HEGEDŰS, Csaba; VIRÁG, László. Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: Relevance to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 2, p. 978–982, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231714000937>>.

HENRIQUES, Taciane Barbosa et al. Inhibition of CXCR2 plays a pivotal role in re-sensitizing ovarian cancer to cisplatin treatment. **Aging**, v. 13, n. 10, p. 13405–13420, 31 maio 2021. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.203074>>.

HENSLEE, Austin B.; STEELE, Timothy A. Combination statin and chemotherapy inhibits proliferation and cytotoxicity of an aggressive natural killer cell leukemia. **Biomarker Research**, v. 6, n. 1, p. 26, 9 dez. 2018. Disponível em: <<https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-018-0140-0>>.

HERSHEY, Benjamin J. et al. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 87, 29 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/9/1/87>>.

HEUER, Timothy S. et al. FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Ex. **EBioMedicine**, v. 16, p. 51–62, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396416305916>>.

HILL, David P. et al. Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: Multiple mechanisms of resistance. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

HINZEY, Adam et al. Breast cancer and social environment: getting by with a little help from our friends. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 54, 26 dez. 2016. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-016-0700-x>>.

HOY, Andrew J.; NAGARAJAN, Shilpa R.; BUTLER, Lisa M. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity. **Nature Reviews Cancer**, 20 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41568-021-00388-4>>.

HUANG, Binlu; SONG, Bao liang; XU, Chenqi. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 132–141, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42255-020-0174-0>>.

HUBALEK, Michael; CZECH, Theresa; MÜLLER, Hannes. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. **Breast Care**, v. 12, n. 1, p. 8–14, 2017. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/455820>>.

HULTSCH, Susanne et al. Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 850, 24 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4757-z>>.

HØYER, Annette Pernille; ENGHOLM, Gerda. Serum lipids and breast cancer risk: a cohort study of 5,207 Danish women. **Cancer Causes and Control**, v. 3, n. 5, p. 403–408, set. 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00051352>>.

IGNATIADIS, Michail; SOTIRIOU, Christos. Luminal breast cancer: from biology to treatment. **Nature Reviews Clinical**

Oncology, v. 10, n. 9, p. 494–506, 23 set. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2013.124>>.

IKONEN, Elina. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 125–138, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2336>>.

INIC, Zorka et al. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 8, p. CMO.S18006, 11 jan. 2014. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/CMO.S18006>>.

INWALD, E. C. et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 2, p. 539–552, 16 jun. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-013-2560-8>>.

IORFIDA, Monica et al. Invasive lobular breast cancer: subtypes and outcome. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 2, p. 713–723, 8 jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-012-2002-z>>.

JÄÄSKELÄINEN, Anniina et al. High Parity Predicts Poor Outcomes in Patients With Luminal B-Like (HER2 Negative) Early Breast Cancer: A Prospective Finnish Single-Center Study. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 14 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.01470/full>>.

JOHANSSON, Anna L.V. et al. Breast cancer-specific survival by clinical subtype after 7 years follow-up of young and elderly women in a nationwide cohort. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 6, p. 1251–1261, 15 mar. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31950>>.

JOHNSON, J. A. et al. Diabetes and cancer (1): evaluating the temporal relationship between type 2 diabetes and cancer incidence. **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1607–1618, 4 jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00125-012-2525-1>>.

JONES, Hannah M. et al. Atorvastatin exhibits anti-tumorigenic and anti-metastatic effects in ovarian cancer in vitro. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 12, p. 2478–2490, 2017.

JORDAN, Craig T.; GUZMAN, Monica L.; NOBLE, Mark. Cancer Stem Cells. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 12, p. 1253–1261, 21 set. 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra061808>>.

KHOURY, Adonice et al. Pertuzumab and trastuzumab infusion related cytokine release syndrome in a chemotherapy naive patient with metastatic breast cancer. **The Breast Journal**, v. 24, n. 3, p. 383–384, maio 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tbj.12943>>.

KIM, Soochi et al. Activation of LXR α/β by cholesterol in malignant ascites promotes chemoresistance in ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1232, 10 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-5152-5>>.

KIM, Yeonju et al. Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol and Breast Cancer Risk by Menopausal Status, Body Mass Index, and Hormonal Receptor in Korea. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 2, p. 508–515, fev. 2009. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-08-0133>>.

KOREN, Michael J.; FELDMAN, Theodore; MENDES, Robert A. Impact of High-Dose Atorvastatin in Coronary Heart Disease Patients Age 65 to 78 Years. **Clinical Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 256–263, maio 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clc.20448>>.

KORKMAZ, A.; TOPAL, T.; OTER, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 303–312, 15 set. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10565-006-0078-0>>.

KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B et al. Cancer drug development: The missing links. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 8, p. 663–689, 8 maio 2019. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370219839163>>.

LAKE, Diana E; HUDIS, Clifford A. High-Dose Chemotherapy in Breast Cancer. **Drugs**, v. 64, n. 17, p. 1851–1860, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2165/00003495-200464170-00001>>.

LALLOO, F; EVANS, D G. Familial Breast Cancer. **Clinical Genetics**, v. 82, n. 2, p. 105–114, ago. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.2012.01859.x>>.

LARSSON, Susanna C.; MANTZOROS, Christos S.; WOLK, Alicja. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 4, p. 856–862, 15 ago. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22717>>.

LEHMANN, Brian D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 16 jun. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157368>>.

LI, Changkun et al. Systematic review and meta-analysis suggest that dietary cholesterol intake increases risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 36, n. 7, p. 627–635, jul. 2016. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531716300264>>.

LI, Hsin-Hua; LIN, Chih-Li; HUANG, Chien-Ning. Neuroprotective effects of statins against amyloid β -induced neurotoxicity. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 2, p. 198, 2018. Disponível em: <<http://www.nrroonline.org/text.asp?2018/13/2/198/226379>>.

LI, Man et al. Enhanced chemo-immunotherapy against melanoma by inhibition of cholesterol esterification in CD8+ T cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 8, p. 2541–2550, nov. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963418305124>>.

LI, Ying Chun et al. Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 1107–1118, abr. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010626909>>.

LIAO, Ai-Ho et al. Synergistic effects of combined treatment with ultrasound-mediated cisplatin-loaded microbubbles and atorvastatin on head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 43, n. 1, p. 15–26, 21 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.26445>>.

LIEDTKE, Cornelia et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1275–1281, 10 mar. 2008. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.14.4147>>.

LIGIBEL, Jennifer. Obesity and breast cancer. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 25, n. 11, p. 994–1000, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22106549>>.

LLAVERIAS, Gemma et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 1, p. 402–12, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224077>>.

LOFTERØD, Trygve et al. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 654, 15 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4568-2>>.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc1074>>.

LONGO, Joseph et al. Statins as Anticancer Agents in the Era of Precision Medicine. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 22, p. 5791–5800, 15 nov. 2020. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-20-1967>>.

LU, Han-hong et al. [Effects of anastrozole on lipid metabolism in Chinese postmenopausal women with breast cancer]. **Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]**, v. 33, n. 7, p. 520–5, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093630>>.

LUQUE-BOLIVAR, Andrea et al. Resistance and Overcoming Resistance in Breast Cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. Volume 12, p. 211–229, nov. 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/resistance-and-overcoming-resistance-in-breast-cancer-peer-reviewed-article-BCTT>>.

MA, Xingzhe et al. Cholesterol Induces CD8+ T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 143–156.e5, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311930186X>>.

MALHOTRA, Gautam K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 15 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.10.10.13879>>.

MARUPUDI, Neena I et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, n. 5, p. 609–621, 18 set. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14740338.6.5.609>>.

MASUDA, Takaaki et al. Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. **Cancer Science**, v. 111, n. 4, p. 1039–1046, 11 abr. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.14318>>.

MATUSEWICZ, Lucyna; CZOGALLA, Aleksander; SIKORSKI, Aleksander F. Attempts to use statins in cancer therapy: An update. **Tumor Biology**, v. 42, n. 7, p. 101042832094176, 14 jul. 2020. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428320941760>>.

MAUGHAN, Karen L; LUTTERBIE, Mark A; HAM, Peter S. Treatment of breast cancer. **American family physician**, v. 81, n. 11, p. 1339–46, 1 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521754>>.

MCNAMARA, D.J. CHOLESTEROL | Sources, Absorption, Function and Metabolism. **Encycl. Hum. Nutr.** [S.l.]: Elsevier, 2005. p. 379–385. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122266943000570>>.

MELVIN, Jennifer C. et al. Lipid Profiles and Risk of Breast and Ovarian Cancer in the Swedish AMORIS Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 21, n. 8, p. 1381–1384, ago. 2012. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-12-0188>>.

MENESES-SALAS, Elsa et al. Annexin A6 modulates TBC1D15/Rab7/StARD3 axis to control endosomal cholesterol export in NPC1 cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 2839–2857, 29 jul. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-019-03330-y>>.

MENTOOR, Ilze et al. Chemoresistance: Intricate Interplay Between Breast Tumor Cells and Adipocytes in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 11 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00758/full>>.

MIGLIORETTI, Diana L. et al. Radiation-Induced Breast Cancer Incidence and Mortality From Digital Mammography Screening. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 4, p. 205, 16 fev. 2016. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/M15-1241>>.

MILLER, Todd W et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 7, p. 2406–13, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530877>>.

MOLLINEDO, Faustino; GAJATE, Consuelo. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 5, p. 611–635, maio 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520436132>>.

MORGAN, Steve et al. The cost of drug development: A systematic review. **Health Policy**, v. 100, n. 1, p. 4–17, abr. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168851010003659>>.

MOSERLE, Lidia et al. Side population and cancer stem cells: Therapeutic implications. **Cancer Letters**, v. 288, n. 1, p. 1–9, fev. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383509003723>>.

MYLAVARAPU, Sanghamitra; DAS, Asmita; ROY, Monideepa. Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 5 fev. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00016/full>>.

NAGARAJAN, Shilpa R.; BUTLER, Lisa M.; HOY, Andrew J. The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism. **Cancer & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 2, 7 dez. 2021. Disponível em: <<https://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40170-020-00237-2>>.

NELSON, Erik R. The significance of cholesterol and its metabolite, 27-hydroxycholesterol in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 466, p. 73–80, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720717305063>>.

NEWSHOLME, E. A.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M. S. M. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. **Bioscience Reports**, v. 5, n. 5, p. 393–400, 1 maio 1985. Disponível em: <<https://portlandpress.com/bioscirep/article/5/5/393/55511/The-role-of-high-rates-of-glycolysis-and-glutamine>>.

NI, Haibo; LIU, Huixiang; GAO, Rong. Serum Lipids and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142669, 10 nov. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0142669>>.

NISHIBORI, Masahiro. The Anti-tumor Activities of Statins. **Current Oncology**, v. 14, n. 6, p. 246–247, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.current-oncology.com/index.php/oncology/article/view/153/159>>.

NISHIMURA, REIKI et al. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 5, p. 747–754, 2010. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2010.133>>.

NOWAK, Christoph; ÄRNLÖV, Johan. A Mendelian randomization study of the effects of blood lipids on breast cancer risk. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3957, 27 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-018-06467-9>>.

O'ROURKE, L.; YEAMAN, S. J.; SHEPHERD, P. R. Insulin and Leptin Acutely Regulate Cholesterol Ester Metabolism in Macrophages by Novel Signaling Pathways. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 955–961, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.50.5.955>>.

OSBORNE, C. Kent; SCHIFF, Rachel. Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 62, n. 1, p. 233–247, 18 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-070909-182917>>.

OUN, Rabbab; MOUSSA, Yvonne E.; WHEATE, Nial J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645–6653, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8DT00838H>>.

OUYANG, Mao et al. MicroRNA Profiling Implies New Markers of Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96228, 2 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0096228>>.

PAJARES, Bella et al. Obesity and survival in operable breast cancer patients treated with adjuvant anthracyclines and taxanes according to pathological subtypes: a pooled analysis. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. R105, 6 dez. 2013. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3572>>.

PALUMBO, Antonio et al. International Myeloma Working Group Consensus Statement for the Management, Treatment, and Supportive Care of Patients With Myeloma Not Eligible for Standard Autologous Stem-Cell Transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 6, p. 587–600, 20 fev. 2014. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.48.7934>>.

PANDIT, Prakash et al. Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Single Institutional Experience of 2062 Patients. **European Journal of Breast Health**, v. 16, n. 1, p. 39–43, 11 mar. 2020. Disponível em: <http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_41938/ejbh-16-39-En.pdf>.

PANDY, Jessa Gilda P. et al. Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1065, 8 dez. 2019. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-6253-5>>.

PAPADIMITRIOU, Marios; MOUNTZIOS, Giannis; PAPADIMITRIOU, Christos A. The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. **Cancer Treatment Reviews**, v. 67, p. 34–44, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737218300549>>.

PAPAEVANGELOU, Efthymia et al. The effect of FASN inhibition on the growth and metabolism of a cisplatin-resistant ovarian carcinoma model. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 4, p. 992–1002, 15 ago. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31392>>.

PATRA, Samir Kumar. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1785, n. 2, p. 182–206, abr. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X07000704>>.

PEART, Olive. Breast intervention and breast cancer treatment options. **Radiologic technology**, v. 86, n. 5, p. 535M-558M; quiz 559–62, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25995413>>.

POYNTER, Jenny N. et al. Statins and the Risk of Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 21, p. 2184–2192, 26 maio 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043792>>.

PRAMFALK, Camilla; ERIKSSON, Mats; PARINI, Paolo. Cholesteryl esters and ACAT. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 6, p. 624–633, 2012.

PRAT, Aleix et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, p. S26–S35, nov. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977615001460>>.

_____. HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, n. 1, p. 46–54, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article/112/1/46/5475264>>.

_____. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2 out. 2010. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2635>>.

RAGHU, Vineet K. et al. Biomarker identification for statin sensitivity of cancer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 659–665, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X1732243X>>.

RAJ, Shashi; FRANCO, Vivian I.; LIPSHULTZ, Steven E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 6, p. 315, 22 jun. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11936-014-0315-4>>.

RAKHA, Emad A. et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. **Cancer**, v. 118, n. 15, p. 3670–3680, 1 ago. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.26711>>.

RAMOS, Carlos V.; TAYLOR, Herbert B. Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathologic analysis of 13 examples. **Cancer**, v. 33, n. 3, p. 812–819, mar. 1974. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(197403\)33:3%3C812::AID-CNCR2820330328%3E3.0.CO;2-4](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(197403)33:3%3C812::AID-CNCR2820330328%3E3.0.CO;2-4)>.

RAY, Gibanananda; HUSAIN, Syed A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 71–76, fev. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912000002009>>.

REDDY, S M et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 1, p. 17–23, 12 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc2017379>>.

REYNOLDS, Peggy. Smoking and Breast Cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 15–23, 23 mar. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10911-012-9269-x>>.

RHODES, Daniel R. et al. ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining Platform. **Neoplasia**, v. 6, n. 1, p. 1–6, jan. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147658604800472>>.

RISCAL, Romain; SKULI, Nicolas; SIMON, M. Celeste. Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! **Molecular Cell**, v. 76, n. 2, p. 220–231, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276519306938>>.

ROBSON, Mark et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 523–533, 10 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1706450>>.

RODRIGUES DOS SANTOS, Catarina et al. LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 16, 2014. Disponível em: <<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-13-16>>.

RYE, Kerry-Anne; GARRETY, Karin H.; BARTER, Philip J. Preparation and characterization of spheroidal, reconstituted high-density lipoproteins with apolipoprotein A-I only or with apolipoprotein A-I and A-II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1167, n. 3, p. 316–325, abr. 1993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276093902352>>.

SANCHO-GARNIER, Hélène; COLONNA, Marc. Épidémiologie des cancers du sein. **La Presse Médicale**, v. 48, n. 10, p. 1076–1084, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0755498219304105>>.

SANTOS GUIMARES, Isabella dos et al. Conventional Cancer Treatment. **Cancer Treat. - Conv. Innov. Approaches**. [S.l.]: InTech, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/conventional-cancer-treatment>>.

SARKAR, Reith R et al. Cost-Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Pediatric Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 7, p. 719–726, 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article/111/7/719/5240701>>.

SAYED, Shahin et al. Breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes in breast cancer patients from Kenya. **Breast Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 68, 26 dez. 2021. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-021-01446-3>>.

SCHETTINI, Francesco et al. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 84, p. 101965, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737220300037>>.

SCHWENTNER, Lukas et al. Adherence to treatment guidelines and survival in triple-negative breast cancer: a retrospective multi-center cohort study with 9156 patients. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 487, 21 dez. 2013. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-487>>.

SECKL, Michael J. et al. Multicenter, Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pravastatin Added to First-Line Standard Chemotherapy in Small-Cell Lung Cancer (LUNGSTAR). **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 14, p. 1506–1514, 10 maio 2017. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.69.7391>>.

SERRANO-GOMEZ, Silvia Juliana et al. High prevalence of luminal B breast cancer intrinsic subtype in Colombian women. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 7, p. 669–676, jul. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgw043>>.

SHARMA, Monika et al. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148049, 25 jan. 2016a. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148049>>.

_____. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148049, 25 jan. 2016b. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148049>>.

SHARP, Adam; HARPER-WYNNNE, Catherine. Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): The Expanding Landscape of Targeted Therapies. **Journal of Cancer Biology & Research**, v. 2, n. 1, p. 106, 2014. Disponível em: <<https://www.jsmedcentral.com/CancerBiology/cancerbiology-2-1036.php>>.

SHARPE, Laura J.; BROWN, Andrew J. Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (HMGR). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 18707–18715, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820457278>>.

SIQUEIRA, Maria Eduarda Menezes de; FRANCALACCI, Luis Claudio; PEREIRA, Camila Girardi. Insuficiência renal aguda e rdbdomólise induzida pelo uso de estatina: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, n. 47, p. 273–275, 2008.

SITAUULA, S.; BURRIS, T.P. Cholesterol and Other Steroids. **Encycl. Cell Biol**. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 173–179. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944474100215>>.

SIVANAND, Sharanya; VANDER HEIDEN, Matthew G. Emerging Roles for Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Cancer. **Cancer Cell**, v. 37, n. 2, p. 147–156, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610819305811>>.

SMITH, Chris et al. Abstract P3-11-17: Statins suppress the aggressive phenotype of triple negative breast cancer cells via modulation of EGFR signalling. 15 fev. 2020, [S.l.]: American Association for Cancer Research, 15 fev. 2020. p. P3-11-17-P3-11-17. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.SABCS19-P3-11-17>>.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 11 set. 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.191367098>>.

SPOLITU, Stefano et al. Multidrug resistance P-glycoprotein dampens SR-BI cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins in human leukemia cells. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 615–627, 2016.

SUGIE, Tomoharu. Immunotherapy for metastatic breast cancer. **Chinese Clinical Oncology**, v. 7, n. 3, p. 28–28, jun. 2018. Disponível em: <<http://cco.amegroups.com/article/view/19854/19896>>.

SUN, Xiangyu et al. Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 31 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00428/full>>.

SUNG, Hyuna et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>>.

SWINNEN, Johannes V; BRUSSELMANS, Koen; VERHOEVEN, Guido. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, n. 4, p. 358–365, jul. 2006. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00075197-200607000-00005>>.

TANG, Ping; SKINNER, Kristin A.; HICKS, David G. Molecular Classification of Breast Carcinomas by Immunohistochemical Analysis. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 18, n. 3, p. 125–132, set. 2009. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00019606-200909000-00001>>.

TARIQ, Syed Maaz et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: A Beacon of Hope in the Fight Against Cancer. **Cureus**, 23 out. 2018. Disponível em: <<https://www.cureus.com/articles/15684-chimeric-antigen-receptor-t-cell-therapy-a-beacon-of-hope-in-the-fight-against-cancer>>.

TATIDIS, Loukas; MASQUELIER, Michèle; VITOLS, Sigurd. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 2169–2180, jun. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295202010183>>.

THOMPSON, Gilbert; MABUCHI, Hiroshi. AKIRA ENDO: THE DISCOVERY OF STATINS. **Pioneers Med. Without a Nobel Prize**. [S.l.]: IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2014. v. 86. p. 251–269. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/86/5/86_5_484/_article>.

TIAN, Wei et al. Changes in lipid profiles during and after (neo)adjuvant chemotherapy in women with early-stage breast cancer: A retrospective study. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221866, 29 ago. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0221866>>.

TOSI, Maria R.; TUGNOLI, Vitaliano. Cholesteryl esters in malignancy. **Clinica Chimica Acta**, v. 359, n. 1–2, p. 27–45, set. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898105002421>>.

TRABERT, Britton et al. Progesterone and Breast Cancer. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 2, p. 320–344, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article/41/2/320/5568276>>.

TREMONT, Alexander; LU, Jonathan; COLE, John T. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. **The Ochsner journal**, v. 17, n. 4, p. 405–411, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29230126>>.

TRIVERS, Katrina F. et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. **Cancer Causes & Control**, v. 20, n. 7, p. 1071–1082, 3 set. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10552-009-9331-1>>.

TUNG, Nadine M.; GARBER, Judy E. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 2, p. 141–152, 5 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41416-018-0127-5>>.

UPADHYAY, Ankur Kumar et al. Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: Involvement of Akt, NF- κ B and Bcl-2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, n. 2, p. 177–185, out. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X06001852>>.

VAN DE VIJVER, Marc J. et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999–2009, 19 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021967>>.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1160809>>.

VENKITARAMAN, Ramachandran. Triple-negative/basal-like breast cancer: clinical, pathologic and molecular features. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 10, n. 2, p. 199–207, 10 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/era.09.189>>.

VIDAL, Maria; PARÉ, Laia; PRAT, Aleix. Molecular classification of breast cancer. **Management of Breast Diseases: Second Edition**, v. 27, n. 1, p. 203–219, 2016.

VINOGRADOVA, Yana; COUPLAND, Carol; HIPPISEY-COX, Julia. Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. **BMJ**, p. m3873, 28 out. 2020. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.m3873>>.

VOORNEVELD, Philip W. et al. Statin Use After Diagnosis of Colon Cancer and Patient Survival. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 470–479.e4, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851735597X>>.

WAHBA, Hanan Ahmed; EL-HADAAD, Hend Ahmed. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Biology and Medicine**, v. 12, n. 2, p. 106–116, 2015.

WANG, Ange et al. Statin use and all-cancer survival: prospective results from the Women’s Health Initiative. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 129–135, 9 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc2016149>>.

WANG, Guoping; SU, Chao; YIN, Tao. Paclitaxel and platinum-based chemotherapy results in transient dyslipidemia in cancer patients. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 6, n. 2, p. 261–265, fev. 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2016.1107>>.

WANG, Jinghua; ZHOU, Penghui. New Approaches in CAR-T Cell Immunotherapy for Breast Cancer. [S.l.: s.n.], 2017. p. 371–381. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-6020-5_17>.

WANG, Yan; LIU, Chengxin; HU, Likuan. Cholesterol regulates cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer by modulating miR-33a-PIM3 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 511, n. 3, p. 685–692, abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19303249>>.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev. 1956. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.123.3191.309>>.

WARMOES, Marc et al. Proteomics of Genetically Engineered Mouse Mammary Tumors Identifies Fatty Acid Metabolism Members as Potential Predictive Markers for Cisplatin Resistance. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 5, p. 1319–1334, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535947620311142>>.

WEAVER, Beth A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 15 set. 2014. Disponível em: <<https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e14-04-0916>>.

WEI, Lengyun et al. Cholesteryl Ester Promotes Mammary Tumor Growth in MMTV-PyMT Mice and Activates Akt-mTOR Pathway in Tumor Cells. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 853, 8 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/6/853>>.

WEIDERPASS, Elisabete; MEO, Margrethe; VAINIO, Harri. Risk Factors for Breast Cancer, Including Occupational Exposures. **Safety and Health at Work**, v. 2, n. 1, p. 1–8, mar. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2093791111210011>>.

WESTERINK, N.L. et al. Cancer treatment induced metabolic syndrome: Improving outcome with lifestyle. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 108, p. 128–136, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104084281630275X>>.

XIAN, Guozhe et al. Simvastatin attenuates macrophage-mediated gemcitabine resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the TGF- β 1/Gfi-1 axis. **Cancer Letters**, v. 385, p. 65–74, jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438351630684X>>.

XU, Liuyue et al. Dynamic Changes of Blood Lipids in Breast Cancer Patients After (Neo)adjuvant Chemotherapy: A Retrospective Observational Study. **International Journal of General Medicine**, v. Volume 13, p. 817–823, out. 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/dynamic-changes-of-blood-lipids-in-breast-cancer-patients-after-neoadj-peer-reviewed-article-IJGM>>.

XU, Shimeng; ZHANG, Xuelin; LIU, Pingsheng. Lipid droplet proteins and metabolic diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 5, p. 1968–1983, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443917302454>>.

YAN, Aiwen et al. Cholesterol metabolism in drug-resistant cancer (Review). **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 5, p. 1103–1115, 2020.

YANG, Jie; WANG, Lihua; JIA, Renbing. Role of de novo cholesterol synthesis enzymes in cancer. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 7, p. 1761–1767, 2020. Disponível em: <<http://www.jcancer.org/v11p1761.htm>>.

YANG, Wei et al. Potentiating the antitumour response of CD8+ T cells by modulating cholesterol metabolism. **Nature**, v.

531, n. 7596, p. 651–655, 31 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature17412>>.

YIN, Li et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 61, 9 dez. 2020. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-020-01296-5>>.

YOUNG, Stephen G.; FONG, Loren G. Lowering Plasma Cholesterol by Raising LDL Receptors — Revisited. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 12, p. 1154–1155, 22 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMe1202168>>.

YUAN, PENG et al. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. **Oncology Letters**, v. 11, n. 3, p. 2101–2105, mar. 2016. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.4199>>.

ZABIELSKA, JUDYTA; SLEDZINSKI, TOMASZ; STELMANSKA, EWA. Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase Inhibition in Cancer Treatment. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3385–3394, 1 jul. 2019. Disponível em: <<http://ar.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.13482>>.

ZEINOMAR, Nur et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and familial breast cancer risk: findings from the Prospective Family Study Cohort (ProF-SC). **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 128, 28 dez. 2019. Disponível em: <<https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-019-1213-1>>.

ZHAO, Guodong et al. Effect of statins use on risk and prognosis of breast cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. Publish Ah, 16 ago. 2021. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1097/CAD.0000000000001151>>.

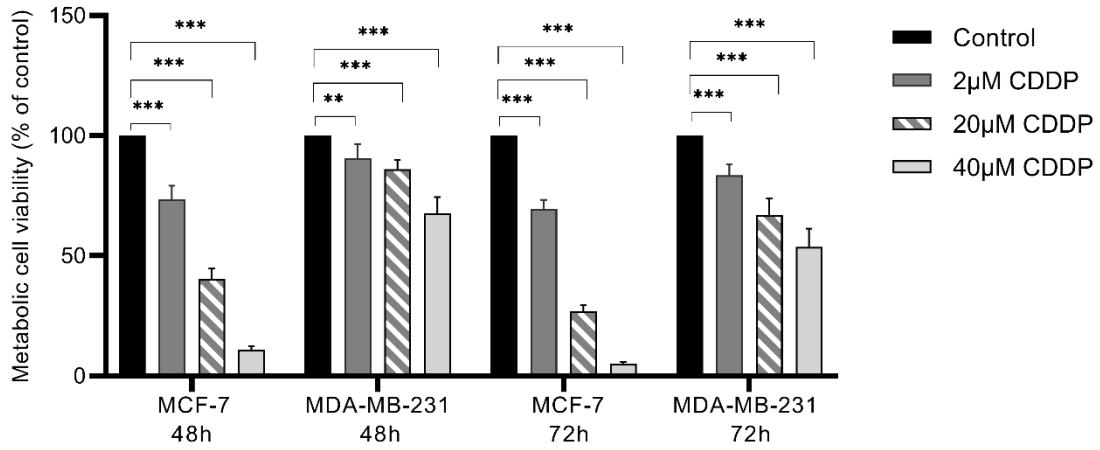
ZHAO, Zhenhui et al. Engineered IL-7 Receptor Enhances the Therapeutic Effect of AXL-CAR-T Cells on Triple-Negative Breast Cancer. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–13, 8 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/4795171/>>.

ZHENG, Lei et al. SREBP2 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 7, p. 655–662, 22 abr. 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370218760283>>.

ZHU, Yuyan et al. In vitro exploration of ACAT contributions to lipid droplet formation during adipogenesis. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 5, p. 820–829, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002227520331175>>.

Figures

A



B

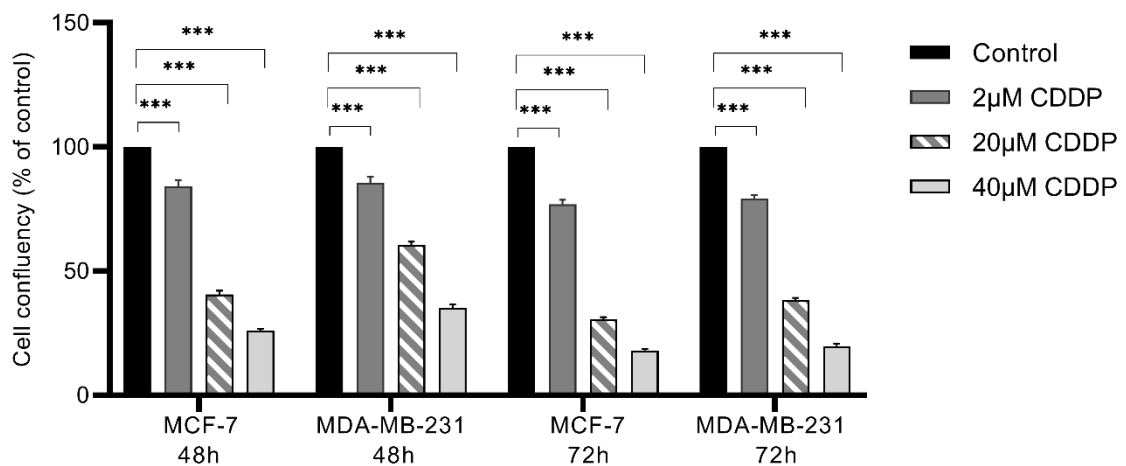


Fig. 1 Effect of CDDP on MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Cells were incubated either with the solvent vehicle or CDDP (2, 20 or 40 µM) for 48 and 72 hours, and (A) cytotoxic effects were assessed by MTT assay, (B) proliferation rate was assessed via Incucyte. Values are expressed relative to that of cells treated with the solvent vehicle (control) and are the mean ± SEM of three separate experiments performed in triplicate. One-way ANOVA followed by Šídák post hoc test was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0001$ indicate significant differences compared control

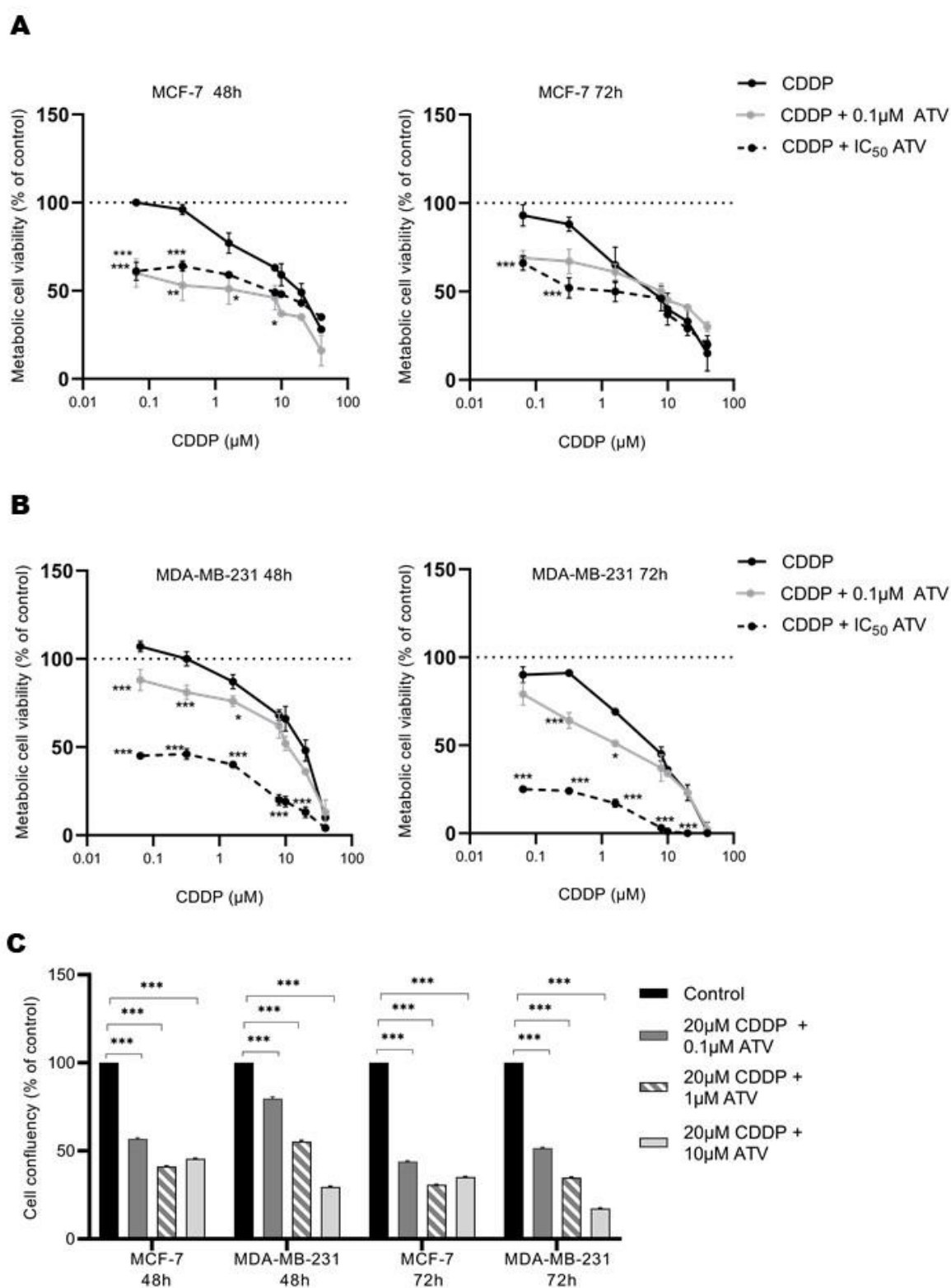


Fig. 2 Cytotoxic effects of the combination of CDDP and ATV on MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Cell viability and IC₅₀ values were calculated using MTT assay, using concentrations ranging from 0.64 to 40 μM of CDDP alone or in combination with ATV (0.1 μM or IC₅₀ previously determined) at 48 and 72 h time point in (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells. Proliferation rate of MCF-7 and MDA-MB-

231 in response to solvent vehicle or co-administration of CDDP and ATV was assessed via Incucyte at 48h and 72h (C). 20 μ M of CDDP was undertaken in this study to avoid excessive cell death caused by high concentration of combined treatment. Statistical analysis in A and B was performed using two-way ANOVA plus post hoc Bonferroni test, and *p < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0001 indicate significant differences compared to the CDDP single agent group. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression of log(inhibitor) vs. response using least squares as fitting method in a 4 parameters calculation with variable slope. IC₅₀ represents loss of 50% of viability. Statistical analysis in C was performed using one-way ANOVA plus post hoc Šídák's test, and *p < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0001 indicate significant differences compared to control.

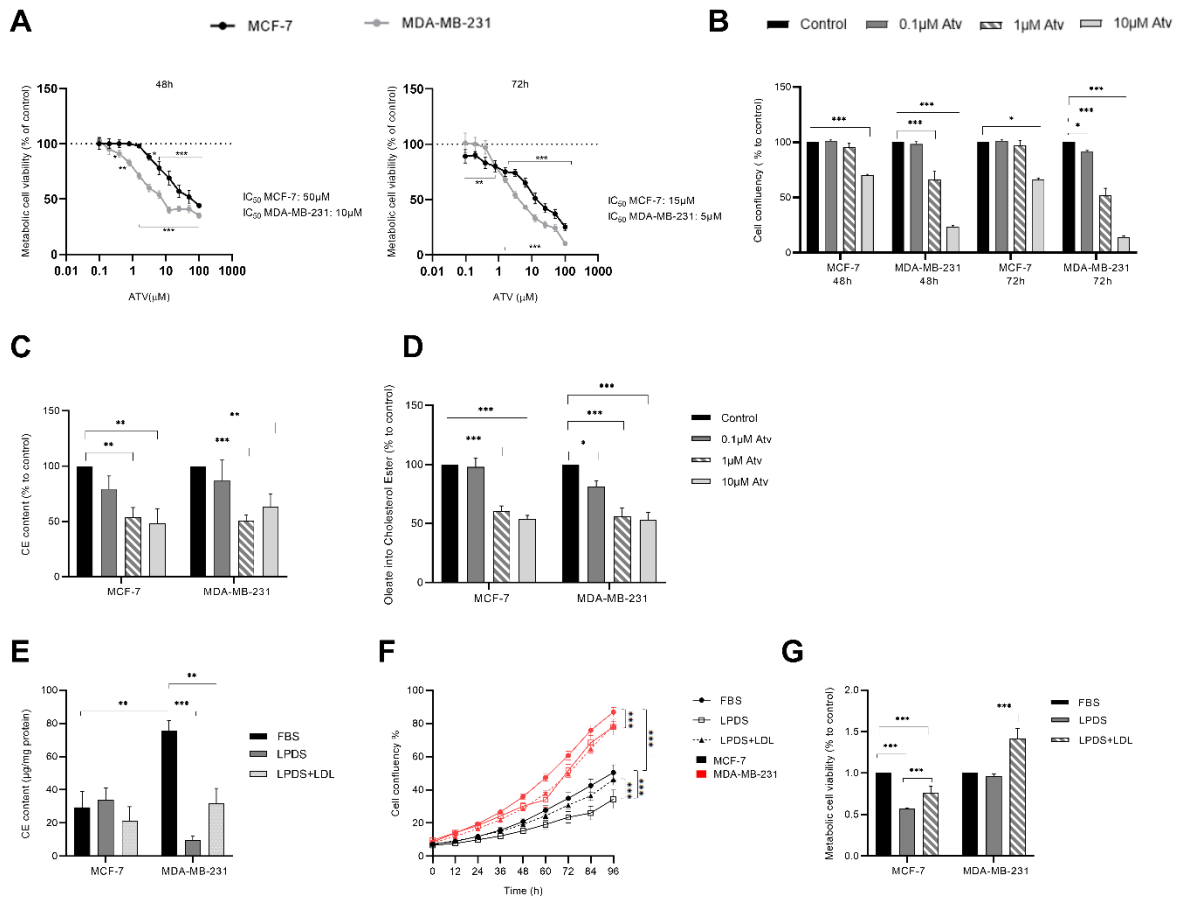


Fig. 3 Effect of ATV and cholesterol availability on MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

(A) ATV cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, and IC_{50} values were calculated by MTT assay, using concentrations ranging from 0.1 to 100 μM of ATV at 48 (left panel) and 72 hours (right panel) time point. (B) Effect of ATV treatment (0.1, 1 or 10 μM) on cell growth at 48 and 72h. (C) Effect of ATV treatment in CE content. (D) Effect of ATV treatment in oleate label incorporated into CE. (E) CE content of MCF-7 and MD-MB-231 cells cultivated in DMEM containing FBS, LPDS serum or LPDS loaded with LDL. (F) Time course of MCF-7 and MDA-MB231 cell growth cultivated in DMEM containing FBS, LPDS serum or LPDS loaded with LDL and imaged with IncuCyte. (G) MCF-7 and MDA-MB-231 viability of cells cultured in DMEM containing FBS or LPDS serum for 48h, then LDL was added LPDS containing media for 24h. Statistical analysis in A, B, C, D and G was performed using one-way ANOVA plus post hoc Šídák's test, and * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0001$ indicate significant differences compared to untreated (control) group or FBS group. Statistical analysis in E and F was performed using two-way ANOVA plus post hoc Šídák's test, and * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0001$ indicate significant differences compared to FBS group.

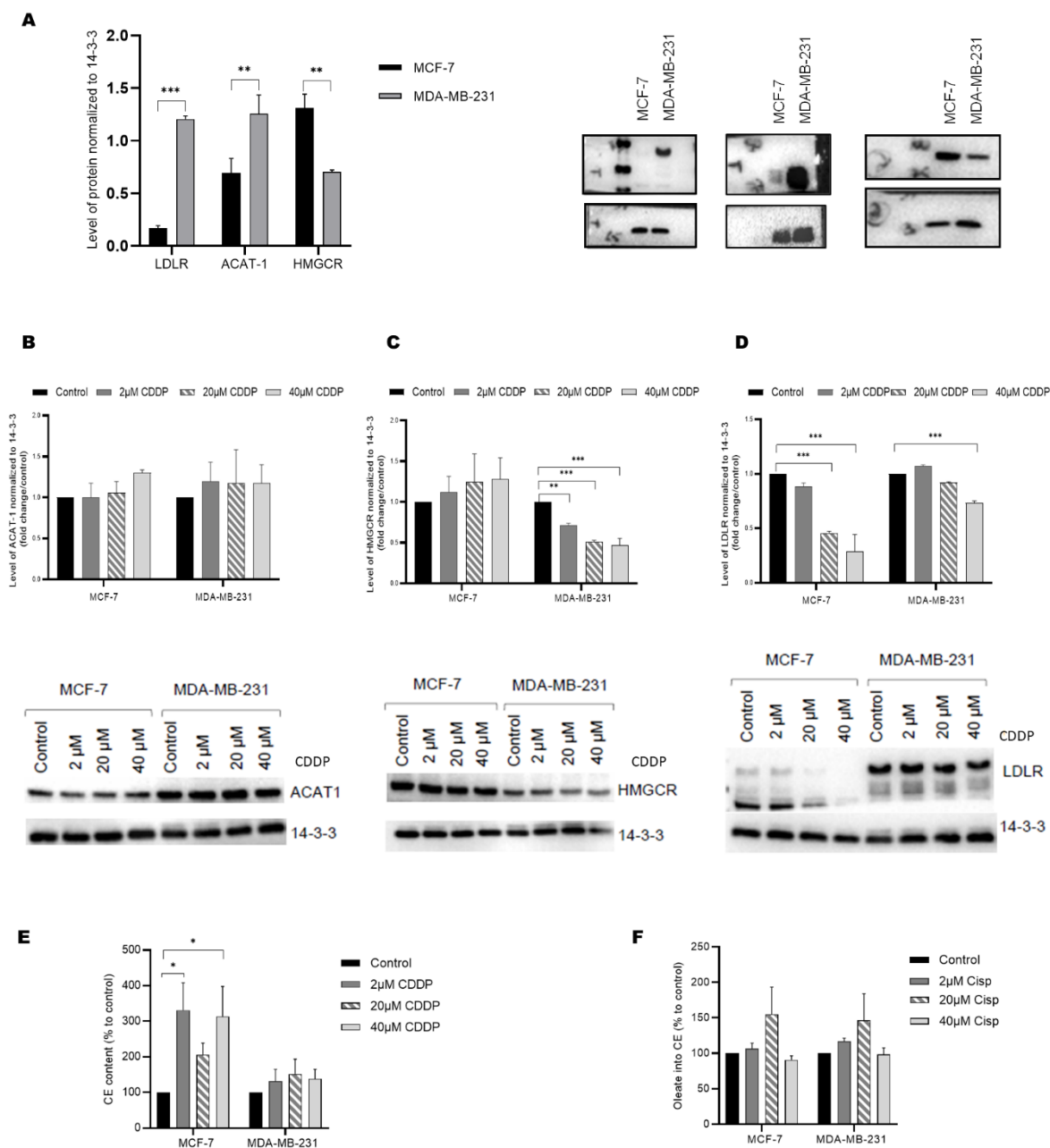


Fig. 4 Effect of CDDP on cholesterol metabolism on MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

(A) Representative immunoblots and densitometric quantitation of ACAT-1, HMGCR and LDLR protein levels in MCF-7 and MDA-MB-231 cells cultivated in DMEM containing FBS. Representative immunoblots and densitometric quantitation of (B) ACAT-1, (C) HMGCR and (D) LDLR protein levels in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with the solvent vehicle (control) or CDDP (2 μM, 20 μM or 40 μM). 14-3-3 is used as the loading control. (E) CE content and (F) cholesterol esterification in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with the solvent vehicle (control) or CDDP (2 μM, 20 μM or 40 μM) for 24 h. Statistical analysis in A was performed using unpaired t-test. Statistical analysis in B, C, D, E and F was performed using one-way ANOVA plus Šidák's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0001$ indicate significant differences compared control.

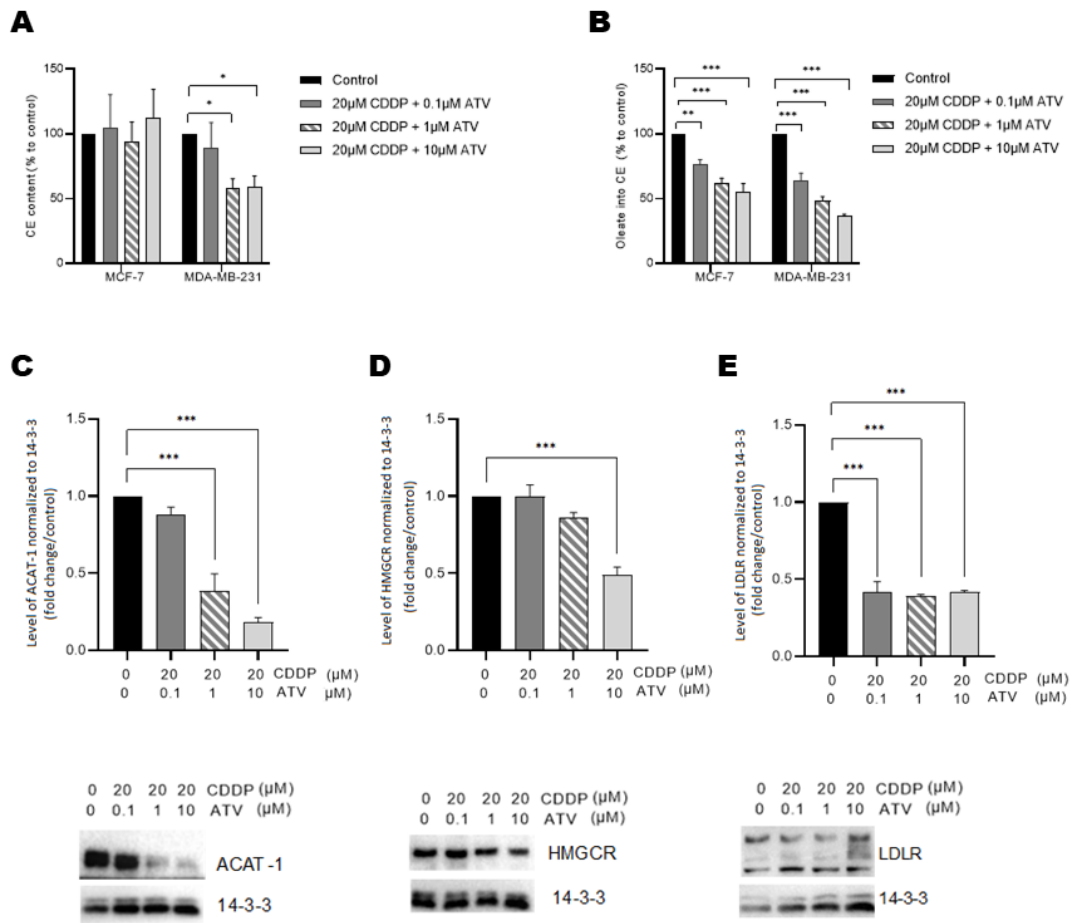


Fig. 5 Combination effect of CDDP and ATV on CE metabolism on BC cells.

(A) CE content and (B) cholesterol esterification in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with CDDP (20 μM) plus ATV (0.1 μM, 1 μM or 10 μM) for 48 h and 24 h, respectively. Representative immunoblots and densitometric quantitation of (C) ACAT-1, (D) HMGCR and (E) LDLR protein levels in MDA-MB-231 cells treated with the solvent vehicle (control) or CDDP plus ATV (0.1 μM, 1 μM or 10 μM). All densitometric values were normalized to 14-3-3. * $p < 0.05$, ** $P < 0.005$, and *** $P < 0.0001$ indicate significant differences compared untreated (control) cells.

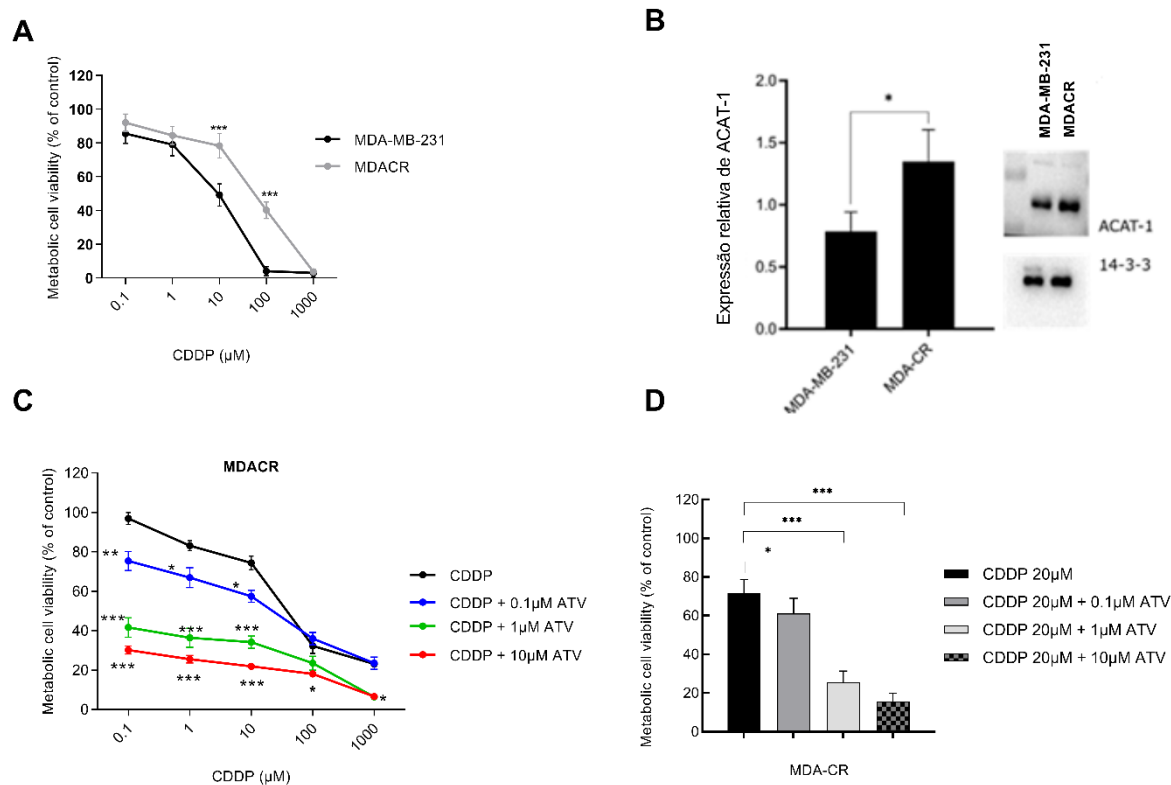
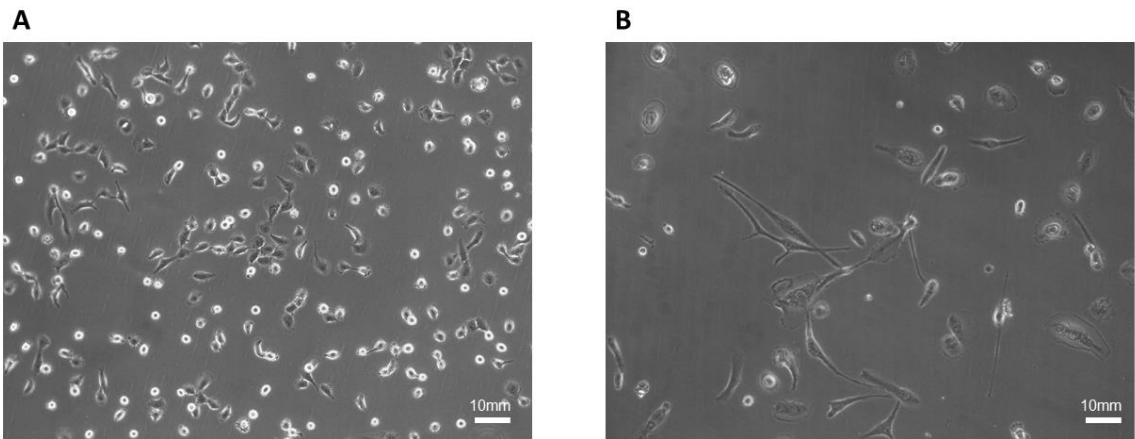


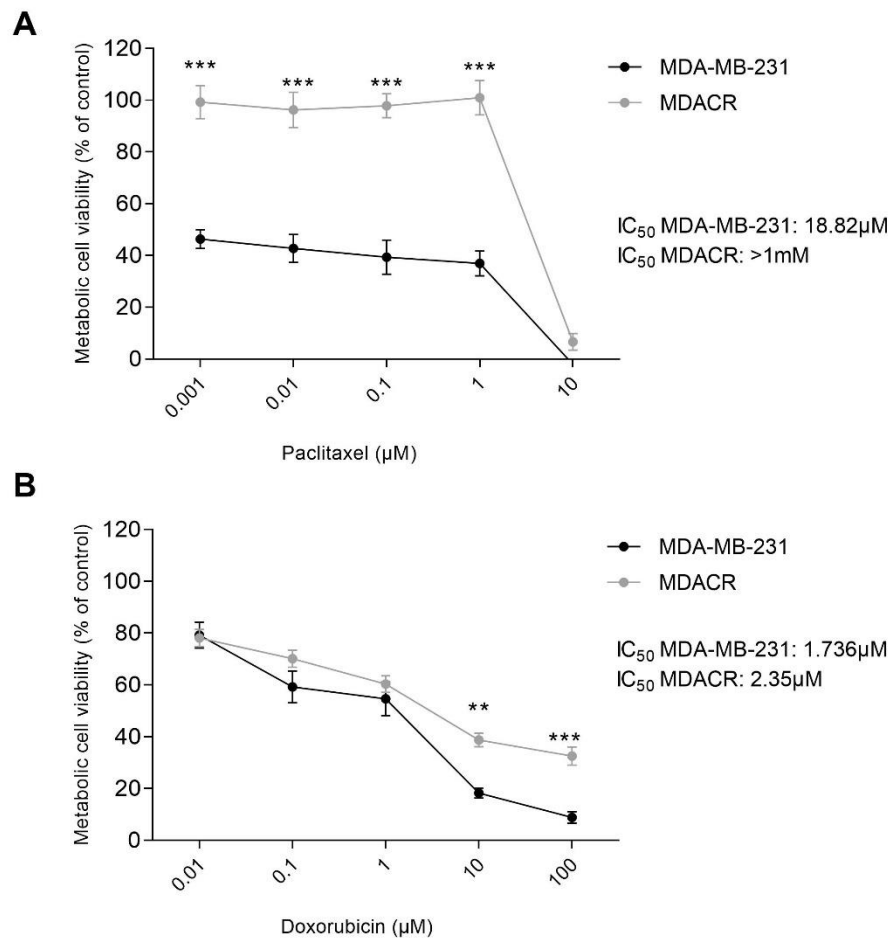
Fig. 6 Effect of combined treatment CDDP plus ATV on MDA-CR cells.

(A) The resistance to CDDP treatment in MDA-CR compared to MDA-MB-231 was confirmed through MTT assay at 48h and IC_{50} values calculated by nonlinear regression of $\log(\text{inhibitor})$ vs. response using least squares as fitting method in a 4 parameters calculation with variable slope. IC_{50} represents loss of 50% of viability. Results were expressed as percentage of control (untreated cells) as mean \pm SD. *** $P < 0.0001$ indicate significant differences compared MDA-MB-231 treated cells. (B) Representative immunoblots and densitometric quantitation of ACAT-1 in MDA-MB-231 and MDA-CR cultivated under normal conditions. * $p < 0.05$ indicate significant difference compared MDA-MB-231 untreated cells. (C) MDA-CR cells were treated with CDDP alone or with ATV (0.1, 1 or 10 μM) and cell viability was assessed at 48h. One-way ANOVA followed by Šídák post hoc test was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0001$ indicate significant differences compared CDDP single agent.

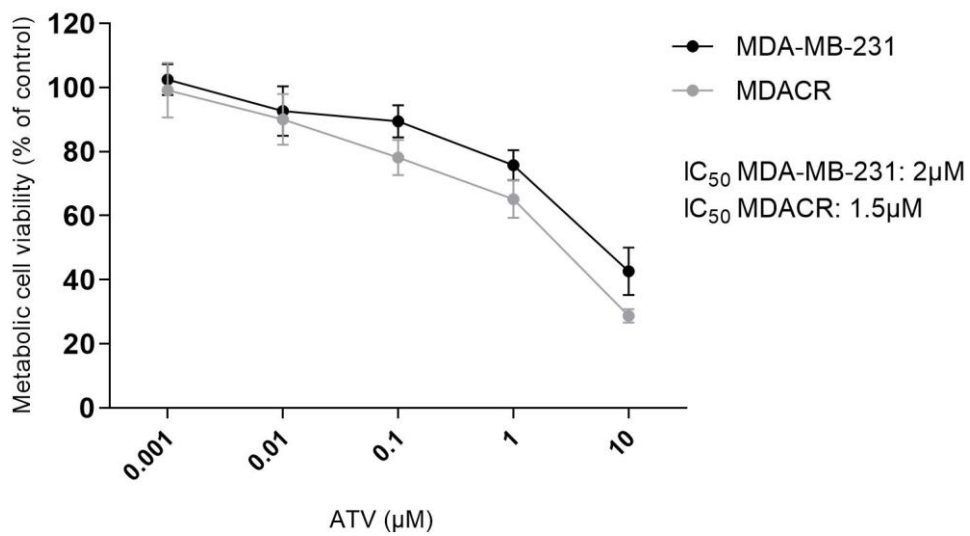
Suppl. Figures



Suppl. Fig 1 Breast cancer cell lines. (A)MDA-MB-231 and (B) MDACR. Cell morphology was analyzed in a Zeiss Observer Z1 microscope, and all images were acquired by Axio-Vision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss). Magnification 10x. The scale bars are 10 mm.

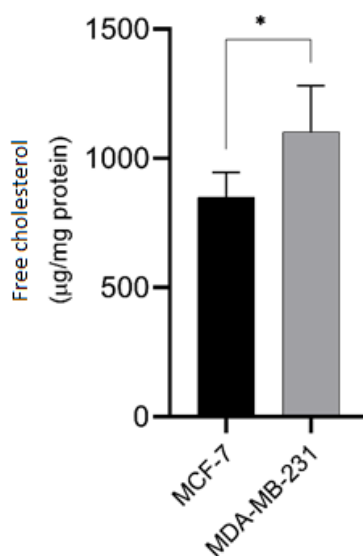


Suppl. Fig 2 Analysis of cross-resistance to paclitaxel and doxorubicin chemotherapy in MDA-MB-231 and MDACR. MDA-MB-231 and MDACR cells were plated in 96-well plates and incubated at 37°C with 5% CO₂. Cells were treated with (A) paclitaxel (concentration range 0.001µM to 10µM) and (B) doxorubicin (concentrations ranging from 0.1µM to 100µM) for 48 hours. IC₅₀ values calculated by nonlinear regression of log(inhibitor) vs. response using least squares as fitting method in a 4 parameters calculation with variable slope. IC₅₀ represents loss of 50% of viability. Results were expressed as percentage of control (untreated cells) as mean ± SD.



Suppl. Fig 3 Comparison of sensitivity of ATV in MDA-MB-231 and MDACR.

Cells were plated in 96-well plates and incubated at 37°C with 5% CO₂, and after 24h cells were treated with ATV (0.001µM to 10µM) for 48h. IC₅₀ values calculated by nonlinear regression of log(inhibitor) vs. response using least squares as fitting method in a 4 parameters calculation with variable slope. IC₅₀ represents loss of 50% of viability. Results were expressed as percentage of control (untreated cells) as mean ± SD.



Suppl. Fig 4 Analysis of intracellular free cholesterol content in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. BC cells were plated and cultivated in standard culture medium for 24h and then cholesterol content was determined with the Amplex® Red Cholesterol Assay Kit. Two-tailed unpaired t-test was used for statistical significance analysis of comparison between the two cell lines. *p < 0.05.