

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

LARYSSA APARECIDA SALES BARBOSA

**ATIVIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE EM CÉLULAS
TUMORAIS MAMÁRIAS**

**PATOS DE MINAS – MG
JANEIRO DE 2023**

LARYSSA APARECIDA SALES BARBOSA

**ATIVIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE EM CÉLULAS
TUMORAIS MAMÁRIAS**

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

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS – MG

JANEIRO DE 2023

LARYSSA APARECIDA SALES BARBOSA

Atividade de complexos metálicos de cobre em células tumorais mamárias

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

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia - UFU
Presidente

Profa. Dra. Daiane Silva Resende – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Prof. Dr. Douglas Cardoso Brandão – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas – MG, 19 de janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e Nossa Senhora Aparecida, pelas bênçãos e por permitirem esta conquista.

À Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, por estes quatro anos de orientação, paciência, confiança e acolhimento. Só tenho a agradecer, foram muitos aprendizados!

À minha amiga e dupla inseparável, Gislaine Gonçalves Rocha, que esteve comigo durante toda a trajetória. Desde que nos conhecemos, nunca mais nos separamos, e que seja assim por muitos e muitos anos. Sou infinitamente grata por todos os nossos momentos, companheirismo e tudo que fez por mim!

Ao meu companheiro, Caio Séjour Araujo. Você foi essencial para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada por todos os conselhos, pela motivação e acolhimento nas fases difíceis. Foram muitos momentos compartilhados, e chegou a hora do mais esperado deles. Muito feliz por poder compartilhar esta conquista com você!

Aos queridos Douglas e Paulinha. Vocês me ensinaram tanto! Foram como pais, não houve um único momento que não pude contar com vocês. Vocês são incríveis! Sou eternamente grata!

À minha família, em especial minha mãe, irmã e avó (Gizelda, Raysa e Eloina). Vocês são meus pilares! Obrigada por todo o apoio e por me fazerem quem sou hoje. Amo vocês!

Aos membros da banca, pela disponibilidade e interesse em dividir comigo este momento tão especial.

A todos os colaboradores da UFU, pelos ensinamentos e auxílio. Vocês contribuíram ativamente para a minha formação, profissional e pessoal.

A todo grupo Gbio. Foram muitas risadas e aprendizados enquanto estivemos juntos!

Ao Prof. Dr. Wendell Guerra e todos os colaboradores do Instituto de Química da UFU pela parceria.

E a todos que caminharam comigo e de alguma forma fizeram parte dessa trajetória.

“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

O Câncer de Mama (CaM) é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo a principal doença crônica causadora de morte entre as brasileiras. Dentre os principais tipos de tratamento, destaca-se a quimioterapia que, apesar de essencial no combate às células tumorais circulantes, enfrenta desafios relacionados aos efeitos colaterais e aos quadros de resistência. Diante desse contexto, faz-se necessária a busca por novas drogas e os compostos metálicos, como os de cobre, têm se destacado por seus efeitos biológicos antitumorais incluindo danos ao DNA, geração de espécies reativas de oxigênio e indução à apoptose. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial citotóxico de 10 complexos químicos de cobre (II) inéditos contra as linhagens tumorais mamárias MCF7 (fenótipo luminal) e MDA-MB-231 (fenótipo triplo-negativo). Estas foram tratadas com os compostos Lu50 a Lu59, sendo a citotoxicidade avaliada por Alamar Blue. Os tratamentos foram realizados por 24 e 48 horas em sete concentrações: 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM e 80 μM . Em nenhum dos tratamentos realizados com os compostos Lu50 a Lu57 houve redução da viabilidade em menos de 50%. Lu58 e Lu59, em 24 horas, apresentaram efeito citotóxico frente a linhagem MDA-MB-231 de forma dependente da concentração utilizada, com IC_{50} de 25,09 μM e 24,21 μM , respectivamente. A MCF7 foi mais sensível a Lu59 com $\text{IC}_{50}=64,75$ μM após 24 horas e $\text{IC}_{50}=3,77$ μM após 48 horas. Assim, Lu58 e Lu59 também foram avaliados em linhagem não tumoral MCF-10A, mas não se mostraram seletivos. Sugerimos que outros ligantes sejam avaliados, assim como sejam desenvolvidas formulações a fim de aumentar a seletividade dos complexos para que sejam considerados em estudos *in vivo*.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Citotoxicidade. Química Inorgânica. Quimioterapia.

ABSTRACT

*Breast Cancer (BC) is the most common malignant neoplasm among women, being the main chronic disease that causes death among Brazilian women. Among the main treatments, chemotherapy stands out, which, despite being essential in fighting circulating tumor cells, faces challenges related to side effects and resistance. In this context, it is necessary to search for new drugs and metallic compounds, such as copper, have been highlighted for their antitumor biological effects, including DNA damage, generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. The present work aimed to evaluate the cytotoxic potential of 10 unpublished copper (II) chemical complexes against mammary tumor cell lines MCF7 (luminal phenotype) and MDA-MB-231 (triple-negative phenotype). These cells were treated with the compounds Lu50 to Lu59, and the cytotoxicity was evaluated by Alamar Blue. Treatments were performed for 24 and 48 hours at seven concentrations: 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM and 80 μM . In none of the treatments carried out with the compounds Lu50 to Lu57 there was a reduction in viability of less than 50%. Lu58 and Lu59, in 24 hours, showed a cytotoxic effect against the MDA-MB-231 lineage, in a dose-dependent manner, with an IC_{50} of 25.09 μM and 24.21 μM , respectively. MCF7 was more sensitive to Lu59 with IC_{50} =64.75 μM after 24 hours and IC_{50} =3,77 μM after 48 hours. Thus, Lu58 and Lu59 were also evaluated in the non-tumor cell line MCF-10A, but did not prove to be selective. We suggest that other ligands must be evaluated, as well as the development of formulations in order to increase the selectivity of the complexes to be considered in *in vivo* studies.*

Keywords: Breast cancer. Cytotoxicity. Inorganic chemistry. Chemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer - Comitê Conjunto Americano de Câncer
ATCC: American Type Culture Collection
BRCA: Breast Cancer - Câncer de Mama
BRCA1: Breast Cancer 1 - Câncer de Mama 1
BRCA2: Breast Cancer 2 - Câncer de Mama 2
CaM: Câncer de Mama
CCNB1: Gene regulador envolvido na mitose
CKs: Citoqueratinas
CMTN: Câncer de mama fenótipo triplo-negativo
DMEM/F-12: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
ER: Receptor de Estrógeno
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IC₅₀: Concentração de Inibitória de 50%
IS: Índice de Seletividade
INCA: Instituto Nacional do Câncer
Ki-67: Marcador nuclear de proliferação celular
L15: Meio Leibowitz
MCF-10A: Célula humana não tumoral
MCF7: Célula tumoral derivada de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231: Célula tumoral derivada de adenocarcinoma mamário
MKI67: Gene para proteína ki-67, necessária para a proliferação celular
MYBL2: Gene envolvido na progressão do ciclo celular
NOS: Carcinomas ductais com potencial invasivo e sem outras especificações
P53: Proteína supressora tumoral
PD-1: Receptor de morte programada
PD-L1: Ligante do receptor de morte programada
PR: Receptor de Progesterona
RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
TNM: Sistema de estadiamento da American Joint Committee on Cancer
WHO: Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Dados epidemiológicos referentes ao número e proporção de novos casos e mortes por câncer segundo a Organização Mundial da Saúde em 2020..... 12
- Figura 2. Representação da glândula mamária. A: Anatomia da mama feminina. B: Composição celular dos ductos e lobos mamários. 13
- Figura 3. Representação dos tipos histológicos de Câncer de Mama. A: Carcinoma Ductal. B: Carcinoma Lobular..... 15
- Figura 4. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em percentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu50. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; **** $P < 0,0000001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 27
- Figura 5. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em percentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu51. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 28
- Figura 6. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em percentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu52. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 29
- Figura 7. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em percentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu53. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 30
- Figura 8. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu54. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 31
- Figura 9. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu55. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 32
- Figura 10. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu56. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios

	independentes. *p<0,05; **p<0,01; e ****p<0,0001. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.	33
Figura 11.	Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu57. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média ± DP de três ensaios independentes. **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.	34
Figura 12.	Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu58. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média ± DP de três ensaios independentes. **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.	35
Figura 13.	Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu59. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média ± DP de três ensaios independentes. **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.	36
Figura 14.	Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-10A (não tumorigênica) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu58. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. IS: índice de seletividade.	37
Figura 15.	Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-10A (não tumorigênica) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu59. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. IS: índice de seletividade.	38
Figura 16.	Viabilidade relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-10A (não tumorigênica) após tratamento com ligantes. Em (A) tratamento com ligante AMP, em (B) tratamento com ligante MFTPYP e em (C) tratamento com ligante CLMP. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Câncer: definição e dados epidemiológicos	11
1.2 Câncer de mama: etiologia, diagnóstico e estadiamento.....	12
1.3 A classificação molecular do Câncer de Mama	17
1.4 Os desafios no tratamento do Câncer de Mama	19
1.5 Os complexos metálicos de cobre	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Complexos metálicos de cobre	24
3.2 Linhagens celulares	24
3.3 Citotoxicidade pelo método Alamar Blue	25
3.4 Análises estatísticas	26
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

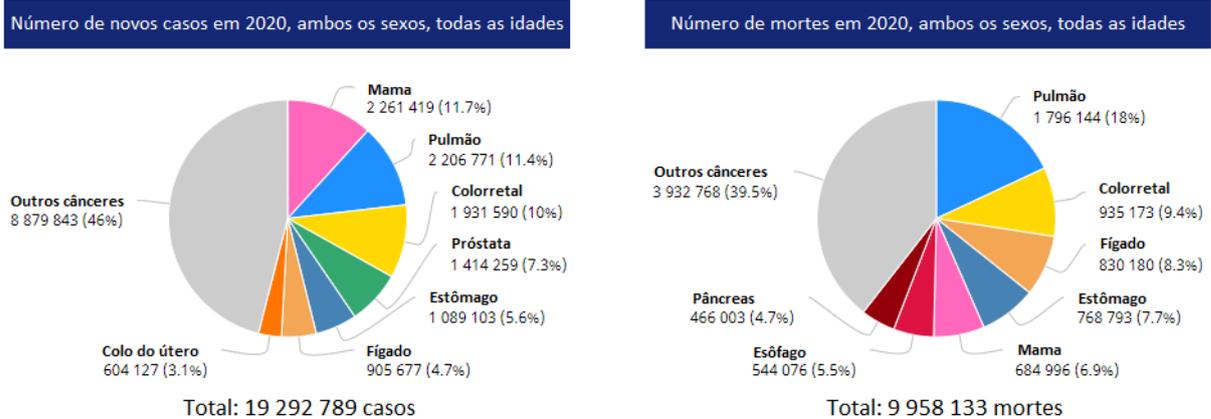
1.1 Câncer: definição e dados epidemiológicos

As células são pequenas unidades compostas majoritariamente por água e circundadas por uma membrana plasmática, capazes de se dividirem em um processo dinâmico e altamente regulado (ALBERTS *et al.*, 2017). O controle do ciclo celular é mediado pelo correto funcionamento de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, responsáveis por estimular e inibir a divisão celular, respectivamente. Quando ocorrem mutações nesses genes, suas informações são erroneamente transcritas e/ou traduzidas, conduzindo a uma multiplicação desenfreada de células transformadas e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de tumores (COELHO *et al.*, 2018; HNISZ *et al.*, 2016). A malignidade é definida pela capacidade dessas células em invadir tecidos e alcançar novos órgãos distantes, originando as metástases. Este fato não acontece em alterações benignas, em que o tumor permanece restrito ao seu local de origem (ALBERTS *et al.*, 2017).

O câncer abrange um conjunto de mais de 100 doenças, as quais são classificadas de acordo com o tecido no qual se derivam. Quando acometem células epiteliais ou glandulares são denominados carcinomas. Essa é a neoplasia maligna mais comum, representando cerca de 80% dos casos. Em tecidos conectivos ou musculares, como ossos, músculos e cartilagens, a lesão é denominada sarcoma. Existem ainda os tumores do sistema nervoso central, geralmente em células gliais, e as leucemias e linfomas, envolvendo leucócitos ou seus precursores (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2022; INSTITUTO ONCOGUIA - ONCOGUIA, 2022).

A doença é considerada como um problema de saúde pública, e sua incidência e mortalidade têm aumentado, principalmente, com o crescimento e envelhecimento populacionais (INCA, 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2022). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) (WHO, 2022), em 2020, ocorreram 19 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes pela doença (Figura 1), e até 2025, a estimativa é de 21,9 milhões de novos diagnósticos e 11,4 milhões de óbitos para a população mundial.

Figura 1. Dados epidemiológicos referentes ao número e proporção de novos casos e mortes por câncer segundo a Organização Mundial da Saúde em 2020.



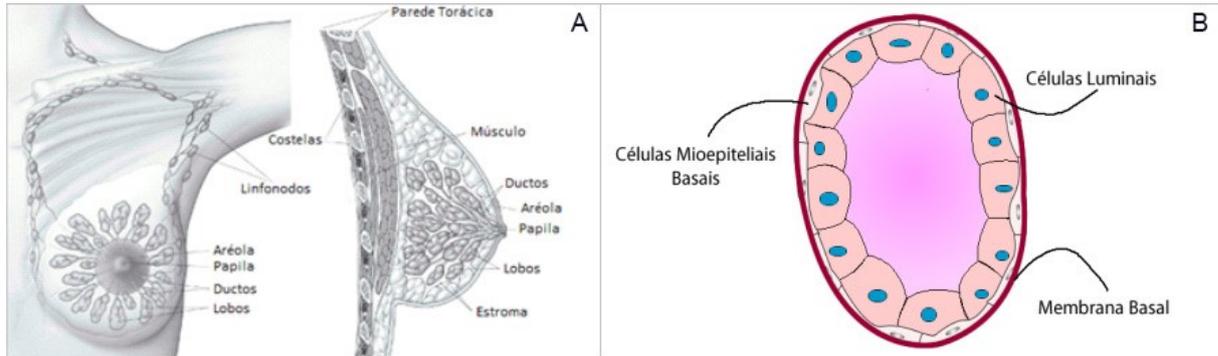
Fonte: Adaptado, WHO, 2022.

Dos 21,9 milhões de novos diagnósticos esperados até 2025, cerca de 2,5 milhões são somente de câncer de mama (CaM). Este é o tipo de neoplasia maligna mais comumente diagnosticado, superando os cânceres de pulmão, além de ser a primeira causa de morte entre as mulheres brasileiras. No ano de 2020, foram contabilizados aproximadamente 20 mil óbitos no território nacional. Para o sudeste brasileiro são esperados, anualmente, 81.06 novos casos a cada 100 mil mulheres para o triênio 2023-2025 (WHO, 2022; INCA, 2022).

1.2 Câncer de mama: etiologia, diagnóstico e estadiamento

As mamas femininas são estruturas glandulares, geralmente semiesféricas e situadas na parte anterossuperior do tórax (Figura 2). São revestidas por uma pele lisa e constituídas pelos tecidos glandular, conectivo e adiposo, juntamente com vasos e nervos (estroma). Em sua região central, é possível observar a presença de estruturas denominadas aréola e papila, compondo anteriormente o mamilo. A aréola é caracterizada por sua forma circular e tonalidade mais pigmentada em relação ao restante da mama. A papila, situada no centro da aréola, é a estrutura responsável pela saída do leite materno através dos orifícios ductais. É na papila onde se convergem os ductos lactíferos, encarregados do transporte do leite produzido nos lobos mamários (Figura 2A) (ONCOGUIA, 2022; SANTANA; BORGES, 2015; JESINGER, 2014; ROLIM; MARTINS, 2002). Os lobos e ductos da mama são revestidos internamente por uma camada de células secretoras, denominadas luminais. Em contato com a membrana basal justaposta, delimitando ductos e lóbulos, encontram-se as células mioepiteliais basais, responsáveis pela secreção do leite através de sua contração (Figura 2B) (BIRNBAUM *et al.*, 2004).

Figura 2. Representação da glândula mamária. A: Anatomia da mama feminina. B: Composição celular dos ductos e lobos mamários.



Fonte: A: Adaptado, American Cancer Society, 2022. B: Própria autoria.

É durante a gestação que ocorre o maior desenvolvimento da glândula mamária, que se mantém em estado latente durante toda a puberdade. Neste período, denominado mamogênese, se desenvolvem por completo as estruturas da mama em resposta ao estímulo hormonal. Variações no tamanho e forma devido à produção e hormônios também ocorrem durante outras fases da vida da mulher (ALEX; BHANDARY; MCGUIRE, 2020; ROLIM; MARTINS, 2002; HOLANDA *et al.*, 2016). Ainda que incomum, o CaM acomete mulheres grávidas e em período de amamentação. Nestes momentos, o diagnóstico se torna dificultado devido às grandes alterações sofridas, como aumento da mama e ganho de sensibilidade (HOLANDA *et al.*, 2016).

A etiologia do CaM ainda é pobremente compreendida, porém alguns fatores de risco favorecem o aparecimento da doença. Cerca de 80% a 90% dos casos são esporádicos, relacionados ao consumo de álcool e uso de cigarro, exposição a produtos químicos e radiações ionizantes, sedentarismo e dietas inadequadas. A dose e frequência de exposição aos fatores supracitados estão diretamente relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento do CaM (INCA, 2022; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). A nuliparidade e não amamentação, além da menarca precoce e menopausa tardia, também favorecem o surgimento da doença e estão relacionadas, principalmente, ao estímulo estrogênico. A utilização de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal também podem influenciar o surgimento do CaM (INCA, 2022; WHO, 2022; MATSEN; NEUMAYER, 2013; LACEY *et al.*, 2009).

O próprio envelhecimento se enquadra como fator de risco para a doença. A cada divisão celular ocorrem danos ao DNA que não são corrigidos pela maquinaria de reparo, comprometida com a progressão da idade. Consequentemente, estes danos são acumulados, podendo culminar em células mutantes e resultar no aparecimento de tumores (WHO, 2022;

MATSEN; NEUMAYER, 2013; SCHMITT, 2009). Os demais 10% a 20% dos casos de CaM são associados à hereditariedade e predisposição à doença (DANTAS *et al.*, 2009).

Alterações em genes da família BRCA (*Breast Cancer, early onset*) são correlacionados ao surgimento do CaM. *BRCA1* e *BRCA2* são genes supressores de tumor, atuantes no controle do ciclo celular, regulando a expressão gênica e reparando danos ao DNA. Mutações em suas sequências aumentam em cerca de 80% as chances de desenvolvimento da doença (COELHO *et al.*, 2018; DANTAS *et al.*, 2009; KING *et al.*, 2003). Devido a hereditariedade, mulheres com histórico familiar de CaM também possuem risco adicional para surgimento de tumores. A ocorrência em parentes de primeiro grau é capaz de aumentar em mais de 10% as chances de desenvolvimento da doença. Esta porcentagem cresce gradativamente conforme o número de familiares afetados (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001; KLEIBL; KRISTENSEN, 2016).

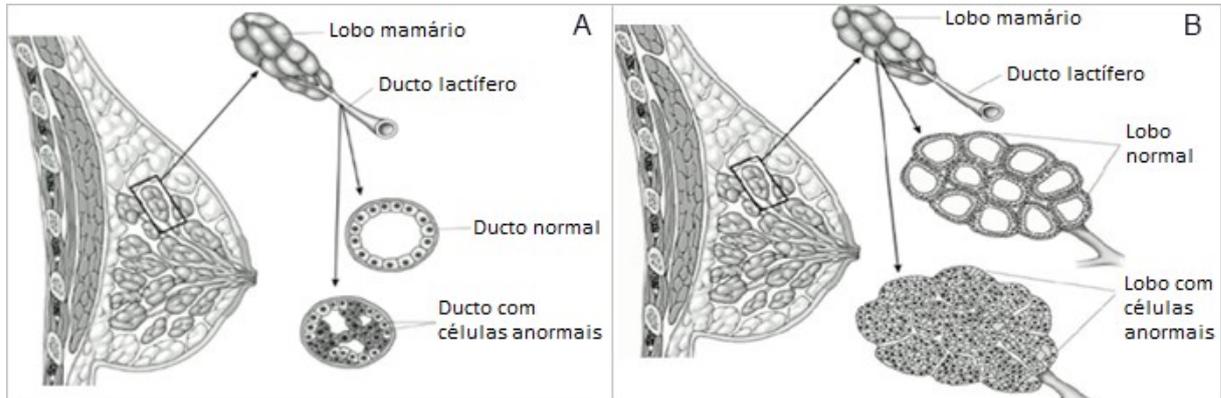
Quanto aos sintomas do CaM, estes são inespecíficos e, quando presentes, sugerem um quadro avançado da doença. As mulheres podem apresentar dores nos seios ou papila, nódulos palpáveis, inchaços em partes ou em toda a mama, secreção pela papila e/ou vermelhidão na pele do seio. Contudo, o diagnóstico exige exames clínicos incluindo mamografia, ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia confirmatória (ONCOGUIA, 2022).

A mamografia é um exame radiológico não invasivo e que permite a detecção precoce de lesões. É bastante utilizada devido à sua sensibilidade, especificidade e baixo custo. Contudo, é contraindicada para mulheres grávidas e jovens, geralmente abaixo dos 35 anos, devido à susceptibilidade da estrutura mamária à radiação. Nestes casos, é indicada a ultrassonografia, na qual são utilizadas ondas sonoras penetrantes de alta frequência capazes de proporcionar imagens de qualidade da estrutura interna do órgão (HOLANDA *et al.*, 2016; JAFARI *et al.*, 2018). Já a ressonância magnética, apesar de altamente sensível e capaz de detectar tumores que a mamografia e a ultrassonografia não identificam, ainda é pouco utilizada devido a seu alto custo e baixa disponibilidade no Brasil. É indicada para determinar, com maior precisão, o tamanho de tumores já existentes, avaliação de metástases, e para casos específicos, como em mulheres com elevado risco para CaM ou com recidiva da lesão (MATSEN; NEUMAYER, 2013; JAFARI *et al.*, 2018).

Contudo, os exames supracitados não são capazes de confirmar a presença do tumor mamário, sendo necessária a biópsia seguida da análise patológica do tecido para confirmar a malignidade e permitir a sua classificação (ONCOGUIA, 2022). Do ponto de vista

histológico, quando a lesão acomete os ductos lactíferos, são nomeados ductais. Quando provenientes dos lobos mamários são classificados como carcinomas lobulares (Figura 3) (SANTANA; BORGES, 2015).

Figura 3. Representação dos tipos histológicos de Câncer de Mama. A: Carcinoma Ductal. B: Carcinoma Lobular.



Fonte: Adaptado, American Cancer Society, 2022.

Além da categorização a partir da origem, os tumores também são analisados quanto à motilidade das células malignas. Se restritos ao tecido no qual se iniciam, são definidos como carcinoma *in situ*. Contudo, quando as células tumorais extravasam a membrana basal e invadem outros tecidos, o CaM é denominado invasivo e, em geral, passível de metastatização. Os carcinomas ductais com potencial invasivo e sem outras especificações (NOS) são os mais frequentes, representando de 70% a 80% dos casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; MATSEN; NEUMAYER, 2013). Quando não invasivos, os carcinomas ductais possuem elevadas chances de cura, chegando a atingir valores próximos de 100%. O carcinoma lobular invasivo, de difícil detecção através da mamografia, é o segundo mais comum, representando cerca de 10% dos cânceres de tipo invasivo. Já os lobulares *in situ* geralmente são menos agressivos e dificilmente se espalham para além do lobo mamário inicial (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; MATSEN; NEUMAYER, 2013). Ademais, existem outros tumores mamários, identificados com menos frequência. O CaM inflamatório é caracterizado por células que se infiltram na pele e vasos linfáticos da mama, não gerando, na maioria dos casos, nódulos distintos. Seus sintomas incluem vermelhidão na pele da mama, aumento do tamanho e da temperatura local, inversão dos mamilos e surgimento de gânglios maiores nas axilas. É um câncer atípico e extremamente agressivo, representando de 1% a 5% dos casos (ONCOGUIA, 2022; SANTANA; BORGES, 2015; NATIONAL CENTER FOR ADVANCING TRANSLATIONAL SCIENCES –

NCATS, 2022). A Doença de Paget, com incidência inferior a 3%, envolve a papila e a aréola, também presente em mais de 80% dos casos dos carcinomas ductais *in situ* e invasivos. A pele das áreas afetadas geralmente apresenta aspecto de crosta e tonalidade vermelha, papila plana ou invertida. Também são relatadas coceiras e sensação de queimação, além de secreção de sangue ou líquido amarelado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

Entre as neoplasias mamárias raras estão o tumor filóide e o CaM masculino, ambos representando cerca de 1% dos diagnósticos. Tumores filóides acometem os tecidos do estroma mamário, sendo mais comuns em mulheres com idade próxima aos 40 anos. Apresenta prognóstico favorável na maioria dos casos, principalmente nas formas benignas e limítrofes da doença (com baixo potencial de malignidade). Quando malignos, a taxa de sobrevivência livre da doença em 5 anos é de até 80%. A apresentação clínica mais comum é a observação de nódulo palpável, indolor e de rápido crescimento, mas que raramente invade tecidos extra mamários. Nas alterações malignas as taxas de recidiva são altas, com valores próximos a 30% (NCATS, 2022; NUNES; DIAS; TORGAL, 2014; MOREIRA; SALES; DOS SANTOS, 2012). O CaM masculino se assemelha ao feminino, incluindo a conduta clínica (SANTANA; BORGES, 2015; FREITAS *et al.*, 2008).

Uma vez confirmada a presença do CaM, a lesão deve ser estadiada, o que influencia diretamente na tomada de decisões quanto ao tratamento, além de fornecer informações sobre o prognóstico da doença (PANER *et al.*, 2018; MACCHETTI, 2007). Entre os programas de estadiamento, o TNM da American Joint Committee on Cancer (AJCC) é o mais utilizado. Existem dois sistemas de avaliação a partir do estadiamento TNM, sendo o patológico conduzido a partir da análise do tecido, removido através de procedimento cirúrgico, e o estadiamento clínico, o qual considera a biópsia e exames de imagem, em casos em que não é recomendada a intervenção cirúrgica (INCA, 2022; PANER *et al.*, 2018; MACCHETTI, 2007). Em ambos os processos é possível determinar o avanço da doença, avaliando sua localização, extensão (T), disseminação para linfonodos regionais (N) e ocorrência de metástases (M) (GIULIANO *et al.*, 2017; CSERNI *et al.*, 2018).

A partir do TNM é possível a classificação tumoral em quatro estágios distintos, sendo os três primeiros ainda subdivididos em A e B. Quando o diâmetro tumoral é menor que 2 cm, sem ocorrência de disseminação para os linfonodos e outros órgãos, o tumor é classificado em estágio I. Se entre 2 cm e 5 cm, também sem metástases e disseminação linfonodal, em IB (ONCOGUIA, 2022). Com o avanço da doença, os estágios tendem a progredir e piores são os prognósticos. O IV é caracterizado por apresentar metástases à distância, principalmente

nos ossos, cérebro, fígado e pulmão, dificultando os tratamentos e reduzindo as taxas de sobrevida das pacientes (TESHOME, 2018).

A classificação do CaM em graus também é comum e frequentemente utilizada. Baseada em comparações entre a amostra do tumor e tecido normal do órgão afetado, avalia as características celulares e a rapidez com que estas se dividem. As neoplasias de grau 1 (bem diferenciado), são as que apresentam lento crescimento celular e pouca diferenciação entre as células normais e tumorais. Grau 3 ou pouco diferenciado, são aqueles que apresentam crescimento e disseminação rápidos e agressivos. Já os tumores de grau 2 apresentam características intermediárias entre os tipos citados, sendo também classificados como moderadamente diferenciados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; MENDONÇA; SILVA; CAULA, 2004).

1.3 A classificação molecular do Câncer de Mama

O CaM também é categorizado molecularmente conforme a expressão de diferentes receptores, sendo estes o Receptor de Estrógeno (RE), o Receptor de Progesterona (RP) e o Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (CARMO; LEITE; GUERRA, 2016; CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Mais de 70% das células tumorais mamárias apresentam RE, o qual é essencial para sua proliferação descontrolada. Além disso, existe uma correlação entre a expressão de RE e a taxa de mortalidade relacionada a doença. Geralmente, em casos de tumores RE positivos, as pacientes apresentam uma sobrevida maior, pois respondem aos tratamentos hormonais (ZANETTI; OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011).

Além dos receptores, também são adotados os valores de ki-67 e a expressão de P53 e citoqueratinas (CKs) para a classificação dos subtipos. O ki-67 é um marcador nuclear de proliferação celular diretamente relacionado ao prognóstico da doença, de modo que tumores altamente proliferativos (ki-67>14%) são associados a menor tempo de sobrevida. P53 é uma proteína supressora tumoral e responsável por regular o estresse oxidativo e a proliferação e apoptose celulares. Lesões positivas para P53 tendem a ser menos agressivas (HOLANDA, 2016; CHEANG *et al.*, 2009; SERRA *et al.*, 2014). Já as CKs são proteínas constituintes do citoesqueleto das células epiteliais e pertencentes à família dos filamentos intermediários. São catalogadas por numeração referente ao seu peso molecular e possuem características específicas de cada epitélio, que se mantém constantes mesmo em transformações malignas

celulares, sendo, portanto, importantes marcadores moleculares para o CaM (NICOLINI; FERRARI; ROSSI, 2015; CURY, 2008).

Nesse contexto são definidos quatro subtipos principais. O subtipo Luminal A é o de prognóstico mais favorável e acomete cerca de 60% dos casos de carcinoma mamário, sendo positivo para RE e/ou RP, negativo para HER2 e com baixo índice proliferativo. O Luminal B também possui em suas células ao menos um dos receptores hormonais, além de positivos ou negativos para HER2. Apresenta um índice de proliferação celular elevado e, em geral, a sobrevida das pacientes é menor (CARMO; LEITE; GUERRA, 2016; CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Embora alguns tumores Luminal B possam ser identificados pela expressão de HER2, o principal fator capaz de diferenciá-los do subtipo Luminal A é a sua maior expressão de genes relacionados à proliferação, como *CCNB1*, *MYBL2* e *MKI67*, responsável pela codificação da proteína ki-67 (CIRQUEIRA *et al.*, 2011; CHEANG *et al.*, 2009). Ambos, Luminal A e B, são originados das células que revestem o lúmen dos ductos mamários e expressam CK 8 e 18 (BIRNBAUM *et al.*, 2004; BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011; EROLES *et al.*, 2012).

O subtipo HER2-enriquecido representa de 15% a 20% (EROLES *et al.*, 2012) dos casos e possui o receptor epidérmico amplificado (proto-oncogene mutado). Esse gene codifica para proteínas de superfície celular que sinalizam para a proliferação das células mamárias e as mutações aumentam consideravelmente sua replicação. Diferente dos Luminais, esse subtipo não apresenta receptores hormonais, tanto para estrógeno quanto progesterona (BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011; EROLES *et al.*, 2012).

O Triplo-negativo não apresenta nenhum dos marcadores supracitados, sendo considerado o subtipo mais complexo, heterogêneo e de comportamento mais agressivo. Ainda é pouco compreendido, mas sabe-se que está, muitas vezes, associado a mutações no *BRCA1*, gene responsável por desempenhar papel importante no desenvolvimento e prognóstico da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; CIRQUEIRA *et al.*, 2011; GOLEIJ *et al.*, 2020; ZANETTI; OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011). Frequentemente, apresentam-se como cânceres com altas taxas de recidiva e grandes chances de desenvolverem precocemente metástases distantes. Não dispõem de uma terapia alvo eficiente que abranja toda sua complexidade, sendo os tratamentos com hormônios e drogas específicas anti-HER2 dispensáveis. O principal tratamento permanece sendo a quimioterapia. Representa aproximadamente 11% dos carcinomas invasivos e acomete, geralmente, mulheres jovens e afro-americanas, abaixo dos 50 anos (REIS-FILHO; TUTT, 2008; VENKITARAMAN, 2010; ARSLAN; DIZDAR; ALTUNDAG, 2009).

1.4 Os desafios no tratamento do Câncer de Mama

O tratamento do CaM é definido a partir das características do tumor, a idade da paciente e a presença de comorbidades. Para mulheres portadoras da doença em estágios iniciais, como I e II, em geral, é realizada a cirurgia (mastectomia ou quadrantectomia) para retirada do tumor, radioterapia, tratamento hormonal e/ou com anticorpo anti-HER2 conforme o seu subtipo molecular. Para essas pacientes a taxa de sobrevida em 5 anos é superior a 90%. Pacientes em estágio III são submetidas à quimioterapia, cirurgia e radioterapia, com taxa de sobrevida em torno de 72%. Em casos de estágios mais avançados, o tratamento deve ser escolhido buscando um maior equilíbrio entre a regressão tumoral e o prolongamento de vida da paciente, uma vez que metástases a distância são identificadas. Essas pacientes possuem uma taxa de sobrevida média de 22% (ONCOGUIA, 2022; CORTINA *et al.*, 2021). Também são utilizadas a hormonioterapia, terapia-alvo e imunoterapia.

A mastectomia e quadrantectomia consistem na remoção do tumor através de procedimento cirúrgico, podendo ser removidas partes ou a mama por inteiro. Na mastectomia todo o órgão mamário é retirado, podendo incluir alguns tecidos próximos. Geralmente, é indicada em casos de massa tumoral excessiva, ausência de respostas a radioterapia, alta probabilidade de recidiva da doença ou mesmo por escolha da paciente. Já a quadrantectomia - cirurgia conservadora da mama - é um procedimento menos radical em que o tumor é retirado e a estrutura mamária conservada. Em estágios avançados da doença somente o método cirúrgico não é capaz, isoladamente, de remover toda a lesão e, portanto, são utilizados tratamentos complementares. Nos casos de quadrantectomia, geralmente se faz necessária a utilização de procedimento radioterápico adicional (ONCOGUIA, 2022; MEADE; DOWLING, 2013; PAOLUCCI *et al.*, 2021).

Na radioterapia são utilizadas radiações ionizantes direcionadas para o tecido afetado a fim de eliminar as células tumorais ou impedir que estas proliferem. Pode ser utilizada tanto com intenção curativa quanto paliativa. Os métodos e as doses de aplicação são definidos a partir de avaliações médicas, podendo ser empregada em combinação com a quimioterapia ou a cirurgia. Por ser um tipo de tratamento local, tem efeitos colaterais geralmente restritos às áreas tratadas, como dermatites (DE SOUZA *et al.*, 2019; SAWADA; DIAS; ZAGO, 2006).

A hormonioterapia, tipo de tratamento sistêmico, depende diretamente da expressão de estrogênio nas células que compõem o tumor. Consiste no uso de substâncias que suprimem a produção ou resposta a hormônios (RIBEIRO *et al.*, 2017). O tamoxifeno e os inibidores de

aromatase estão entre os principais fármacos utilizados em casos de CaM. O mecanismo de ação do tamoxifeno baseia-se na competição com o estradiol pelo RE presente nas células, tumorais ou não. Já a aromatase é uma enzima envolvida no processo de produção de estrógeno, e sua inibição resulta no bloqueio do processo enzimático adrenal, causando supressão hormonal (GABRIEL *et al.*, 2017). O tratamento é de longa duração, com média de 5-10 anos, e ocorre por via oral, geralmente com administração de um comprimido por dia. Quando conduzido durante o período indicado apresenta impacto positivo na sobrevida das pacientes em longo prazo. Entre seus efeitos colaterais estão a fadiga, náuseas, sudorese noturna, e, em casos menos frequentes, osteoporose e piora nos sintomas da menopausa (BRITO; PORTELA; VASCONCELLOS, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2017; GUEDES *et al.*, 2017).

A terapia alvo, também sistêmica, consiste na utilização de fármacos que atuam em marcadores específicos, geralmente presentes nas células tumorais. Normalmente provoca menores danos às células normais e, conseqüentemente, poucos efeitos colaterais (SCHMITT, 2009). No CaM, o tratamento com anticorpo monoclonal trastuzumabe tem sido o mais empregado e com elevados índices de êxito (MAXIMIANO *et al.*, 2016). Sua administração é indicada em casos de CaM HER2-enriquecido. Além deste, existem também os inibidores de PARP (poli (ADP-ribose) polimerase), enzima atuante no reparo de danos ao DNA. Células cancerígenas com *BRCA* mutado apresentam falhas recorrentes no reparo de seu material genético, recrutando, assim, as enzimas PARP para sua sobrevivência (SLADE, 2020; TURK; WISINSKI, 2018; WANG; LUO; WANG, 2019). Com a radioterapia e quimioterapia atuando de forma a gerar instabilidade genômica e replicativa nas células tumorais, a inibição de sistemas de reparo se torna interessante e tem se mostrado eficaz, ao alvejar justamente as células transformadas (SLADE, 2020; TURK; WISINSKI, 2018). Em humanos, os medicamentos olaparibe e talazoparibe são inibidores de PARP-1, aprovados para o tratamento de tumores mamários, principalmente triplo-negativos com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (TURK; WISINSKI, 2018; WANG; LUO; WANG, 2019).

Na imunoterapia, o sistema imunológico é estimulado com o uso de substâncias capazes de modificar a resposta biológica, podendo atuar de maneira ativa, potencializando a resposta imune antitumoral natural, ou passiva, fornecendo elementos atuantes do sistema imunológico (MAXIMIANO *et al.*, 2016; SCHMITT, 2009). As células T apresentam proteínas reguladoras de morte celular, como a PD-1. Porém, a fim de burlar este sistema, as células tumorais passam a produzir a PD-L1, uma molécula ligante à PD-1, responsável por modular a ação dos linfócitos, impedindo que estes combatam as células transformadas. O

atezolizumabe, anti-PDL1, é um importante imunoterápico utilizado em conjunto à quimioterapia para o CaM, indicado para tumores triplo-negativos (SCHMID *et al.*, 2018). Por basear-se no fortalecimento do sistema imune natural do organismo, a imunoterapia é capaz de proporcionar uma maior redução da toxicidade do tratamento a células normais (MAXIMIANO *et al.*, 2016).

Outros tratamentos não convencionais também podem ser utilizados no CaM. A ablação térmica objetiva destruir as lesões sem intervenção cirúrgica. O procedimento inclui a utilização de sondas injetadas e guiadas por imagem, como o ultrassom, com a liberação de energia sobre o tumor até que a temperatura atinja níveis citotóxicos, podendo essa ser fornecida através de radiofrequência, lasers, microondas, entre outros. A crioablação é uma das variações desse tratamento, com o congelamento tumoral pela emissão de gases em temperaturas de -20 a -40°C. Por ser minimamente invasivo, o método é seguro, com riscos mínimos, apresentando efeitos colaterais simples, como desconforto local (BRACE; HINSHAW; LUBNER, 2011).

As células cancerígenas são mais susceptíveis ao calor se comparadas às normais, sendo essa uma vantagem utilizada não somente no tratamento por ablação térmica, mas também na hipertermia. Nesta, busca-se o aumento da temperatura tumoral e difere do método anterior pela estratégia de fornecimento de energia. Na hipertermia, geralmente são utilizadas nanopartículas magnéticas, injetadas no tecido tumoral, com a posterior transformação de energia magnética em energia térmica. Tratamentos radioterápicos adicionais são comumente utilizados combinados à hipertermia (BARONZIO *et al.*, 2014; MARTA; HIJAL; DE ANDRADE CARVALHO, 2017; KAIDAR-PERSON; OLDENBORG; POORTMANS, 2018).

Finalmente, o tratamento quimioterápico consiste na utilização de compostos químicos que alvejam células circulantes. As duas classes de medicamentos mais utilizados no CaM são as antraciclínas e os taxanos. Antraciclínas são classificadas como antibióticos antitumorais, capazes de inibir a enzima topoisomerase II, impedindo a replicação do DNA e promovendo a morte celular. Entre os principais fármacos do grupo estão a doxorrubicina e seu análogo estrutural epirrubicina. Por sua vez, os taxanos agem reprimindo a proliferação celular por meio da estabilização dos microtúbulos formados no processo de divisão celular. São muitas vezes reconhecidos como inibidores de mitose, destacando-se para o câncer mamário o paclitaxel e o docetaxel (GABRIEL *et al.*, 2017).

Apesar de amplamente utilizada, a quimioterapia apresenta limitações como a resistência desenvolvida pelas células tumorais, seja esta intrínseca ou adquirida. Na primeira,

os fatores que medeiam a resistência já se encontram expressos nas células transformadas e, na adquirida, as células tumorais apresentam susceptibilidade à droga, mas, por ocorrência de mutações, *splicing* alternativo e alterações no padrão de expressão de receptores, passam a não responder ao tratamento (GABRIEL *et al.*, 2017; HOLOHAN *et al.*, 2013). Adicionalmente, a quimioterapia é agressiva não somente às células tumorais, mas também normais, podendo causar diferentes efeitos colaterais como fadiga, queda de cabelo, náuseas e vômitos, anemias, infecções, problemas cardíacos e até infertilidade. Torna-se, então, necessária a busca por novos medicamentos mais efetivos e menos tóxicos, auxiliando, assim, no tratamento das pacientes (ONCOGUIA, 2022; ALI *et al.*, 2013). Nesse cenário, compostos químicos metálicos têm se destacado. Esses são formados a partir de um metal central que age como receptor de elétrons associado a um ou mais ligantes, os quais são moléculas ou íons doadores de elétrons (SKOOG *et al.*, 2014).

1.5 Os complexos metálicos de cobre

O primeiro composto químico metálico utilizado como quimioterápico foi a cisplatina [cis-diaminodicloroplatina(II)], descoberta na década de 1960 por Rosenberg. Contudo, a administração dessa droga causa preocupantes efeitos adversos e pouco eficaz frente aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células (DILRUBA; KALAYDA, 2016). Desde então, outros compostos vêm sendo avaliados tendo no centro moléculas metálicas como ouro, rutênio, paládio, bismuto e cobre (GOUVEA *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2017; MARZANO, 2013; POPOLIN, 2021).

Devido a sua capacidade de doar elétrons, adquirindo caráter positivo, os metais possuem uma forte tendência a se ligarem ao material genético e a proteínas celulares com carga elétrica contrária. São capazes de bloquear a replicação do DNA, a transcrição e a tradução, ativando, ainda, vias de transdução de sinal que resultam na morte celular (SIDDIK, 2003; JORDAN; CARMO-FONSECA, 2000; GHOSH, 2019). Além disso, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), substâncias químicas participativas da proliferação celular, apoptose e outras sinalizações, e que são capazes de reagir com grande parte das moléculas celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Quando em níveis elevados, as EROs acabam por induzir alterações funcionais irreversíveis nestas moléculas, podendo levar à sua destruição por completo (HECHT *et al.*, 2016; BRIEGER *et al.*, 2012). Por já possuírem níveis elevados de EROs, as células de CaM se tornam mais susceptíveis a estes danos, tendo sua capacidade antioxidante sobrecarregada

quando submetidas a níveis ainda mais altos destas espécies reativas. Neste sentido, a utilização de complexos metálicos como fins antineoplásicos tem se mostrado promissora, induzindo a morte de células cancerosas, mas não atingindo aquelas que não são tumorais (HECHT *et al.*, 2016).

Marzano (2013) já demonstrou resultados interessantes ao tratar células tumorais leucêmicas com derivados do bismuto (III). Dentre seus compostos, dois foram sintetizados com antibióticos da família das sulfas e apresentaram atividade citotóxica frente as células tumorais, com IC₅₀ de 9.7 µmol/L. Os complexos com NN'O doadores chegaram a apresentar valores de IC₅₀ de 0.3 e 0.38 µmol/L. O composto [Pt(DMSO)(SPF)Cl]Cl, derivado da platina (II), e descrito por Oliveira (2018) demonstrou mecanismo de ação por apoptose tardia, sendo mais ativo e seletivo do que a cisplatina contra células de CaM. As linhagens MCF-10A, MCF7 e MDA-MB-231 foram utilizadas no ensaio e o composto se mostrou seletivo às células tumorais. Já os resultados de Popolin (2021) evidenciaram os efeitos citotóxico e antiproliferativo de seis compostos de rutênio, todos com efeito frente as células tumorais mamárias utilizadas. Dentre esses, destaca-se o composto Ru(Amsal) por sua eficácia e maior seletividade, induzindo apoptose dependente de concentração na linhagem MDA-MB-231.

Quanto aos complexos metálicos de cobre (II), já foi descrita sua capacidade em clivar o DNA das células tumorais a partir da produção de EROs (ALAJMI *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2011). As interações entre moléculas e o DNA são um dos principais mecanismos de ação de diversos fármacos antitumorais (SILVA *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2009). Compostos cúpricos possuem a capacidade de se intercalar entre os pares de bases e os sulcos da dupla fita (TAN *et al.*, 2009; MENDO *et al.*, 2015). Além disso, células tumorais apresentam transportadores de cobre superexpressos, resultando em maior absorção e acúmulo do metal e, por se manterem em alta taxa de divisão celular, há uma maior exposição de seu material genético (ULLAH *et al.*, 2011). Nesse contexto, células malignas são mais susceptíveis à ação dos compostos metálicos, que pela ocorrência de processos hidrolíticos e/ou oxidativos, acabam por clivar a molécula do DNA, comprometendo a proliferação celular e ativando mecanismos apoptóticos (MENDO *et al.*, 2015). Por ser um metal biologicamente ativo, acredita-se que seja menos tóxico para as células normais quando comparado a fármacos à base de metais não essenciais, como é o caso da cisplatina. Os resultados de Low *et al.* (2015) e Foo *et al.* (2018) confirmam a promissora utilização de complexos metálicos de cobre (II) para o controle de células tumorais mamárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade de compostos metálicos de cobre inéditos em linhagens tumorais de CaM representativas de seus subtipos moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Definir as concentrações dos compostos que sejam citotóxicas a células tumorais mamárias;
- Avaliar a influência dos ligantes dos compostos na citotoxicidade observada;
- Avaliar o comportamento dos compostos nos diferentes subtipos moleculares de CaM;
- Avaliar a seletividade dos compostos; e
- Determinar o(s) composto(s) promissor(es) para estudos detalhados de seu(s) mecanismo(s) de ação em tumores mamários.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Complexos metálicos de cobre

Os complexos metálicos de cobre, não publicados, foram sintetizados pelo grupo do professor Wendell Guerra (IQUFU-UFU) e cedidos em regime de colaboração.

3.2 Linhagens celulares

Para o cultivo celular foram utilizadas três linhagens celulares mamárias adquiridas do ATCC:

- MCF-10A (linhagem não tumorigênica epitelial mamária): cultivada em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,1% de gentamicina,

0,1% insulina, 0,025% hidrocortisona e 0,005% de fator de crescimento epidérmico (EGF).

- MCF7 (fenótipo luminal): cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de gentamicina.
- MDA-MB-231 (fenótipo triplo-negativo): cultivada em meio L15 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de gentamicina.

Todas foram mantidas a 37°C até a confluência de 80%, quando então foram utilizadas. As linhagens MCF10-A e MCF7 foram cultivadas em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 Citotoxicidade pelo método Alamar Blue

Os efeitos dos compostos metálicos sobre as células tumorais mamárias MCF7 e MDA-MB-231, e não tumorigênica MCF-10A, foram avaliados pelo ensaio de Alamar Blue conforme descrito por AHMED, GOGAL e WALSH (1994) com modificações. Após verificada a confluência, as células foram desagregadas enzimaticamente e centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Foi realizada a contagem e teste de viabilidade em azul de tripano para o plaqueamento de 1×10^4 células/poço. Esse número de células foi adicionado a placas de 96 poços em um volume de 150 µL de meio de cultura completo, com posterior incubação a 37°C por 24 horas, sendo as linhagens MCF7 e MCF-10A mantidas em atmosfera de 5% de CO₂. Após confluência, o sobrenadante foi retirado. Os compostos metálicos de cobre Lu50 a Lu59 foram ressuspensos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura e adicionados nas células nas seguintes concentrações finais, em diluição seriada: 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM; 40 µM e 80 µM. Os tratamentos foram realizados por 24 e 48 horas. Quatro horas antes do término de cada incubação, 10% de Alamar Blue (INLAB) a 150 µg/mL foi adicionado e, ao final desse período, as placas foram lidas nas absorvâncias de 560 e 630 nm em leitora *Readwell Plate*, Robonik. Poços contendo apenas células e meio foram considerados como controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata para cada composto e para cada uma das concentrações utilizadas. A viabilidade foi calculada de acordo com a fórmula (F1) e expressa em porcentagem.

(F1)

$$\%Viabilidade\ Celular = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Sendo:

O1 = Coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado à 570 nm (pré-determinado em 117216)

O2 = Valor de coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado à 600 nm (pré-determinado em 80586)

A1 = Absorbância das células tratadas com os compostos à 570 nm

A2 = Absorbância das células tratadas com os compostos à 600 nm

P1 = Valores de absorbância do controle negativo à 570 nm (apenas meio e célula)

P2 = Valores de absorbância do controle negativo à 600 nm (apenas meio e célula)

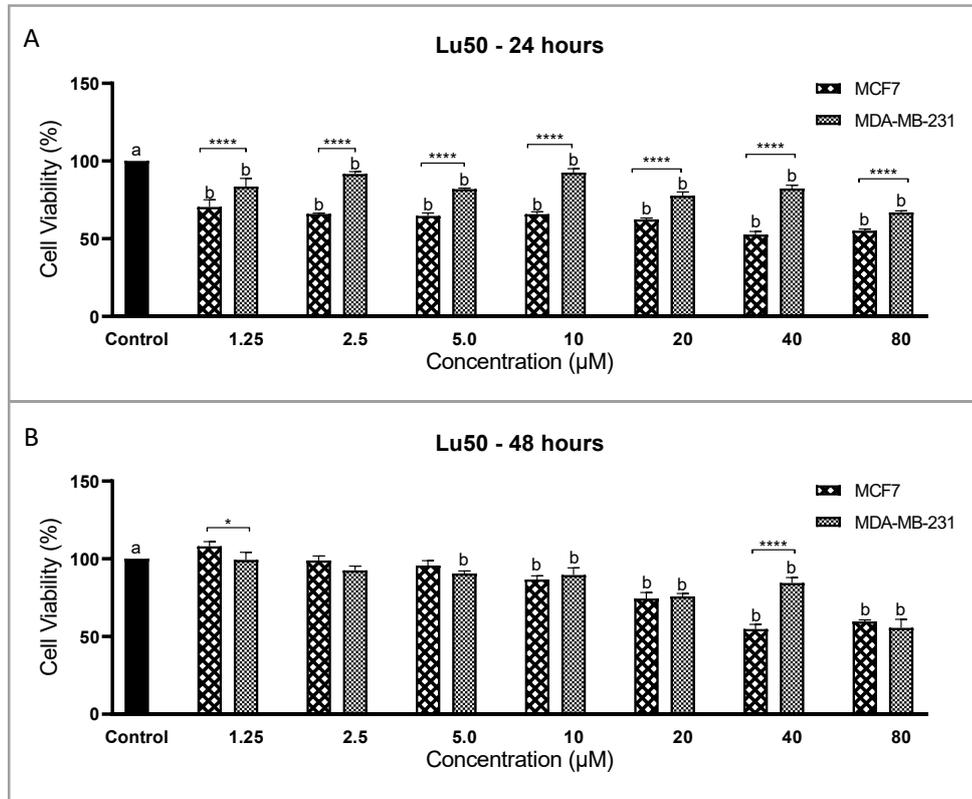
3.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram apresentados como média (\pm DP) e analisados pelo software GraphPad Prism 8.0. Foi estabelecida a distribuição dos dados e empregado o teste ANOVA seguida do pós-teste de Tukey para a determinação da diferença estatística, considerada significativa quando $p < 0,05$. O IC_{50} foi calculado por regressão não linear.

4 RESULTADOS

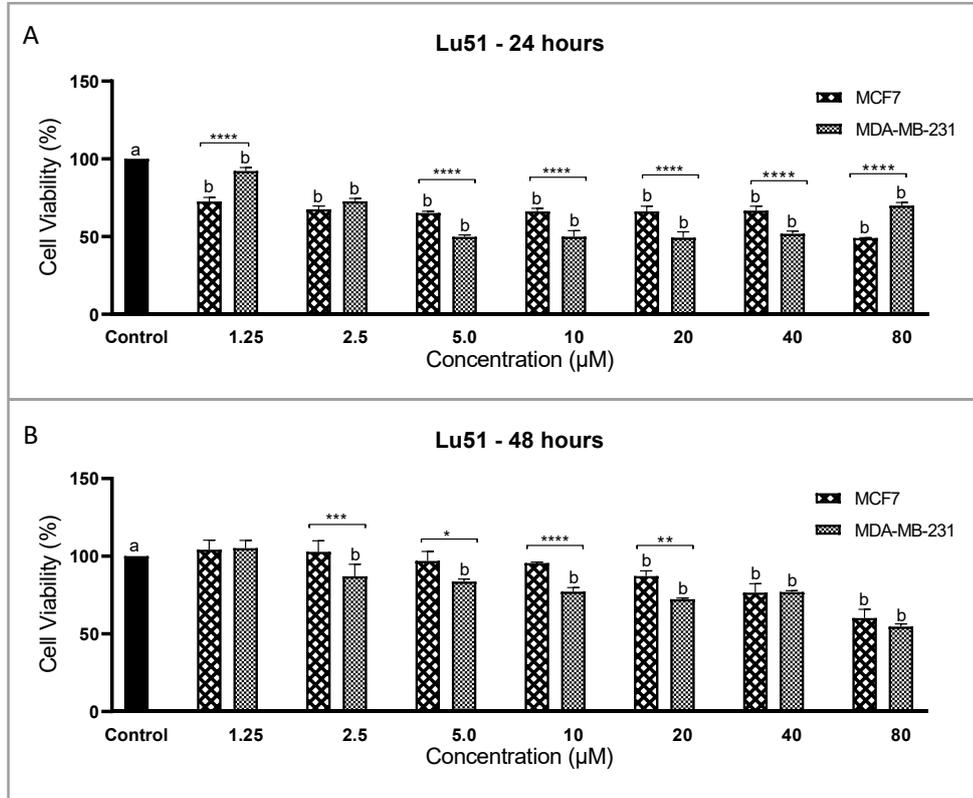
A citotoxicidade do composto Lu50 foi determinada sobre as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 (Figura 4). Após 24 horas (Figura 4A) a substância diminuiu a viabilidade de ambas linhagens quando comparada ao controle tratado apenas com meio e células. Contudo, foi mais citotóxico para MCF7 em relação à MDA-MB-231 em todas as concentrações. Após 48 horas (Figura 4B) e nas menores concentrações de 1,25 μ M; 2,5 μ M e 5 μ M não foi observado nenhum efeito sobre as células tumorais luminais nas análises comparativas ao controle com meio e células. Na linhagem TN a citotoxicidade foi verificada a partir de 5 μ M. Quando tratadas com Lu50 a 40 μ M, a viabilidade da MCF7 foi inferior à MDA-MB-231. Em nenhum dos tratamentos a viabilidade foi inferior a 50%, o que inviabilizou o cálculo do IC_{50} .

Figura 4. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em porcentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu50. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; **** $P < 0,0000001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



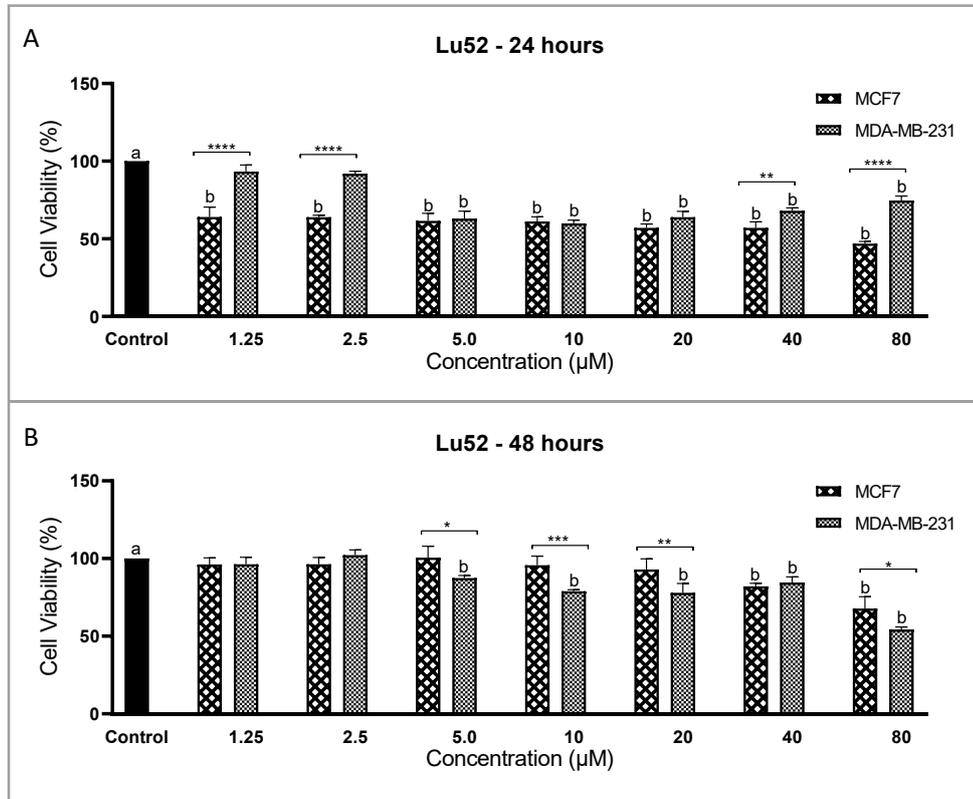
Para o composto metálico Lu51 (Figura 5), após 24 horas (Figura 5A) ambas as linhagens foram responsivas. Nas concentrações de 5 μM , 10 μM , 20 μM e 40 μM , a citotoxicidade foi mais expressiva para a linhagem representativa de CMTN. Na maior concentração, o efeito foi mais proeminente nas células MCF7. Interessantemente, após 48 horas (Figura 5B), as células recuperaram sua viabilidade, sendo o composto menos citotóxico. Assim como no ensaio anterior, Lu51 apresentou um maior efeito quando o tratamento foi realizado a 80 μM . Novamente, os tratamentos não diminuíram a viabilidade de ambas linhagens em mais de 50%.

Figura 5. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em porcentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu51. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



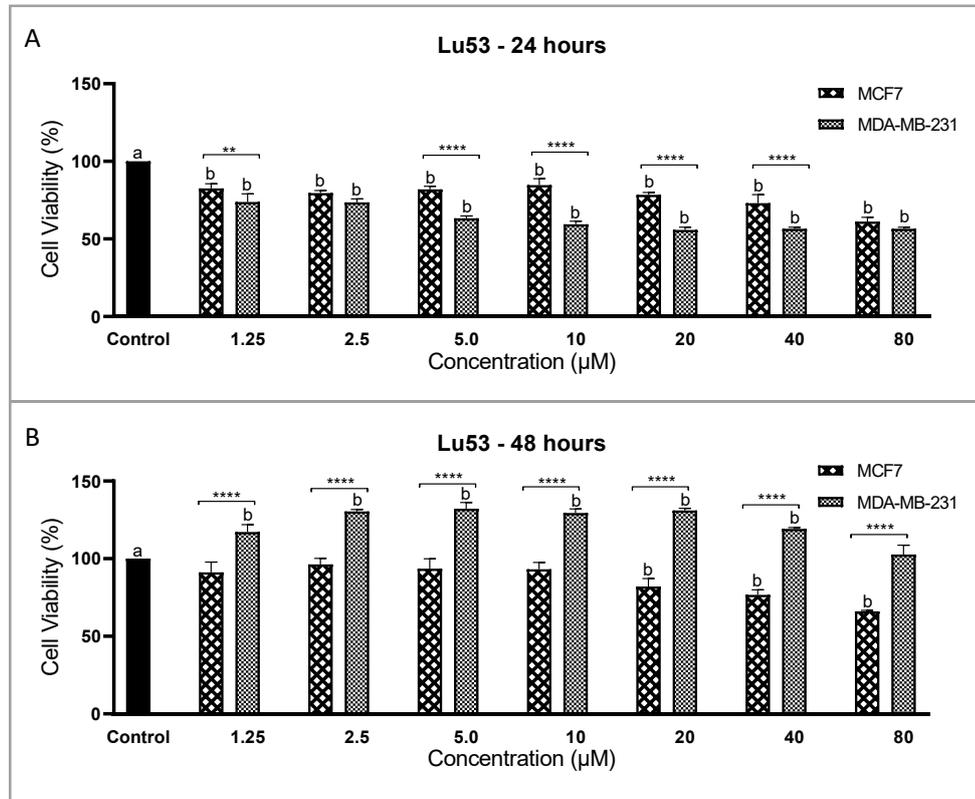
O composto metálico Lu52 (Figura 6), após 24 horas (Figura 6A) e a 5 μM , diminuiu a viabilidade de ambas as linhagens quando comparadas ao controle. No entanto, a substância foi mais citotóxica para a MCF7 em relação à linhagem TN nas duas maiores e nas duas menores concentrações. Após 48 horas (Figura 6B) as células recuperaram a sua viabilidade e não foi observado nenhum efeito nas concentrações a 1,25 μM e 2,5 μM . Quando a linhagem TN foi tratada com o composto a 80 μM sua viabilidade foi menor à da MCF7. Em nenhum dos tratamentos a viabilidade foi inferior a 50%.

Figura 6. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em porcentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu52. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



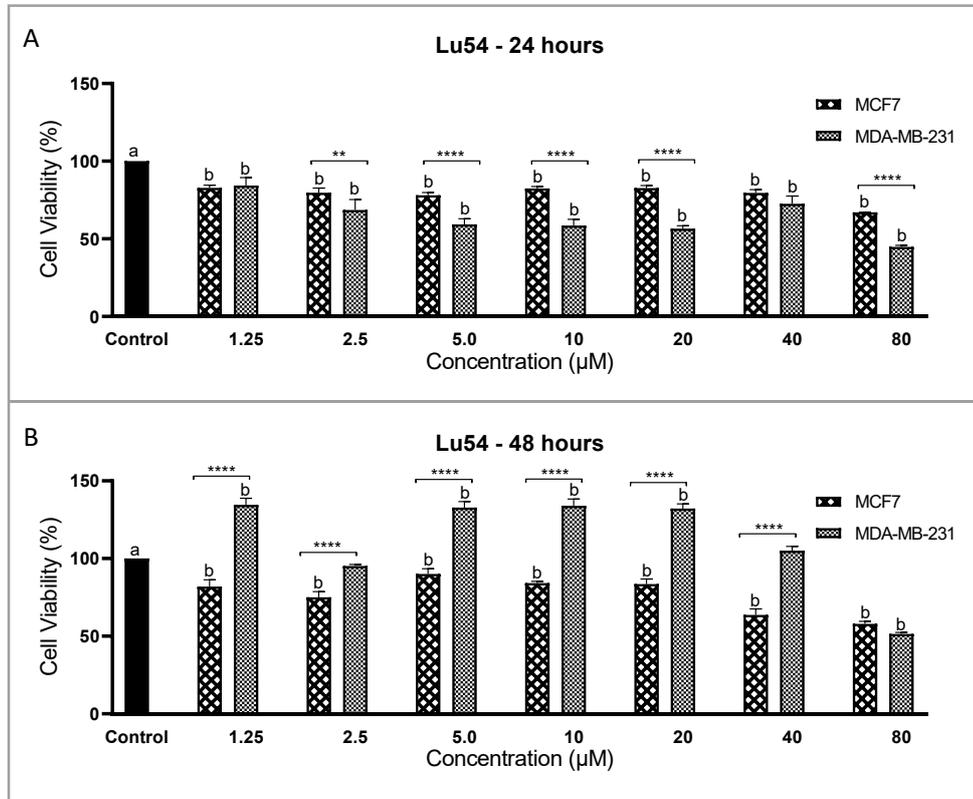
Para o composto Lu53 (Figura 7) seu comportamento foi o oposto ao Lu52. Após 24 o composto foi mais citotóxico à MDA-MB-231 (Figura 7A). Após 48 horas (Figura 7B), as células recuperaram a sua viabilidade, sendo mais citotóxico para a linhagem luminal. Como anteriormente, nenhuma condição inibiu mais do que 50% da viabilidade celular.

Figura 7. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 expressa em porcentagem (%) após tratamento com o composto metálico de cobre Lu53. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



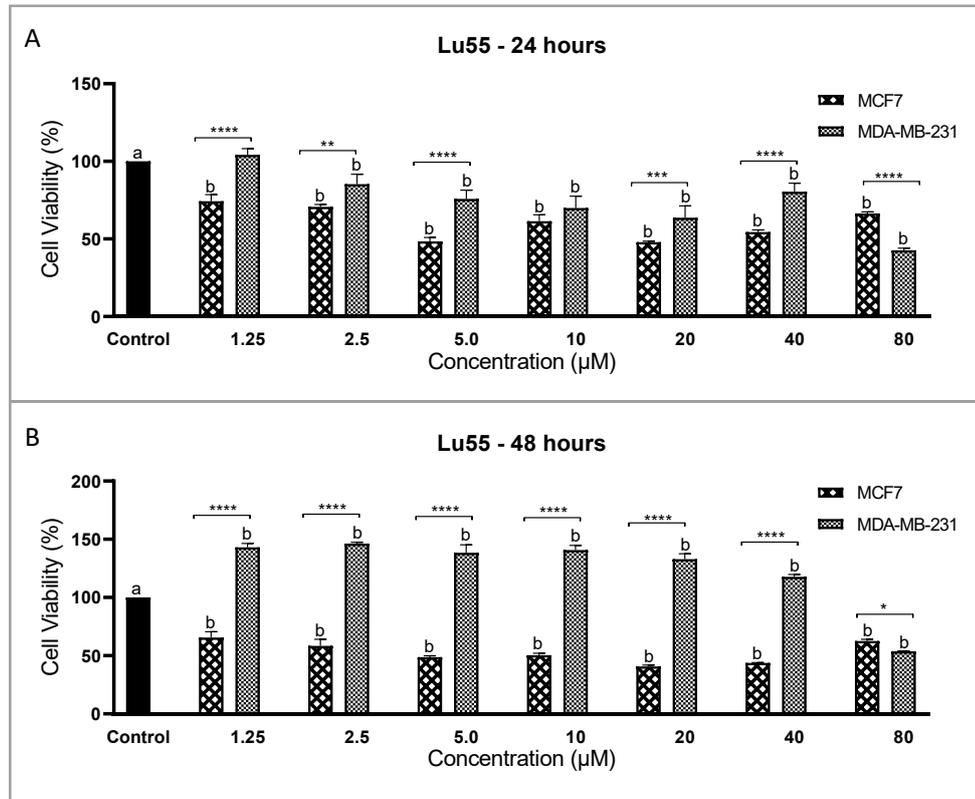
Para o composto Lu54 (Figura 8), no tratamento em 24 horas (Figura 8A), observou-se uma maior citotoxicidade para a linhagem TN MDA-MB-231 em relação à MCF7 nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20 e 80 μM . Já a linhagem tumoral luminal manteve sua viabilidade em torno de 78,9 %. Todos os tratamentos diferiram do controle, mas não foram inferiores a 50%. Para o tratamento de 48 horas (Figura 8B), verificou-se uma diminuição da viabilidade da MCF7 semelhante ao tratamento anterior. Já na linhagem TN houve uma indução de proliferação em todas as concentrações do composto, exceto a 80 μM . Novamente a viabilidade se manteve acima de 50%.

Figura 8. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu54. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



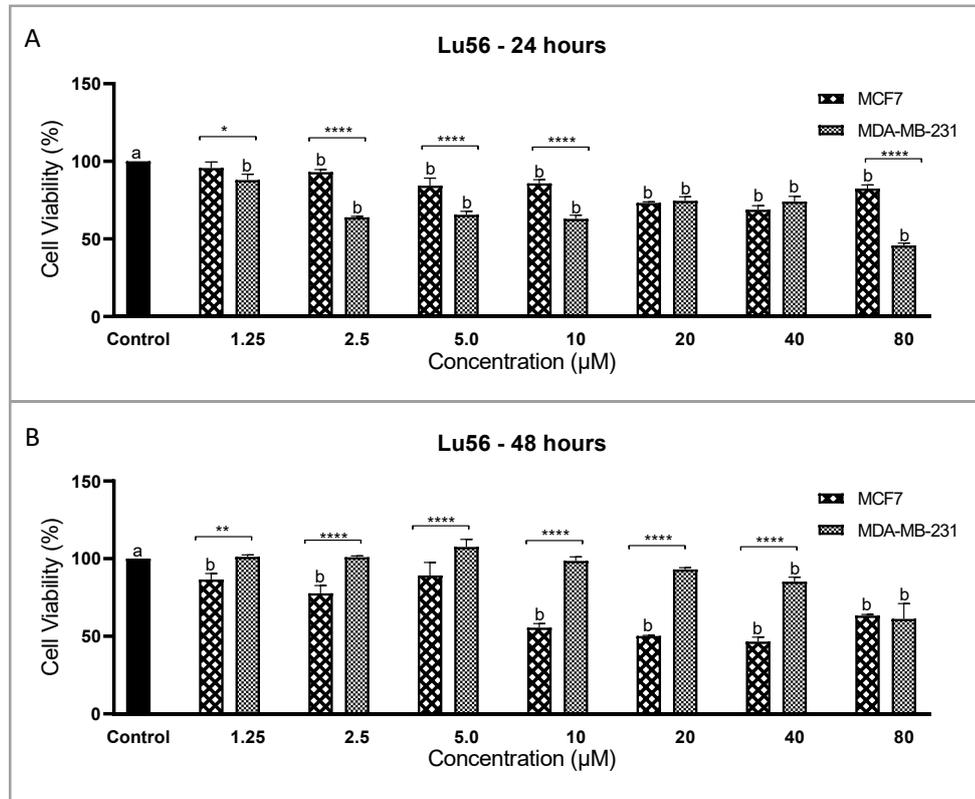
Já o composto Lu55 (Figura 9), em 24 horas (Figura 9A), apresentou um comportamento não-dependente da concentração utilizada, sendo mais citotóxico à MCF7 até 40 μM . A partir de 2,5 μM o composto também diminuiu a viabilidade da linhagem TN. Em relação ao tratamento de 48 horas (Figura 9B), a citotoxicidade à MCF7 foi mais expressiva, mas, assim como o composto Lu54, as células TN proliferaram, exceto no tratamento com a maior concentração. Nenhuma condição inibiu mais do que 50% da viabilidade celular.

Figura 9. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu55. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



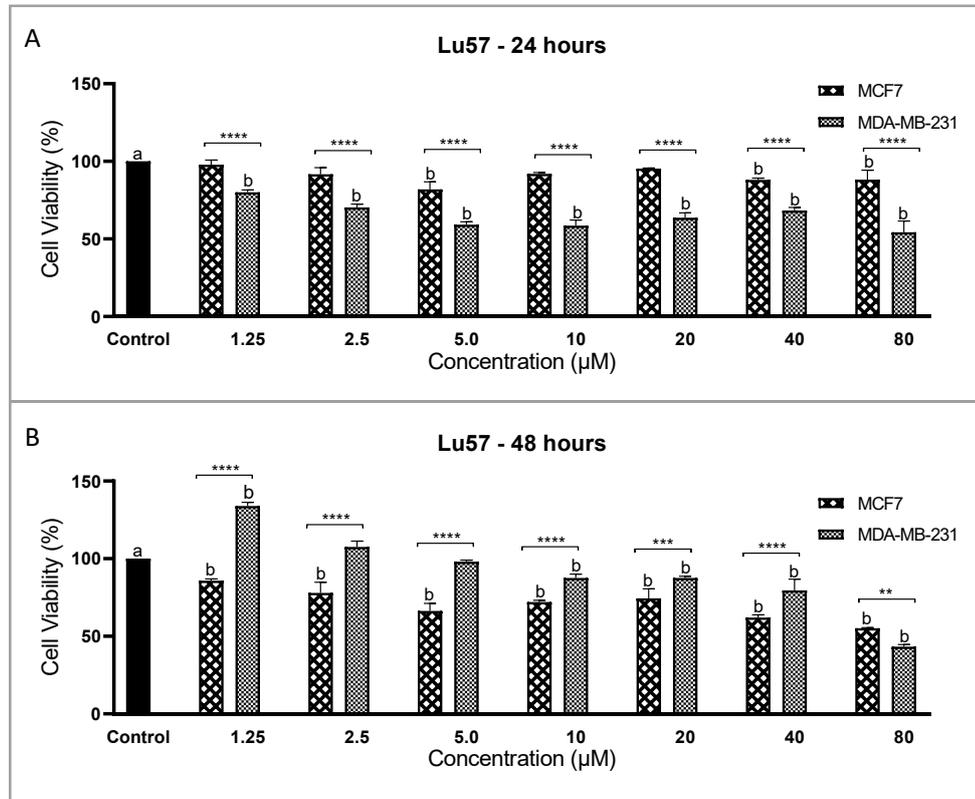
Assim como os compostos anteriormente citados, Lu56 (Figura 10) também não apresentou eficácia contra as células tumorais, exibindo dados de viabilidade celular sempre acima de 50%. Para o tratamento em 24 horas (Figura 10A), a MDA-MB-231 foi ligeiramente mais sensível. Já para o tratamento em 48 horas (Figura 10B), nota-se um comportamento contrário, com maior citotoxicidade para MCF7, até a concentração de 40 μM .

Figura 10. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu56. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



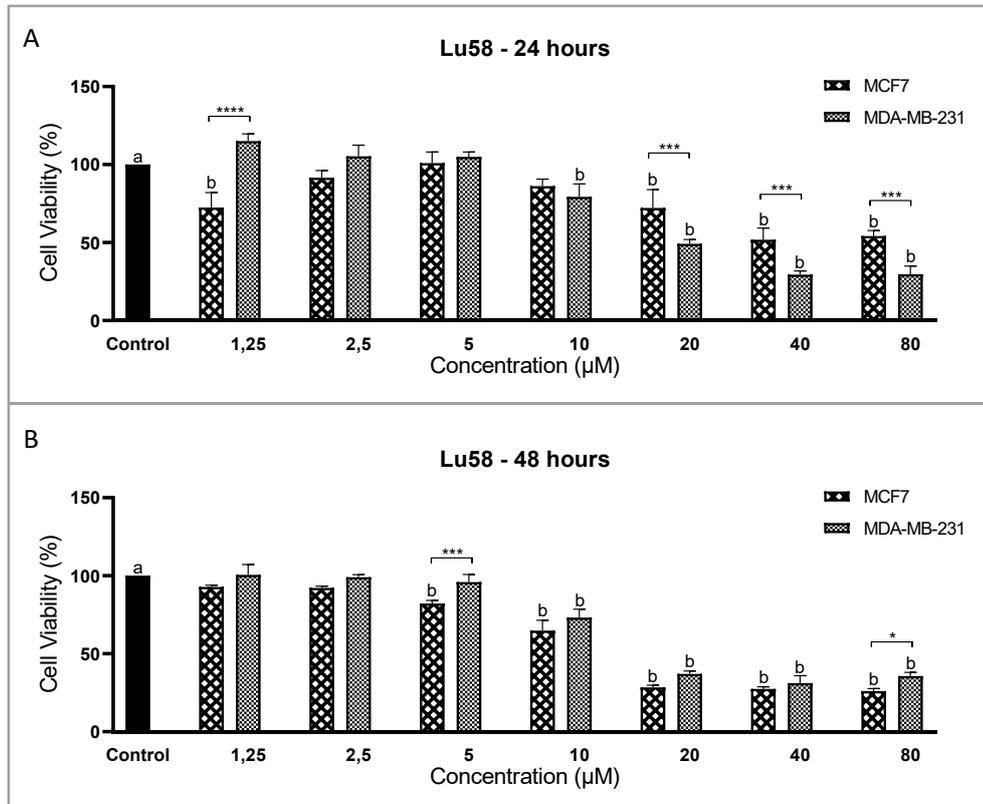
Os resultados para Lu57 (Figura 11) também mostraram maior inibição da linhagem TN MDA-MB-231 em relação a MCF7, em todas as concentrações do composto no tratamento por 24 horas (Figura 11A). A linhagem luminal manteve sua viabilidade na média de 90,7%. Já no tratamento por 48 horas (Figura 11B), as células MDA-MB-231 proliferaram, após serem tratadas com a substância nas duas menores concentrações. Em relação às células luminais, a linhagem MCF7 foi mais sensível ao tratamento, exceto na maior concentração. Em nenhuma das condições houve inibição de 50% das células.

Figura 11. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu57. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



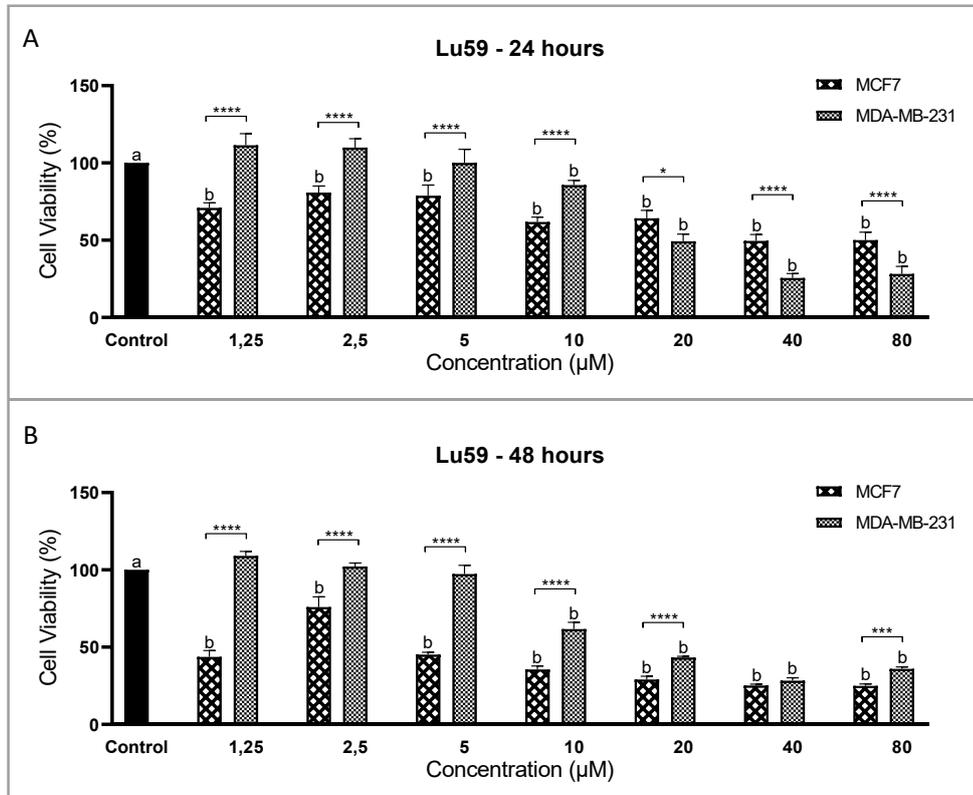
Para o composto Lu58 (Figura 12), em 24 horas (Figura 12A), foi observada a diminuição da viabilidade da linhagem TN de forma dependente da concentração utilizada, com significância estatística a partir de 10 μM , quando comparada ao controle. A partir de 20 μM , os tratamentos diferiram entre as células tumorais, sendo as MDA-MB-231 mais sensíveis. No tratamento de 48 horas (Figura 12B) ambas as células testadas tiveram sua viabilidade diminuída, mas diferiram entre si apenas nas concentrações de 5 e 80 μM . Quanto ao IC_{50} , em 24 horas, para MDA-MB-231, o valor foi de 25,09 μM e, para 48 horas foi de 22,53 μM . Em relação a MCF7, o cálculo de IC_{50} só foi possível para o tratamento de 48 horas, com valor de 15,47 μM .

Figura 12. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu58. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



Por fim, Lu59 (Figura 13) também foi testado em ambas as linhagens. Após 24 horas (Figura 13A) a toxicidade para a linhagem TN só foi observada a partir de 10 μM , de maneira dose-dependente. Já MCF7 foi responsiva em todas as concentrações. Para o tratamento de 48 horas (Figura 13B), o perfil da célula TN se manteve e a MCF7 teve sua viabilidade significativamente comprometida. O cálculo de IC_{50} para Lu59 foi possível nos dois tempos de tratamento e para ambas as linhagens. Em 24 horas, o valor foi de 64,75 μM para MCF7, caindo para 3,77 μM no tratamento de 48 horas. Para MDA-MB-231, o IC_{50} foi 24,21 μM após 24 horas, diminuindo para 21,66 μM em 48 horas.

Figura 13. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu59. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



Finalmente, na Tabela 1 são apresentados os valores de IC_{50} para cada um dos tratamentos. Para os compostos Lu50 à Lu57, não foi observada redução da viabilidade celular em mais de 50% frente as linhagens tumorais MCF7 e MDA-MB-231, não sendo possível o cálculo de IC_{50} . Já Lu58 e Lu59 se mostraram citotóxicos, sendo mais ativo na linhagem luminal MCF7, principalmente no maior tempo de tratamento.

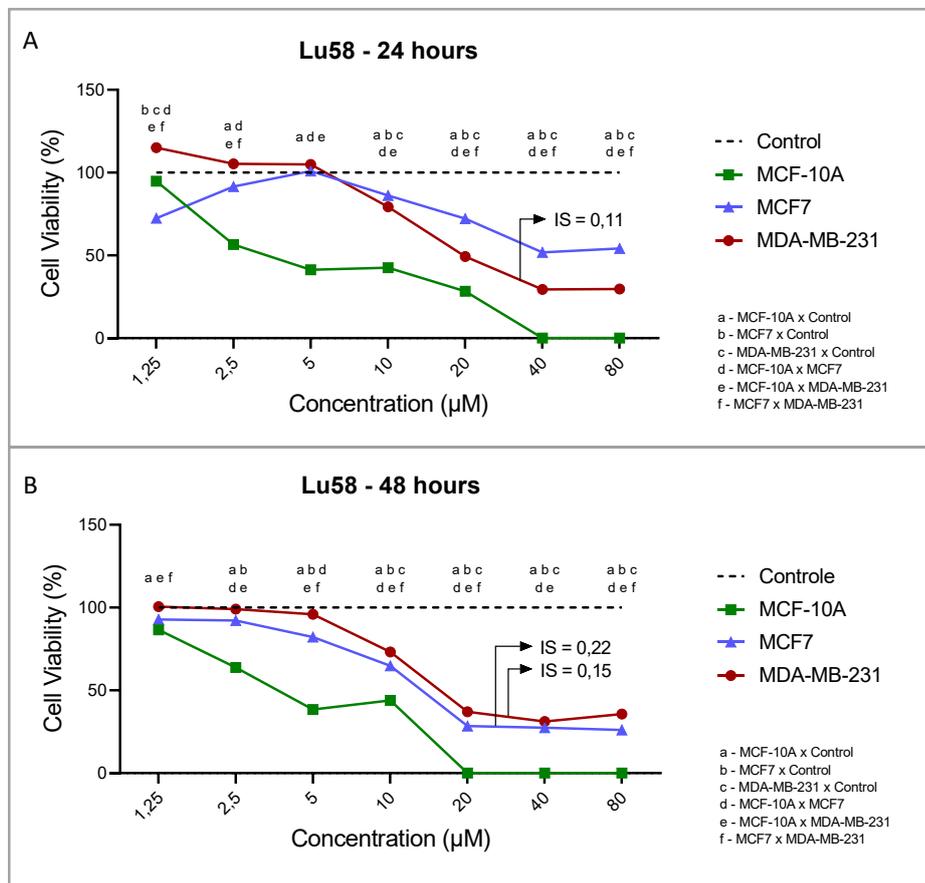
Tabela 1. Valores de IC_{50} dos compostos metálicos de cobre (II) Lu50 à Lu59 com base no ensaio de citotoxicidade Alamar Blue, nas linhagens celulares de Câncer de Mama MCF7 e MDA-MB-231.

Compostos	IC_{50} (µM)			
	24 horas		48 horas	
	MCF 7	MDA-MB-231	MCF 7	MDA-MB-231
Lu50	ND	ND	ND	ND
Lu51	ND	ND	ND	ND
Lu52	ND	ND	ND	ND
Lu53	ND	ND	ND	ND
Lu54	ND	ND	ND	ND
Lu55	ND	ND	ND	ND
Lu56	ND	ND	ND	ND
Lu57	ND	ND	ND	ND
Lu58	ND	25,09	15,47	22,53
Lu59	64,75	24,21	3,77	21,66

ND: $IC_{50} > 80$ µM

Após observada citotoxicidade dos compostos Lu58 e Lu59 frente ambas as linhagens tumorais, sua atividade também foi avaliada em linhagem não tumoral MCF-10A, de modo a verificar a seletividade. Ao contrário do esperado, Lu58 (Figura 14) se apresentou altamente citotóxico. Em 24 horas (Figura 14A), a diminuição na viabilidade celular foi observada a partir da segunda menor concentração, de 2,5 μM . Em 48 horas (Figura 14B), o perfil observado foi semelhante, chegando a inibir completamente a viabilidade a partir de 20 μM . Em relação ao IC_{50} , os resultados foram baixos, sendo de 2,657 μM para o tratamento de 24 horas, e 3,458 μM em 48 horas.

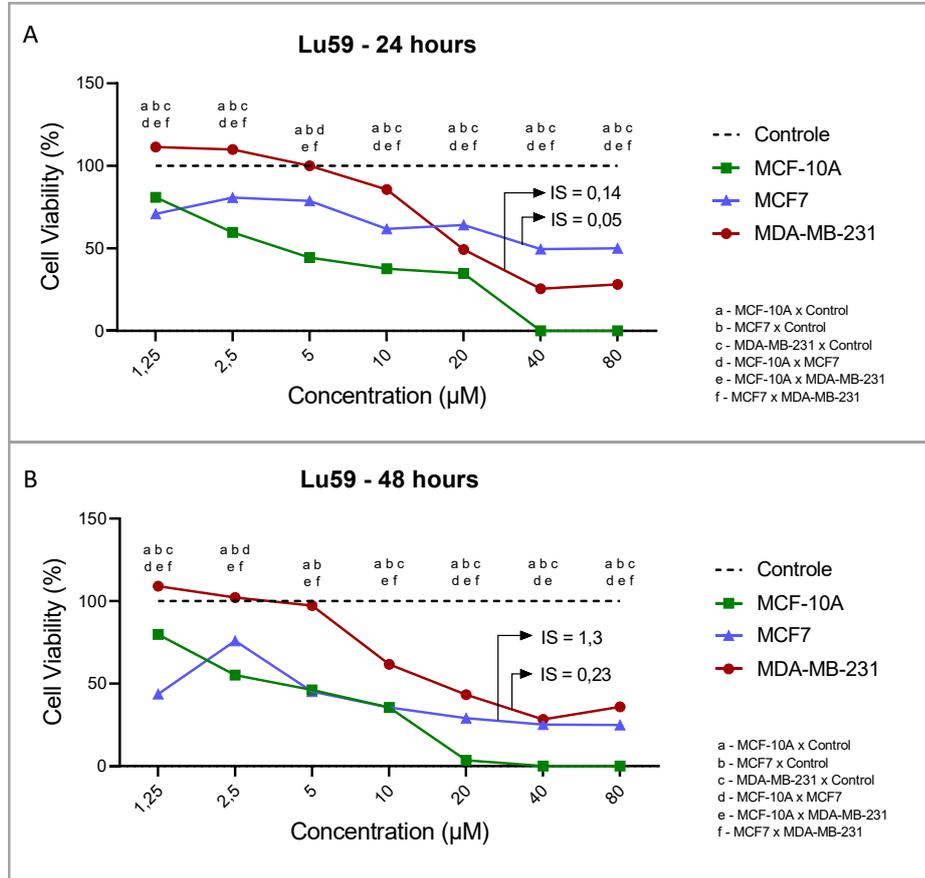
Figura 14. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-10A (não tumorigênica) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu58. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. IS: índice de seletividade.



Assim como Lu58, o composto Lu59 também não se mostrou seletivo, afetando a viabilidade da linhagem não tumoral (Figura 15). Em 24 horas (Figura 15A), observa-se diminuição da viabilidade celular de modo dependente da concentração, com completa inibição das células nas concentrações de 40 e 80 μM . O tratamento em 48 horas (Figura 15B) foi semelhante, afetando a linhagem não tumoral de modo dependente da dose. Os

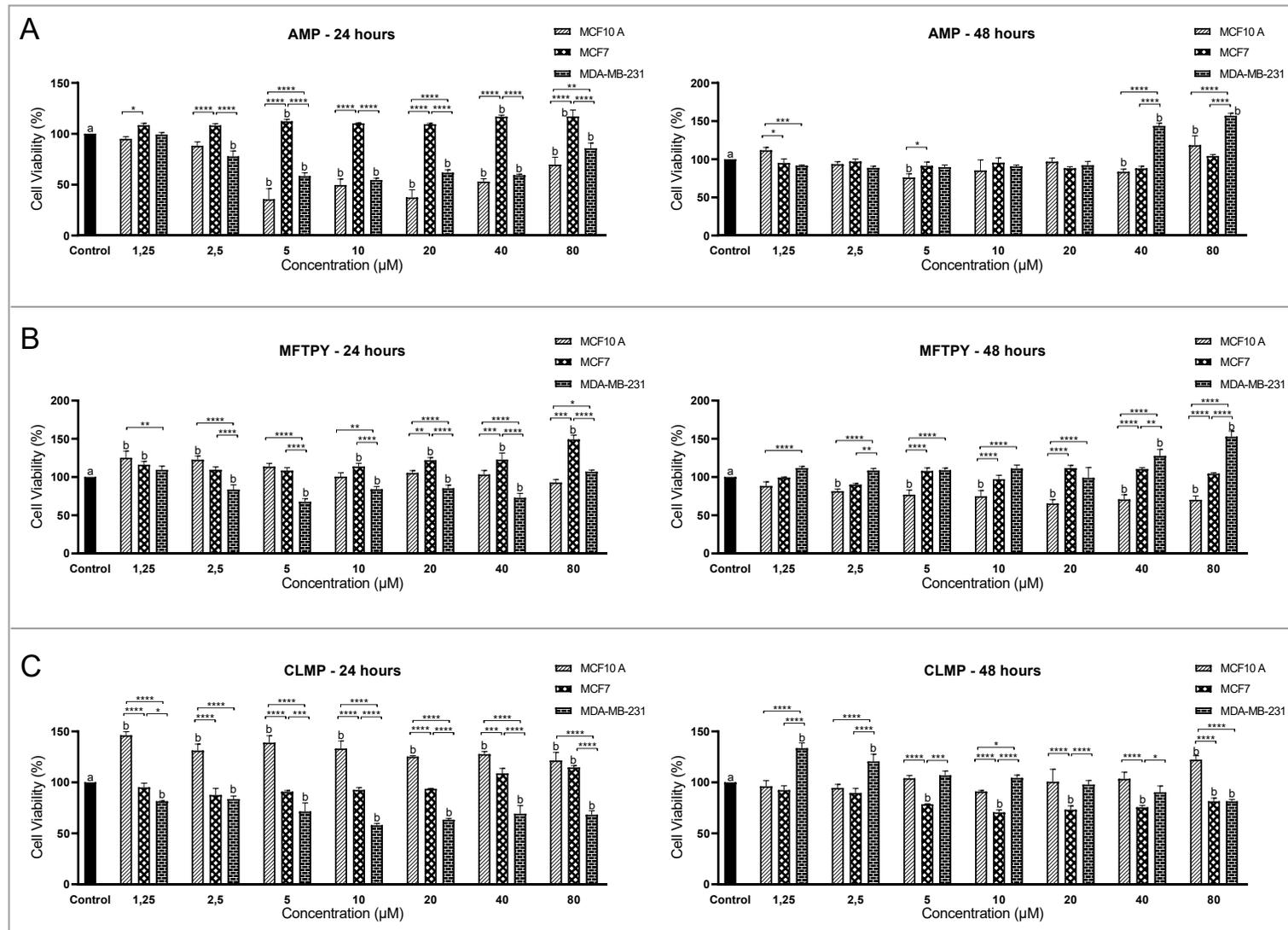
valores de IC_{50} foram de 3,451 e 4,893 μM para os tratamentos em 24 e 48 horas, respectivamente.

Figura 15. Viabilidade celular relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-10A (não tumorigênica) após tratamento com composto metálico de cobre (II) Lu59. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. IS: índice de seletividade.



Os compostos Lu58 e Lu59, além do metal cobre, também apresentam ligantes em sua estrutura, sendo AMP e MFTPY para Lu58, e CLMP e MFTPY para o composto Lu59. Neste sentido, sua atividade isolada também foi avaliada (Figura 16). Em relação a linhagem luminal, o ligante AMP (Figura 16A) não foi capaz de afetar sua viabilidade, que se manteve estável nos dois tempos de tratamento. Já MDA-MB-231, bem como a linhagem não tumoral MCF-10A, tiveram sua viabilidade inibida no menor tempo de tratamento. No entanto, observa-se a recuperação da viabilidade em 48 horas. Para MFTPY (Figura 16B), nos dois tempos de tratamento, apenas a linhagem triplo-negativa teve sua viabilidade levemente afetada. Já CLMP (Figura 16C) induziu significativamente a proliferação da linhagem não tumoral, principalmente em 24 horas. Para as linhagens tumorais o mesmo não foi observado, ocorrendo leve diminuição de sua viabilidade, tanto em 24 como em 48 horas.

Figura 16. Viabilidade relativa (%) das linhagens de Câncer de Mama MCF7 (luminal), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-10A (não tumorigênica) após tratamento com ligantes. Em (A) tratamento com ligante AMP, em (B) tratamento com ligante MFTPY e em (C) tratamento com ligante CLMP. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



5 DISCUSSÃO

Os índices epidemiológicos referentes ao CaM são alarmantes, com estimativas crescentes para novos casos e para óbitos pela doença (INCA, 2022). Dentre as tentativas de combate a esses tumores, os tratamentos quimioterápicos são os mais comuns, sendo amplamente utilizados na rotina clínica. Contudo, os efeitos colaterais associados e os mecanismos de resistência comprometem a sobrevivência das pacientes e contribuem para o aumento do número de óbitos associados à doença. Drogas inéditas são, portanto, necessárias e podem ser utilizadas como novo regime terapêutico e, principalmente, associadas a compostos já rotineiramente empregados. A bioinorgânica é uma área inovadora e essencial à oncologia. Compostos de cobre se destacam por serem derivados de um metal participante do metabolismo celular. Acredita-se que sejam menos tóxicos para as pacientes, atuando nas células tumorais via clivagem do DNA e geração de EROs. Neste estudo, foram testados dez complexos de cobre (II), todos inéditos e ainda não avaliados em células de CaM.

Na caracterização de possíveis protótipos voltados para a quimioterapia, o primeiro passo é avaliar a citotoxicidade dos compostos, para que, então, os experimentos posteriores sejam direcionados. No presente estudo foi empregado o ensaio com Alamar Blue em modelos celulares de CaM representativo de diferentes subtipos moleculares. Trata-se de um experimento colorimétrico e quantitativo, amplamente utilizado na comunidade científica (BONNIERT *et al.*, 2015; BENETTI *et al.*, 2019; SILVA, 2019; SILVA, A. L. G, 2020; UZUNOGLU *et al.*, 2010; MALHÃO *et al.*, 2019) e, portanto, contextualizado com a prática científica da área.

Linhas de células mamárias tumorais e não tumorais vem sendo cultivadas *in vitro* visando caracterizar novos tratamentos mais eficazes e menos agressivos. Dentre elas se enquadram as células tumorigênicas MDA-MB-231 e MCF7, de rápido crescimento, caráter agressivo e com grande capacidade de gerar metástases, derivadas de tumores chamados adenocarcinomas (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC, 2022). A utilização de diferentes tipos celulares, representativos de subtipos moleculares distintos, permite mimetizar o comportamento de vários tumores ao tratamento proposto. Este estudo, portanto, é inovador ao determinar a atividade biológica de compostos de cobre inéditos, oferecendo novas possíveis ferramentas para o tratamento do CaM conforme sua complexidade molecular.

A quimioterapia consiste na utilização de compostos químicos com o intuito de destruir ou controlar o crescimento das células neoplásicas, sendo um dos principais tratamentos utilizados no combate ao câncer (INCA, 2022). Contudo, essa estratégia enfrenta as limitações decorrentes da adaptabilidade e da resistência desenvolvidas pelas células tumorais. Mutações em genes chaves são associadas a este fenótipo e as células, mesmo expostas ao medicamento, continuam a sua proliferação anormal. Além disso, mecanismos que limitam a quantidade do fármaco que entra nas células (influxo da droga), que aumentam o seu efluxo, ou ativa vias alternativas podem alterar a eficácia terapêutica (GABRIEL *et al.*, 2017; HOLOHAN *et al.*, 2013; ROCHA, 2015). Por fim, células normais também apresentam susceptibilidade, o que resulta em toxicidade sistêmica, com efeitos adversos (ONCOGUIA, 2022; ALI *et al.*, 2013; CHANG, 2019). Compostos químicos metálicos têm se destacado, com resultados promissores em diferentes tumores (GOUVEA *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2017; MARZANO, 2013; POPOLIN, 2021; MARZANO, 2009; SILVA D. E. S., 2020; POLLONI *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2017). Por ser um elemento de grande importância para a homeostase do organismo, estando presente em enzimas envolvidas na respiração celular, metabolismo do ferro, coagulação sanguínea, transduções de sinal, além da síntese do DNA e uma série de outros fatores, acredita-se que o cobre apresenta uma menor toxicidade para as células normais do organismo, um dos grandes motivos do seu alto uso e foco em diversas pesquisas na busca de novos antineoplásicos (KIM; NEVITT; THIELE, 2008).

As Casiopeins®, desenvolvidas por Serment-Guerrero e colaboradores (2011), são exemplos de candidatos antineoplásicos derivados do cobre (II) já em fase avançada de testes, incluindo ensaios clínicos com pacientes terminais com diversos tipos de câncer, dentre eles o de mama (SERMENT-GUERRERO *et al.*, 2011; POLLONI *et al.*, 2019). Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de ação desses compostos dentro das células, mas evidências recentes sustentam sua capacidade em induzir a morte celular por via apoptótica mediada por EROS (SERMENT-GUERRERO *et al.*, BECCO *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2020). Os compostos descritos por Fan *et al.* (2017) também apresentaram significativa inibição do crescimento das linhagens tumorais mamárias, sendo seus melhores resultados demonstrados nas células TN MDA-MB-231 e BT-20, conhecidas por sua alta complexidade e difícil tratamento, graças à ausência de receptores hormonais. Assim como estes, os complexos de cobre de Low e colaboradores (2015) também exibiram atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais mamárias, sendo seus valores de IC₅₀ para as células MDA-MB-231 e MCF7 inferiores ao apresentado pelo tamoxifeno (> 10 µM). Por último, o composto Cu (SBCM) também sintetizado por Low e seus colaboradores e apresentado por Foo *et al.* (2018) induziu a parada

do ciclo celular, levando a linhagem MDA-MB-231 à apoptose, possivelmente por meio da regulação negativa da proteína P53. Cu (SBCM) também apresentou uma menor toxicidade para as células normais e, portanto, expressiva seletividade. Todos os compostos aqui testados, assim como os supracitados, possuem o cobre como centro metálico com diferença estrutural e molecular de seus ligantes.

Para os compostos de Lu50 a Lu57 observou-se que, após 48 horas de tratamento, houve uma retomada na proliferação das células MDA-MB-231 sugerindo a ativação de possíveis mecanismos de reparo pelas células TNs. Sugerimos que reparos nas possíveis lesões causadas pelo cobre ao DNA podem ter ocorrido, dificultando a indução apoptótica. Além disso, a quantidade da droga capaz de entrar nas células é variável e necessita ser avaliada. Ainda, os compostos podem ter sido inativados e, portanto, se mostrarem ineficazes, o que já foi demonstrado previamente por outros autores (HOLOHAN *et al.*, 2013; ROCHA, 2015). Neste sentido, novos ligantes, portanto, podem conferir efeitos adicionais a estes complexos.

De modo geral observa-se que os compostos de cobre contendo apenas ligante iminopiridinícos (Lu50 a Lu54) são pouco ativos ou inativos, ao passo que aqueles contendo um ligante iminopridiníco e uma molécula de terpiridina, especificamente a metil-fenil-terpiridina, podem ser inativos ou ativos ($IC_{50} < 30 \mu M$). O efeito biológico deve ser atribuído também ao contra-íon PF_6^- ou NO_3^- , em que os compostos com nitrato são mais solúveis e sua precipitação no meio de cultura é bastante improvável. Assim, os compostos L55 e Lu56 foram pouco ativos e os complexos análogos Lu58 e Lu59 foram ativos. Neste sentido, ressalta-se que a presença de um substituinte cloro no ligante iminopridiníco aumenta a potência de Lu59. Outro aspecto a ser destacado é a presença de um ligante terpiridina, o qual melhora a interação com o DNA, possível mecanismo responsável pelos efeitos desencadeados por esses complexos.

Nossos dados estão em consonância com os apresentados por Grau e seus colaboradores (2020) que confirmaram uma melhor interação da terpiridina com a molécula de DNA. Esses autores demonstraram que os complexos de cobre com o ligante atuam como catalisadores de oxidação, sendo também eficientes na clivagem do DNA. Além disso, é relatada dependência em relação ao tempo de administração para as propriedades citotóxicas dos compostos, assim como observados para Lu59 nas linhagens tumorais mamárias aqui avaliadas. Salimi *et al.* (2015) também evidenciaram que um de seus compostos com cobre associado a terpiridina possui significativo efeito contra linhagens tumorais mamárias, sendo encontrado valor de $IC_{50}=4,57 \mu M$ no tratamento de 24 horas com a linhagem luminal MCF7.

Outros estudos (RAJALAKSHMI *et al.*, 2012; MENDO *et al.*, 2015) também confirmam a promissora atividade antiproliferativa que a associação entre cobre e terpiridina apresenta frente a linhagens tumorais.

Considerando o objetivo de caracterizar novos compostos com fins antineoplásicos, comparações com linhagem não tumoral também são necessárias. Neste sentido, o composto Lu59, bem como Lu58, também foram testados em linhagem MCF-10A. Apesar do alto potencial frente as linhagens de CaM, os compostos exibiram alta toxicidade para a linhagem não tumoral, com inibição da viabilidade celular mesmo em baixas concentrações. Assim, novas estratégias devem ser adotadas para aumentar a seletividade desses compostos, incluindo o desenvolvimento de nanoformulações.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos citotóxicos dos complexos de cobre (II) Lu50 a Lu59, frente às células tumorais mamárias MCF7 e MDA-MB-231, em 24 e 48 horas. Os complexos metálicos Lu50 a Lu57 não se mostraram ativos contra as linhagens testadas e, para estes, em todas as concentrações, não foi possível calcular o IC₅₀. Por sua vez, Lu58 e Lu59 apresentaram efeitos significativos contra os modelos celulares. Ambos os compostos, em 24 horas, apresentaram efeito citotóxico frente a linhagem MDA-MB-231 de forma dependente da concentração utilizada, com IC₅₀ de 25,09 µM e 24,21 µM para Lu58 e Lu59, respectivamente. Para MDA-MB-231, e após 48 horas, o IC₅₀ foi 21,66 µM quando tratadas com Lu58 e 22,53 µM quando tratadas com Lu59. A MCF7 foi mais sensível a Lu59 com IC₅₀=64,75 µM após 24 horas e IC₅₀=3,77 µM após 48 horas. Devido a promissora atividade contra linhagens tumorais, Lu58 e Lu59 também foram avaliados em linhagem não tumoral MCF-10A. No entanto, ambos os compostos não se mostraram seletivos, afetando consideravelmente a viabilidade celular. Ainda que os complexos propostos não tenham se mostrado promissores, suas estruturas são passíveis de modificação. Novas formulações, com diferentes combinações de ligantes podem ser criadas, de modo a tentar contornar a ausência de seletividade. O presente estudo encontra-se em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, em especial ODS03 e ODS10.

REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 15 abr. 1994. DOI: 10.1016/0022-1759(94)90396-4.

ALAJMI, M. F. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Benzimidazole-Derived Biocompatible Copper(II) and Zinc(II) Complexes as Anticancer Chemotherapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. E1492, 2018. DOI: 10.3390/ijms19051492.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALEX, A.; BHANDARY, E.; MCGUIRE, K. P. Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1252, p. 3–7, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-41596-9_1.

ALI, I. et al. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 296–306, 2013. DOI: 10.2174/1871520611313020016.

American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. Disponível em: <<https://www.cancer.org/>>. Acesso em: 3 jun. 2022.

ARSLAN, C.; DIZDAR, O.; ALTUNDAG, K. Pharmacotherapy of triple-negative breast cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 13, p. 2081–2093, 2009. DOI: 10.1517/14656560903117309.

ATCC: The Global Bioresource Center. Disponível em: <<https://www.atcc.org/>>. Acesso em: 19 dez. 2022.

BARONZIO, G. et al. A Brief Overview of Hyperthermia in Cancer Treatment. **J integr Oncol**, v. 3, p. 115–125, 2014. DOI: 10.4172/2329-6771.1000115.

BECCO, L. et al. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 109, p. 49–56, abr. 2012. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010.

- BENETTI, F. et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. **Brazilian Oral Research**, v. 33, 16 maio 2019. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0042.
- BIRNBAUM, D. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 2, p. 249–258, 2004.
- BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 29, n. 1, p. 124–131, fev. 2015. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.09.014.
- BRACE, C. L.; HINSHAW, J. L.; LUBNER, M. G. Thermal Ablation for the Treatment of Abdominal Tumors. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, p. 2596, 2011. DOI: 10.3791/2596.
- BRIEGER, K. et al. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. w13659, 2012. DOI: 10.4414/smw.2012.13659.
- BRITO, C.; PORTELA, M. C.; VASCONCELLOS, M. T. L. DE. Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 284–295, 2014. DOI: 10.1590/s0034-8910.2014048004799.
- BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com. Ciências Saúde**, p. 14, 2011.
- CARMO, P. O.; LEITE, I. C. G.; GUERRA, M. R. Sobrevida de mulheres com câncer de mama subtipo luminal assistidas em Juiz de Fora, MG. **Rev Bras Mastologia**, v. 26, n. 3, 2016. DOI: 10.5327/Z201600030007RBM.
- CHANG, L. et al. Breast cancer treatment and its effects on aging. **Journal of geriatric oncology**, v. 10, n. 2, p. 346–355, mar. 2019. DOI: doi: 10.1016/j.jgo.2018.07.010.
- CHEANG, M. 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, 2009. DOI: 10.1093/jnci/djp082.
- CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Feminina**, v. 39, n. 10, 2011.

COELHO, A. S. et al. Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 1, 2018. DOI: 10.21877/2448-3877.201800615.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. **The Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1389–1399, 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06524-2.

CORTINA, C. S. et al. Post-Mastectomy Breast Reconstruction in Women Age 70 and Older: An Analysis of the National Cancer Database (NCDB). **Surgery**, v. 170, n. 1, p. 30–38, jul. 2021. DOI: 10.1016/j.surg.2021.03.033.

CSERNI, G. et al. The new TNM-based staging of breast cancer. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 472, n. 5, p. 697–703, 2018. DOI: 10.1007/s00428-018-2301-9.

CURY, S. E. V. **Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em carcinomas epidermóides de assoalho bucal**. 2008. 70 f. Tese (Pós Graduação em Odontologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. DOI: 10.11606/T.23.2008.tde-09042009-122159.

DANTAS, É. L. R. et al. Genética do câncer hereditário. **Rev. bras. cancerol**, p. 263–269, 2009. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2009v55n3.1619.

DE SOUZA, D. P. ET AL. A importância da radioterapia no tratamento do câncer de mama. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 1, 2019.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1103–1124, 2016. DOI: 10.1007/s00280-016-2976-z.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005.

FAN, L. et al. Salicylate •Phenanthroline copper (II) complex induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 29823–29832, 13 mar. 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.16161.

FOO, J. B. et al. Copper complex derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetylcoumarin induced apoptosis in breast cancer cell. **Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 31, n. 4, p. 505–515, 2018. DOI: 10.1007/s10534-018-0096-4.

FREITAS, A. M. S. DE et al. Perfil imuno-histoquímico de carcinomas mamários invasores em homens. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, p. 375–380, 2008. DOI: 10.1590/S1676-24442008000500010.

GABRIEL, G. et al. Quimioterapia, hormonioterapia e novas alternativas de tratamento do adenocarcinoma mamário. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 26, p. 583–608, 2017. DOI: 10.18677/EnciBio_2017B56.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.

GIULIANO, A. E. et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 4, p. 290–303, 2017. DOI: 10.3322/caac.21393.

GOLEIJ, Z. et al. Breast cancer targeted/ therapeutic with double and triple fusion Immunotoxins. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 200, p. 105651, 2020. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105651.

GOUVEA, L. R. et al. Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 67–73, 2012. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.07.004.

GRAU, J. et al. Time-Dependent Cytotoxic Properties of Terpyridine-Based Copper Complexes. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 21, n. 16, p. 2348–2355, 17 ago. 2020. DOI: 10.1002/cbic.202000154.

GUEDES, J. B. R. et al. Fatores associados à adesão e à persistência na hormonioterapia em mulheres com câncer de mama. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 636–649, 2017. DOI: 10.1590/1980-5497201700040007.

HECHT, F. et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 4, p. 4281–4291, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-4873-9.

HNISZ, D. et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. **Science**, v. 351, n. 6280, p. 1454–1458, 2016. DOI: 10.1126/science.aad9024.

HOLANDA, A. A. R. DE et al. Ultrasound findings of the physiological changes and most common breast diseases during pregnancy and lactation. **Radiologia Brasileira**, v. 49, n. 6, p. 389–396, 2016. DOI: 10.1590/0100-3984.2015.0076.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013. DOI: 10.1038/nrc3599.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 3 jun. 2022.

JAFARI, S. H. et al. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 7, p. 5200–5213, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26379.

JESINGER, R. A. Breast anatomy for the interventionalist. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, v. 17, n. 1, p. 3–9, mar. 2014. DOI: 10.1053/j.tvir.2013.12.002.

JORDAN, P.; CARMO-FONSECA, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 57, n. 8–9, p. 1229–1235, 2000. DOI: 10.1007/pl00000762.

KAIDAR-PERSON, O.; OLDENBORG, S.; POORTMANS, P. Re-irradiation and Hyperthermia in Breast Cancer. **Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))**, v. 30, n. 2, p. 73–84, 2018. DOI: 10.1016/j.clon.2017.11.004.

KIM, B.-E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 3, p. 176–185, mar. 2008. DOI: 10.1038/nchembio.72.

KING, M.-C. et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. **Science**, v. 302, n. 5645, p. 643–646, 2003. DOI: 10.1126/science.1088759.

KLEIBL, Z.; KRISTENSEN, V. N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. **Breast**, v. 28, p. 136–144, 2016. DOI: 10.1016/j.breast.2016.05.006.

LACEY, J. V. et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC cancer**, v. 9, p. 84, 2009. DOI: 10.1186/1471-2407-9-84.

LOPES, J. C. et al. In vitro and in vivo antitumoral activity of a ternary copper (II) complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 4, p. 1021–1026, 17 dez. 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.104.

LOW, M. L. et al. Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Zn(II) and Re(I) complexes derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetylcoumarin. **Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 28, n. 3, p. 553–566, 2015. DOI: 10.1007/s10534-015-9831-2.

MACCHETTI, A. H. Estadiamento do Câncer de Mama Diagnosticado no Sistema Público de Saúde de São Carlos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 40, n. 3, p. 394–402, 2007. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v40i3p394-402.

MAIA, P. I. DA S. et al. Organometallic gold(III) complexes with hybrid SNS-donating thiosemicarbazone ligands: cytotoxicity and anti-Trypanosoma cruzi activity. **Dalton transactions**, v. 46, n. 8, p. 2559–2571, 2017. DOI: 10.1039/c6dt04307k.

MALHÃO, F. et al. Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Preussin, a Hydroxypyrrolidine Derivative from the Marine Sponge-Associated Fungus *Aspergillus candidus* KUFA 0062, in a Panel of Breast Cancer Cell Lines and Using 2D and 3D Cultures. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, p. 448, 30 jul. 2019. DOI: 10.3390/md17080448.

MARTA, G. N.; HIJAL, T.; DE ANDRADE CARVALHO, H. Reirradiation for locally recurrent breast cancer. **Breast**, v. 33, p. 159–165, 2017. DOI: 10.1016/j.breast.2017.03.008.

MARZANO, C. et al. Copper complexes as anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 185–211, fev. 2009. DOI: 10.2174/187152009787313837.

MARZANO, I. M. Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral e antibacteriana de alguns complexos metálicos de bismuto (III) e gálio (III). 2013, 183 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MATOS, M. C. et al. Avaliação citotóxica in vitro do complexo metálico derivado do cobre II [Cu(BTACl)(phen)ClO₄] em TG180, Raw 264.7 (macrófago), Erlich e NIH-3T3 (fibroblasto). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 38, 2017.

MATSEN, C. B.; NEUMAYER, L. A. Breast cancer: a review for the general surgeon. **JAMA Surgery**, v. 148, n. 10, p. 971–979, 2013. DOI: 10.1001/jamasurg.2013.3393.

MAXIMIANO, S. et al. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, v. 30, n. 2, p. 75–86, 2016. DOI: 10.1007/s40259-016-0162-9.

MEADE, E.; DOWLING, M. Early breast cancer: Diagnosis, treatment and survivorship. **British journal of nursing**, v. 21, p. S4-7, 2012. DOI: 10.12968/bjon.2012.21.Sup17.S4.

MENDO, A. S. et al. Characterization of antiproliferative potential and biological targets of a copper compound containing 4'-phenyl terpyridine. **Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 935–948, 2015. DOI:10.1007/s00775-015-1277-z.

MENDONÇA, G. A. E S.; SILVA, A. M. DA; CAULA, W. M. Características tumorais e sobrevida de cinco anos em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 1232–1239, 2004. DOI: 10.1590/S0102-311X2004000500017.

MOREIRA, K. C.; SALES, W. T.; DOS SANTOS, E. M. Tumor filoides maligno com diferenciação para lipossarcoma pleomórfico na mama. **Rev Bras Mastologia**, v. 22, n. 2, p. 66-69, 2012.

National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em: <<https://ncats.nih.gov/>>. Acesso em: 4 jun. 2022.

NICOLINI, A.; FERRARI, P.; ROSSI, G. Mucins and Cytokeratins as Serum Tumor Markers in Breast Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 867, p. 197–225, 2015. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0_13.

NUNES, F. C.; DIAS, M. F.; TORGAL, I. Phyllodes tumor of the breast: retrospective analysis of 28 cases. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 8, n. 1, p. 5, 2014.

O Portal do paciente com câncer - Instituto Oncoguia. Disponível em:
<<http://www.oncoguia.org.br/>>. Acesso em: 3 jun. 2022.

OLIVEIRA, L. P. DE. Síntese, caracterização, atividade citotóxica e antimicobacteriana de complexos metálicos com fluoroquinolonas. 2018, 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

PAIXÃO, D. A. et al. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 138–146, jul. 2017. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024.

PANER, G. P. et al. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. **European Urology**, v. 73, n. 4, p. 560–569, 2018. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.12.018.

PAOLUCCI, T. et al. The sequelae of mastectomy and quadrantectomy with respect to the reaching movement in breast cancer survivors: evidence for an integrated rehabilitation protocol during oncological care. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 29, n. 2, p. 899–908, fev. 2021. DOI: 10.1007/s00520-020-05567-x.

POLLONI, L. et al. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 112, p. 108586, abr. 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.047.

POPOLIN, C. P. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de novos complexos de rutênio contendo ácido salicílico e derivados. 2021, 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal De São Carlos, São Carlos, 2021.

RAJALAKSHMI, S. et al. Copper(II) complexes of terpyridine derivatives: a footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 48–59, dez. 2012. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.08.010.

REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. N. J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108–118, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x.

RIBEIRO, M. DE S. F. et al. Hormonioterapia oral no câncer de mama: fatores que podem influenciar a adesão. **JMPHC | Journal of Management & Primary Health Care | ISSN 2179-6750**, v. 8, n. 1, p. 16–26, 2017. DOI: 10.14295/jmphc.v8i1.277.

ROCHA, C. R. R. Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais. 2015, 45 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ROLIM, L. M. DE O.; MARTINS, A. L. Aleitamento materno. **Revista de pediatria SOPERJ**, v. 3, n. 1, 2002.

SALIMI, M. et al. Antiproliferative effects of copper(II)-polypyridyl complexes in breast cancer cells through inducing apoptosis. **Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 28, n. 2, p. 267–278, abr. 2015. DOI: 10.1007/s10534-015-9820-5.

SANTANA, N. P. P.; BORGES, A. R. Exames de imagem no rastreamento e diagnóstico do câncer de mama: ressonância magnética das mamas em face da mamografia. **Psicologia e Saúde em debate**, v. 1, n. 1, p. 19–38, 2015. DOI: 10.22289/2446-922X.V1N1A3.

SAWADA, N. O.; DIAS, A. M.; ZAGO, M. M. F. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 323–329, 2006. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2006v52n4.1845.

SCHMID, P. et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2108–2121, 2018. DOI: 10.1056/NEJMoa1809615.

SCHMITT, A. **Modelagem matemática do crescimento tumoral e sua relação com sistema imunológico**. 2009. 129 f. Dissertação (Pós Graduação em Modelagem Matemática) - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2009.

SERMENT-GUERRERO, J. et al. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 25, n. 7, p. 1376–1384, out. 2011. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.05.008.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, p. 575–580, 2014. DOI: 10.1590/SO100-720320140005158.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265–7279, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206933.

SILVA, A. L. G. Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e de ovário. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília; Brasília, 2020.

SILVA, D. E. S. Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer de mama triplo negativo. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2020.

SILVA, J. E. F. Efeitos da associação de estratégias de interferência de microRNAs na indução de apoptose mediada por citrato de ródio livre e associado à nanopartículas de maghemita em cultura de células de carcinoma mamário humano. 2019, 71 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília; Brasília, 2019.

SILVA, P. P. et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414–6424, 2011. DOI: 10.1021/ic101791r.

SKOOG D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning; 2014.

SLADE, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes & Development**, v. 34, n. 5–6, p. 360–394, 2020. DOI: 10.1101/gad.334516.119.

TAN, M. et al. Synthesis, Cytotoxic Activity, and DNA Binding Properties of Copper (II) Complexes with Hesperetin, Naringenin, and Apigenin. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2009, p. 347872, 2009. DOI: 10.1155/2009/347872.

TESHOME, M. Role of Operative Management in Stage IV Breast Cancer. **The Surgical Clinics of North America**, v. 98, n. 4, p. 859–868, 2018. DOI: 10.1016/j.suc.2018.03.012.

TURK, A. A.; WISINSKI, K. B. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. **Cancer**, v. 124, n. 12, p. 2498–2506, 2018. DOI: 10.1002/cncr.31307.

ULLAH, M. F. et al. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 4, p. 553–559, 2011. DOI: 10.1002/mnfr.201000329.

UZUNOGLU, S. et al. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (-/- gossypol). **Toxicology**

Mechanisms and Methods, v. 20, n. 8, p. 482–486, out. 2010. DOI: 10.3109/15376516.2010.508080.

VENKITARAMAN, R. Triple-negative/basal-like breast cancer: clinical, pathologic and molecular features. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 10, n. 2, p. 199–207, 2010. DOI: 10.1586/era.09.189.

WANG, Y.; LUO, W.; WANG, Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. **DNA repair**, v. 81, p. 102651, 2019. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102651.

World Health Organization - WHO. Disponível em: <<https://www.who.int>>. Acesso em: 3 jun. 2022.

ZANETTI, J. S.; OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Câncer de mama: de perfis moleculares a células tronco. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, p. 277–292, 2011. DOI:10.5892/RUVRV.91.277292.