

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

ANA LIGIA UBALDINO

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E DAS VIAS
ONCOGÊNICAS MODULADAS POR NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE DOS
BENZOTIAZÓIS EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

PATOS DE MINAS – MG
JULHO DE 2026

ANA LIGIA UBALDINO

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E DAS VIAS
ONCOGÊNICAS MODULADAS POR NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE DOS
BENZOTIAZÓIS EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves
de Araújo**

Coorientador: Dr. Raoni Pais Siqueira

PATOS DE MINAS – MG

JULHO 2026

ANA LIGIA UBALDINO

Caracterização das atividades biológicas e das vias oncogênicas moduladas por novos compostos da classe dos benzotiazóis 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

MSc. Gislaine Gonçalves Rocha - Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza - Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Patos de Minas, 22 de julho de 2026

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho representa o encerramento de uma etapa importante e muito feliz de minha vida, marcada por desafios, aprendizados e pelo crescimento pessoal e profissional. Por isso, gostaria de expressar minha gratidão a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este momento fosse possível.

Primeiramente, agradeço a Deus e ao meus pais, pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão durante todos os momentos dessa caminhada. Obrigada por acreditarem em mim, por todo amor, por me incentivarem a seguir meus sonhos e por me darem forças para continuar mesmo diante das dificuldades. Como uma dedicatória de um livro que representa aquilo que vocês significam para mim: “À minha mãe, que me ensinou a sonhar, e ao meu pai, que me ajudou a realizar meus sonhos.” Estendo meus agradecimentos a toda a minha família, em especial à minha avó Célia, por estar presente em cada etapa dessa caminhada, oferecendo apoio, carinho e incentivo. Agradeço por nunca ter hesitado em me ajudar a alcançar meus objetivos e por sempre acreditar em mim.

Agradeço imensamente à minha orientadora Dr^a Thaise, pela dedicação, paciência, confiança logo no primeiro ano de faculdade, e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação foi essencial para minha formação científica e para a construção deste projeto. Ao coorientador Dr. Raoni, por todo cuidado e atenção durante todos aqueles meses no laboratório e por ensinar e estar presente a cada etapa do caminho.

Agradeço também a todos os integrantes do laboratório e aos colegas, em especial André e Gislaine que fizeram parte dessa trajetória, pela colaboração, pelos momentos de aprendizado, pelas discussões científicas e pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Agradeço às minhas colegas de sala e melhores amigas, Cristal, Júlia e Gabriela, por terem caminhado ao meu lado durante essa trajetória, sempre oferecendo apoio, incentivo e acolhimento nos momentos mais desafiadores. A presença de vocês tornou essa jornada mais leve e especial, e sou grata por todas as experiências e momentos compartilhados.

Dedico um agradecimento ainda mais especial à minha parceira de laboratório e de vida, Cristal. Sem você, esses anos certamente não teriam sido os mesmos. Obrigada por toda a ajuda e por estar presente tanto nos momentos de trabalho no laboratório quanto nos momentos em que precisei de apoio fora dele. Obrigada por me ouvir, me incentivar e tornar essa caminhada muito mais significativa.

À Universidade Federal de Uberlândia, Capes, CNPq, Fapemig, e FINEP, pelo apoio financeiro e a todos os professores que contribuíram para minha formação, deixo meu reconhecimento e gratidão pelos conhecimentos transmitidos e pelas oportunidades proporcionadas ao longo da graduação.

Agradeço a todos meus amigos, que estiveram presentes durante essa jornada, tornando essa fase muito especial.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada ensinamento, palavra de incentivo e gesto de apoio teve importância para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada.

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente em mulheres no mundo, sendo o subtipo molecular triplo-negativo o mais agressivo e desafiador. O câncer de mama triplo-negativo não expressa receptores hormonais nem o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, o que restringe as opções terapêuticas à quimioterapia e à radioterapia. Contudo, a eficácia desses tratamentos é limitada, evidenciando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, compostos derivados do benzotiazol têm despertado crescente interesse devido às suas múltiplas propriedades biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios. Este estudo objetivou avaliar o potencial de oito compostos dessa classe no controle de células de câncer de mama. As linhagens celulares não tumorais HFF (fibroblasto) e MCF-10-A (mama) e as tumorais MCF-7 (câncer de mama luminal) e MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) foram cultivadas e tratadas com os oito compostos em diferentes concentrações. Inicialmente, foi realizado o ensaio de citotoxicidade por MTT como estratégia de triagem para selecionar o composto com maior potencial antitumoral. A partir dos resultados obtidos, o composto 3 destacou-se por apresentar maior atividade citotóxica, com $IC_{50} = 19,34 \mu M$ após 48 horas de tratamento das células MDA-MB-231, além de significativa seletividade ($IS > 2$). Com base nesses resultados, os experimentos subsequentes de clonogenicidade, migração horizontal e expressão gênica por qPCR foram conduzidos utilizando as concentrações de $9,67 \mu M$ ($IC_{50}/2$) e $4,84 \mu M$ ($IC_{50}/4$) por 48 horas. O tratamento promoveu inibição da clonogenicidade e da migração celular. Por fim, os ensaios de qPCR revelaram alterações na expressão dos transcritos de $IL1\beta$, $TGF\beta$ e $CDH1$, evidenciando o potencial do composto 3 em interferir em processos relacionados à transição epitélio-mesenquimal. Os resultados demonstram o potencial dos derivados de benzotiazol no tratamento oncológico, com destaque para o composto 3 como um candidato promissor para o controle do câncer de mama triplo-negativo, embora estudos adicionais sejam necessários para elucidar seus mecanismos de ação e validar sua eficácia em modelos pré-clínicos.

Palavras-chave: Benzotiazol. Câncer de mama triplo-negativo. Citotoxicidade. Expressão gênica.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy among women worldwide, with triple-negative breast cancer representing the most aggressive and therapeutically challenging molecular subtype. TNBC lacks the expression of hormone receptors and human epidermal growth factor receptor 2, limiting treatment options primarily to chemotherapy and radiotherapy. However, the effectiveness of these therapies remains limited, highlighting the need for the development of new therapeutic strategies. In this context, benzothiazole derivatives have attracted increasing interest due to their diverse biological properties, including anti-inflammatory activity. This study aimed to evaluate the potential of eight benzothiazole-derived compounds to control breast cancer cells. The non-tumor cell lines HFF (fibroblasts) and MCF-10A (mammary epithelial cells), as well as the tumor cell lines MCF-7 (luminal breast cancer) and MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), were cultured and treated with the eight compounds at different concentrations. Initially, an MTT assay was performed as a screening strategy to identify the compound with the greatest antitumor potential. Based on the results, compound 3 exhibited the highest cytotoxic activity, with an IC₅₀ of 19.34 μ M after 48 h of treatment of MDA-MB-231 cells, in addition to significant selectivity (SI > 2). Therefore, subsequent clonogenic, wound healing, and quantitative PCR (qPCR) assays were performed exclusively with compound 3 at concentrations of 9.67 μ M (IC₅₀/2) and 4.84 μ M (IC₅₀/4) for 48 h. Treatment with compound 3 inhibited clonogenicity and cell migration. Furthermore, qPCR analysis revealed changes in the expression of IL1 β , TGF β , and CDH1, indicating the potential of compound 3 to interfere with processes associated with epithelial-mesenchymal transition. These findings demonstrate the potential of benzothiazole derivatives as anticancer agents, particularly compound 3 as a promising candidate for the treatment of triple-negative breast cancer. Nevertheless, further studies are required to elucidate its mechanisms of action and validate its efficacy in preclinical models.

Keywords: *Benzothiazole. Triple-negative breast cancer. Cytotoxicity. Gene expression.*

LISTA DE ABREVIACÕES

AJCC- *American Joint Committee on Cancer*
ATCC- *American Type Culture Collection*
B2M - Beta-2-microglobulina
BRCA1- *Breast Cancer Gene 1*
BRCA2- *Breast Cancer Gene 2*
CDH1- Caderina 1 (E-caderina)
CM- Câncer de mama
CMTN- Câncer de mama triplo-negativo
cDNA- DNA complementar
DMSO- Dimetilsulfóxido
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF- *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)
EMT- Transição epitélio-mesenquimal
ER- *Estrogen Receptor* (Receptor de estrogênio)
HER2- *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*
IARC- *International Agency for Research on Cancer*
IC₅₀- Concentração inibitória média
Ki67- Índice de proliferação celular
IL1 β - Interleucina 1 beta
IL4- Interleucina 4
IL6- Interleucina 6
IS- Índice de seletividade
KRT18- Queratina 18
mRNA- RNA mensageiro
MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PARP- *Poly (ADP-ribose) Polymerase*
PBS- *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato-salino)
PCR- *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PD-L1- *Programmed Death-Ligand 1*
qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa
RE- Receptor de estrogênio
RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*

RP- Receptor de progesterona

SFB- Soro fetal bovino

TBE- Tris-Borato-EDTA

TGF β 1- Fator de Crescimento Transformador beta 1

TILs- *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (Linfócitos infiltrantes de tumor)

TNM- Tumor, Node, Metastasis

VIM - Vimentina

WHO- *World Health Organization*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da morfologia e histologia da mama.....	14
Figura 2 – Principais subtipos moleculares do câncer de mama e percentual de ocorrência.....	18
Figura 3 – Estrutura molecular do benzotiazol.....	22
Figura 4- Estrutura dos 8 compostos testados.....	24
Figura 5 – Efeito dos compostos derivados de benzotiazol 1–8 sobre a viabilidade da linhagem MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento.....	30
Figura 6 – Curvas dose-resposta de diferentes linhagens celulares tratadas com composto 3 por 48 horas.....	31
Figura 7 – Inibição da clonogenicidade induzida pelo composto 3 em células MDA-MB-231.....	32
Figura 8 – Ensaio de migração celular (wound healing) em células MDA-MB-231 tratadas com composto 3.....	33
Figura 9 – Avaliação da expressão gênica por qPCR em células MDA-MB-231 tratadas com o composto 3.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Aspectos gerais do câncer.....	11
1.2	Câncer de Mama.....	13
1.3	Compostos derivados de benzotiazol	22
2	OBJETIVO GERAL	23
2.1	Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Compostos	24
3.2	Linhagens e cultivo celular.....	25
3.3	Citotoxicidade por MTT.....	25
3.4	Ensaio Clonogênico.....	26
3.5	Ensaio <i>Wound healing</i>	27
3.6	Ensaio qPCR.....	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Seleção de compostos em células de CMTN	29
4.2	Inibição da clonogenicidade	31
4.3	Inibição da migração horizontal	32
4.4	Modulação de diferentes transcritos	33
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Trata-se de uma doença complexa que pode afetar diferentes tecidos e decorre da proliferação descontrolada de células transformadas com capacidade invasiva. A compreensão das alterações moleculares dessa doença tem evoluído consideravelmente, graças aos avanços na tecnologia de sequenciamento genético e na análise de grandes conjuntos de dados biológicos. A identificação de mutações em genes específicos, como os oncogenes e os genes supressores de tumor, tem sido fundamental para determinar a origem e a progressão dessa doença. As vias de sinalização celular responsáveis pelo controle de processos como crescimento, proliferação, apoptose, invasão, migração e senescência encontram-se alteradas e são extensivamente descritas na literatura (Mostafa, *et al.*, 2021).

Ademais, a interação entre as células tumorais e seu microambiente vem sendo estudada, de modo que diferentes sinais possam afetar o ambiente ao redor da lesão, promovendo a angiogênese e o escape do sistema imunológico (Wang, 2018). Finalmente, eventos epigenéticos, como a metilação do DNA e as modificações das histonas, também impactam diretamente o funcionamento celular e compõem alterações epigenéticas igualmente preponderantes nesse cenário (Wang, *et al.*, 2023).

Tumores malignos afetam gravemente pacientes e familiares de forma geral. Por essa razão, órgãos governamentais desempenham um papel crítico ao financiar pesquisas, implementar políticas de prevenção e controle, regulamentar o desenvolvimento de novas terapias e fornecer assistência financeira e médica aos pacientes. Agências como o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, e o National Cancer Institute (NCI), nos Estados Unidos, destacam-se por suas importantes iniciativas na área oncológica (Rowland, *et al.*, 2019). Esses órgãos colaboram entre si por meio do compartilhamento de conhecimentos e recursos, coordenando esforços globais para prevenir e tratar o câncer. Assim, contribuem para ampliar o acesso a tratamentos e cuidados de qualidade para os pacientes.

É válido ressaltar que, durante o tratamento de câncer, a família pode sofrer com problemas econômicos, psicológicos e/ou sociais. A perda de emprego e renda, efeitos

adversos persistentes e necessidade contínua de cuidados médicos são alguns exemplos. O estigma associado pode resultar em isolamento social e discriminação, sendo o estresse psicológico evidente, exigindo acompanhamento por profissionais (Salci; Marcon, 2011). Nesse contexto, os gastos em oncologia, especialmente para o Sistema Único de Saúde (SUS), são elevados. O tratamento de câncer envolve custos substanciais em rastreio, vigilância, exames diagnósticos, cirurgias, quimioterapia, radioterapia, medicamentos, controle de sintomas e acompanhamento pós-tratamento (ALZEHR, *et al.*, 2022). Esse quadro é ainda mais grave após a pandemia de COVID-19. Nesse período, houve a redução de consultas oncológicas, uma vez que os hospitais se dedicaram ao tratamento dos infectados (Ashbury, 2021). Diante do isolamento social, pacientes pararam de procurar atendimento, o que impactou nos dados epidemiológicos, com redução de cerca de 15.000 diagnósticos mensais de câncer em 2020 (Caminha, 2021). Portanto, o número de casos avançados aumentou substancialmente, piorando o prognóstico dos pacientes. Vale ressaltar que o vírus Sars-Cov2 afeta o sistema imunológico, sendo necessário redobrar o cuidado com os pacientes oncológicos (Ullah, *et al.*, 2023)

De acordo com o INCA, estima-se que o Brasil apresente aproximadamente 781 mil novos casos de câncer por ano no triênio de 2026 a 2028, considerando todos os tipos de neoplasias, incluindo o câncer de pele não melanoma. Quando excluídos esses casos, a estimativa corresponde a cerca de 518 mil novos pacientes anuais. Em relação à mortalidade, dados recentes indicam a ocorrência de aproximadamente 244 mil óbitos por câncer no país no ano de 2022. No que se refere à incidência, destacam-se o câncer de mama (CM) feminino e o câncer de próstata como os mais frequentes, seguidos pelo câncer colorretal, de pulmão, de estômago e do colo do útero (INCA, 2026).

Os fatores de risco para o câncer são diversos. Entre os fatores comportamentais destacam-se o tabagismo, de modo que a exposição a produtos químicos danifica o DNA (Hecht; Hatsukami, 2022). O consumo excessivo de álcool também é preocupante, sendo, inclusive, um desregulador hormonal. Uma dieta inadequada, especialmente quando é rica em alimentos processados, gorduras saturadas e açúcares, mas pobre em frutas, vegetais e fibras está associada ao desenvolvimento da doença. A falta de atividade física regular também impacta esse cenário, pois pode levar à obesidade, resistência à insulina e inflamação crônica. Além disso, a exposição a carcinógenos ambientais, como poluentes atmosféricos e radiação UV, também pode aumentar a chance de o indivíduo apresentar a doença. (Cruz, *et al.*, 2022).

1.2 Câncer de Mama

O CM é definido, de forma geral, como o crescimento descontrolado e anormal de células transformadas nos tecidos mamários. A glândula mamária (Figura 1), comumente conhecida como mama, desempenha um papel vital na amamentação, sendo composta por tecido glandular, tecido adiposo e uma rede complexa de ductos e vasos sanguíneos. O seu desenvolvimento tem início durante a embriogênese e, conforme genes específicos envolvidos na proliferação e diferenciação das células epiteliais são expressos, os ductos e os lóbulos são formados para uma futura produção e secreção de leite (Srivastava, *et al.*, 2020)

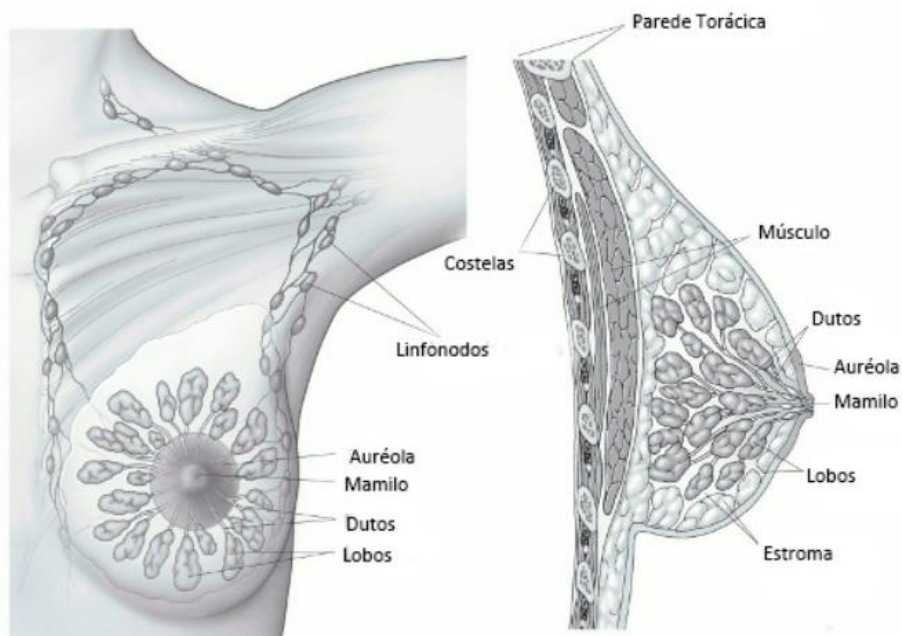
Os hormônios estrogênio, progesterona e prolactina estão associados à sua formação e funcionamento. O estrogênio estimula a ramificação dos ductos mamários, sendo responsável pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários femininos durante a puberdade, como o aumento das mamas, o alargamento dos quadris e o crescimento dos pelos pubianos e axilares. Ademais regula o ciclo menstrual, estimulando o revestimento uterino durante a primeira metade do ciclo, de modo a torná-lo receptivo para implantação de um óvulo fertilizado. Além disso, contribui para a manutenção da saúde óssea, regula os níveis de colesterol no sangue e mantém a saúde vaginal e urogenital, ajudando a prevenir problemas como a osteoporose e a incontinência urinária (Patel, *et al.*, 2018)

Por outro lado, a progesterona prepara os alvéolos para a produção de leite e o útero para a gravidez, sendo liberada durante a segunda metade do ciclo menstrual para a implantação do óvulo fertilizado. No caso de gravidez, a progesterona é o que mantém o revestimento uterino e fornece suporte ao embrião em crescimento, suprimindo o sistema imunológico materno para evitar a rejeição do feto. Já a prolactina está relacionada à amamentação, estimulando a produção de leite materno (Camilletti, *et al.*, 2019).

Os ductos e lóbulos mamários são compostos por células epiteliais especializadas, responsáveis pela produção e transporte de secreções glandulares. As células mioepiteliais, que envolvem os ácinos glandulares e os ductos, possuem uma função contrátil essencial, ajudando a expelir o conteúdo secretado, como o leite materno durante a lactação. Além dessa função primária, essas células desempenham um papel fundamental na sustentação e organização do órgão, contribuindo para a manutenção da integridade estrutural da mama. Elas interagem com a matriz extracelular e influenciam

o comportamento das células epiteliais, regulando processos como a proliferação, diferenciação e apoptose celulares (Balachander, *et al.*, 2015).

Figura 1 - Representação da morfologia e histologia da mama



Fonte: Instituto Oncoguia, 2024

A glândula mamária pode ser acometida por diferentes doenças, incluindo condições benignas e malignas. Entre as doenças benignas mais comuns estão os cistos mamários compostos por estruturas ovais que acumulam líquido, e o fibroadenoma, formado por tecido glandular e conjuntivo. Além disso, a mastite, uma inflamação da glândula frequentemente associada à amamentação, também pode ocorrer. Contudo, alterações malignas são as mais preocupantes (Barrón; Bermejo; Castro, 2023).

O CM é o mais comum entre as mulheres em todo o mundo, embora também possa ser detectado em homens, em menor frequência. Acomete ductos e lóbulos, permanecendo restrito ao órgão ou podendo atingir outras partes do corpo através do sistema linfático ou pela corrente sanguínea, em um processo conhecido como metástase (Macias, Hinck 2012). Segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC) e a World Health Organization (WHO), estima-se que aproximadamente 2,3 milhões de novos casos de CM tenham sido diagnosticados em todo o mundo em 2022, correspondendo a cerca de 11,6% dos casos em ambos os sexos, o que o posiciona como o segundo mais incidente globalmente. No que se refere à mortalidade, estimativas mais

recentes indicam que ocorreram cerca de 670 mil óbitos por CM no mesmo período, evidenciando a elevada carga da doença em escala mundial (IARC/OMS, 2024–2025)

Diversos fatores como sexo, idade, histórico familiar, mutações, ambiente e estilo de vida estão envolvidos no surgimento do CM. O sexo é um fator determinante, já que a doença é mais comum em mulheres devido à influência dos hormônios femininos. A idade também é relevante, pois o risco aumenta com o avanço dos anos, especialmente após os 50, uma vez que, com o tempo, as células passam por mais divisões e estão expostas a fatores ambientais danosos ao DNA. O histórico familiar é outro aspecto a ser considerado, pois indivíduos com parentes de primeiro grau diagnosticados com a doença apresentam maior predisposição, muitas vezes associada a mutações genéticas hereditárias, como nos genes *BRCA1* (do inglês, *Breast cancer gene 1*) e *BRCA2* (do inglês, *Breast cancer gene 2*). Estes são supressores tumorais, atuando no sistema de reparo a danos no DNA. Quando mutados há um acúmulo de mudanças genéticas herdáveis que podem impulsionar o surgimento de tumores (Trusler; Goodwin; Laslett, 2020). Nesse contexto, torna-se essencial compreender não apenas os aspectos biológicos do CM, mas também as estratégias de diagnóstico e estadiamento, fundamentais para a definição do prognóstico e da abordagem terapêutica.

1.2.1 Diagnóstico e estadiamento

A detecção precoce do CM é fundamental. De fato, as taxas de sobrevivência têm aumentado ao longo dos anos, graças aos avanços no diagnóstico e nas estratégias de tratamento (Wilkinson; Gathani, 2022). O diagnóstico envolve um conjunto diversificado de abordagens clínicas, tecnológicas e laboratoriais. A mamografia é a técnica mais utilizada, sendo prescrita para mulheres a partir dos 50 anos de idade, ou mais cedo, caso apresentem um alto risco de desenvolver a doença. Contudo, a confirmação acontece após a realização da biópsia do tecido e análise por patologistas (McDonald, *et al.* 2016).

Histologicamente, os tumores mais comuns são ductal invasivo e o lobular invasivo, ambos com características distintas. O câncer ductal invasivo é o mais frequente, representando cerca de 70-80% dos casos. Esses tumores originam-se nos ductos mamários, responsáveis pelo transporte do leite, e podem se espalhar para os tecidos próximos. Tendem a formar massas bem definidas, com células que invadem o estroma mamário. Já o câncer lobular invasivo tem origem nos lobos, responsáveis pela

produção do leite, e representa cerca de 10-15% dos casos. Esse tipo tende a crescer de forma mais difusa, com infiltração em várias direções, o que pode dificultar a detecção precoce, pois, em geral, não forma uma massa palpável. (Chamalidou, *et al.*, 2021)

Os patologistas também avaliam o grau histológico, determinando o quão diferentes as células cancerosas são das normais quando vistas em um microscópio. O sistema de graduação histológica de Nottingham, também conhecido como Elston-Ellis, é amplamente utilizado na avaliação de carcinomas mamários invasivos e baseia-se na análise de três parâmetros morfológicos: formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Cada um desses critérios recebe uma pontuação de 1 a 3, e a soma final (variando de 3 a 9 pontos) determina o grau histológico do tumor. (Elston; Ellis, 1991)

O grau I, correspondente a 3 a 5 pontos, é caracterizado por elevada formação tubular, baixo grau de pleomorfismo nuclear, com núcleos relativamente uniformes, e baixa atividade mitótica, refletindo um crescimento tumoral mais lento e melhor prognóstico. O grau II, com pontuação entre 6 e 7, apresenta características intermediárias, incluindo formação tubular entre 10% e 75%, pleomorfismo nuclear moderado e índice mitótico intermediário, indicando comportamento biológico também intermediário. Já o grau III, com 8 a 9 pontos, evidencia baixa ou ausente formação tubular (menos de 10%), acentuado pleomorfismo nuclear, com núcleos grandes e irregulares, e elevada taxa mitótica, sendo associado a maior agressividade tumoral, crescimento acelerado e pior prognóstico clínico (Makki, 2015)

O sistema TNM também é adotado, o qual analisa o tamanho do tumor (T), se atingiu linfonodos próximos (N) e se comprometeu outros órgãos, no caso de metástase (M), definindo cinco estágios (Benitez Fuentes, *et al.*, 2024). O estágio 0, também chamado de carcinoma *in situ*, engloba tumores não invasivos, em que as células cancerígenas permanecem confinadas aos ductos/lóbulos mamários. No estágio I, o tumor é pequeno, medindo até 2 cm, e permanece restrito à mama, com pouco ou nenhum envolvimento dos linfonodos axilares. O estágio II abrange tumores entre 2 e 5 cm ou com acometimento limitado dos linfonodos, mas sem sinais de disseminação para outros locais. Já o estágio III, considerado localmente avançado, inclui tumores maiores que 5 cm ou com comprometimento significativo dos linfonodos axilares e estruturas próximas, como a parede torácica ou a pele, embora ainda sem metástases distantes. No estágio IV, o CM é classificado como metastático, pois já se espalhou para órgãos como pulmões, fígado, ossos ou cérebro, sendo a forma mais grave da doença (Hortobagyi; Edge; Giuliano, 2018). Desde a oitava versão da classificação da AJCC, o estadiamento do CM

também considera a expressão de receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR), além do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e da taxa de crescimento das células, através do marcador Ki-67, pois impactam diretamente no tratamento a ser adotado (Teichgraeber; Guirguis; Whitman, 2021).

De fato, cada subtipo de CM apresenta suas próprias características biológicas que influenciam o prognóstico e a resposta às diferentes abordagens disponíveis. Por essa razão, entender essas características, não somente histológicas, mas também moleculares, é essencial para o manejo clínico, impactando a sobrevida dos pacientes.

1.2.2 Classificação molecular

Atualmente, as características moleculares dos tumores também são analisadas (Calvo, *et al.* 2018). Um marcador biomolecular é uma molécula biológica que pode ser medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou resposta a uma determinada terapia. Esses marcadores podem ser proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos ou metabólitos, cujas alterações estão associadas a condições específicas. Desempenham um papel fundamental na medicina de precisão, permitindo a detecção precoce, diagnóstico preciso, estratificação de pacientes, monitoramento de progressão da doença e avaliação da resposta ao tratamento. No CM, os principais são RE, RP, HER2 e Ki-67, sendo que, clinicamente, são adotados quatro subtipos moleculares principais: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido e Triplo-negativo (Figura 2) (Tsang; Tse, 2019).

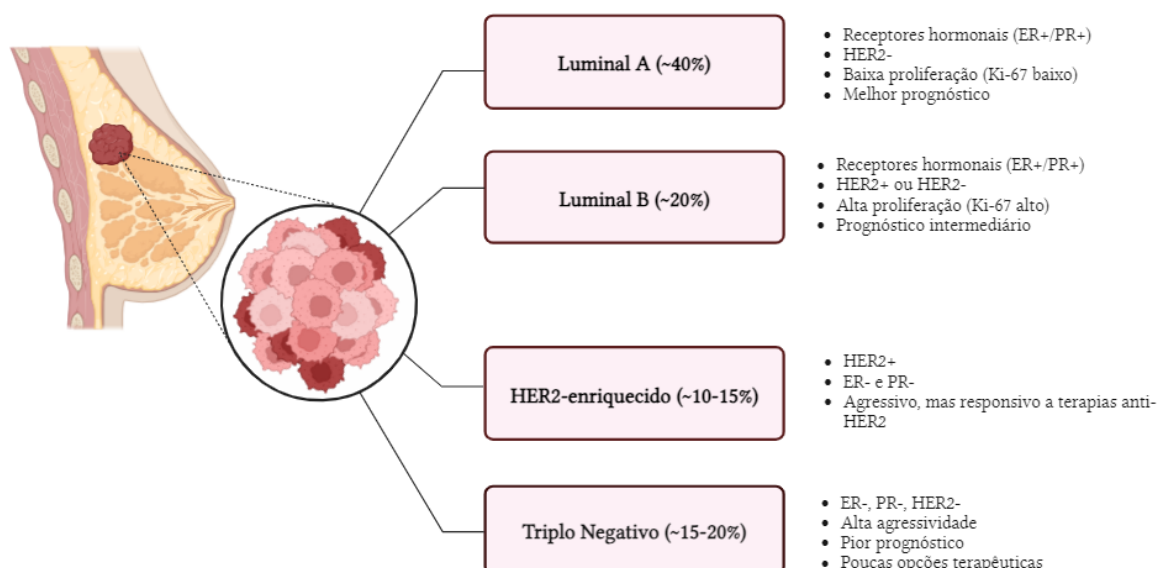
O subtipo Luminal A é o mais comum e apresenta um prognóstico favorável. Ele é caracterizado pela expressão RE e RP e $Ki67 < 14\%$. Geralmente, responde à terapia hormonal e possui menor risco de recorrência (Gao; Swain, 2018). Já o Luminal B também expressa receptores hormonais, mas apresenta maior índice proliferativo ($Ki67 > 14\%$) e, em alguns casos, pode expressar HER2. Esse subtipo possui comportamento mais agressivo em comparação ao Luminal A. O tratamento pode incluir terapia hormonal, quimioterapia e, se HER2-positivo, terapia-alvo com anticorpos anti-HER2 (Ades, *et al.* 2014)

O HER2-enriquecido é caracterizado pela superexpressão da proteína HER2 e pela ausência de receptores hormonais. Apresenta maior taxa de proliferação celular, aumentando o risco de metástase. No entanto, avanços no tratamento com anticorpos

monoclonais, como o trastuzumabe, melhoraram significativamente a sobrevida das pacientes com esse subtipo (Asif, *et al.* 2016)

O CM triplo-negativo (CMTN) é o subtipo mais desafiador e agressivo, representando cerca de 10% a 20% dos casos. Ele se caracteriza pela ausência RE, RP e HER2. O CMTN tem um crescimento rápido, alta taxa de proliferação celular e maior probabilidade de metástase, especialmente para órgãos como pulmões e cérebro. Além disso, está frequentemente associado a mutações no gene *BRCAl*, o que reforça sua natureza agressiva (Roy, *et al.* 2023).

Figura 2 - Principais subtipos moleculares do CM e percentual de ocorrência.



ER (Estrogen Receptor): Receptor de estrogênio; **PR** (Progesterone Receptor): Receptor de progesterona; **HER2** (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2): Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; **Ki-67**: Proteína marcador de proliferação celular; **ER+ / PR+**: Presença dos receptores hormonais (positivo); **ER- / PR-**: Ausência dos receptores hormonais (negativo); **HER2+**: Superexpressão do HER2 e **HER2-**: Sem superexpressão do HER2

Fonte: Autoria própria – adaptado de biorender

O CMTN apresenta elevada heterogeneidade molecular e biológica, característica que contribui diretamente para sua agressividade clínica e para a variabilidade de resposta aos tratamentos. Estudos de perfil transcriptômico demonstraram que esse subtipo não constitui uma doença única, podendo ser classificado em diferentes subgrupos moleculares, como basal-like, mesenquimal, imunomodulador e luminal receptor de

andrógeno (LAR), cada um associado a padrões distintos de expressão gênica, ativação de vias de sinalização e comportamento tumoral. O subtipo basal-like, por exemplo, está frequentemente relacionado à alta proliferação celular e à expressão de genes associados ao ciclo celular e mutações em genes de reparo de DNA, enquanto o subtipo mesenquimal apresenta maior associação com processos de migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal. Já o subtipo imunomodulador caracteriza-se pela expressão aumentada de genes ligados à resposta inflamatória e à atividade imune tumoral (Carvalho, *et al.*, 2025). Finalmente, o subtipo LAR caracteriza-se pela elevada expressão do receptor de andrógeno e de genes relacionados ao metabolismo hormonal e à sinalização esteroideal. Embora represente uma parcela menor dos casos de CMTN, esse subtipo apresenta características biológicas distintas dos demais, incluindo menor taxa proliferativa e comportamento clínico relativamente menos agressivo em alguns pacientes. (Lehmann, *et al.*, 2011)

Além disso, o CMTN apresenta elevada instabilidade genômica e alterações em importantes vias de sinalização celular, como PI3K/AKT/mTOR (Lehmann *et al.*, 2016). Pacientes com CMTN possuem maior risco de recidiva precoce, geralmente nos primeiros anos após o diagnóstico, e menor sobrevida global quando comparado aos demais subtipos, reforçando a necessidade de desenvolvimento contínuo de estratégias terapêuticas mais eficazes.

1.2.3 Tratamentos e suas limitações

O tratamento do CM é definido conforme diagnóstico, estadiamento, classificação molecular e histórico clínico do paciente. Dessa forma, o regime a ser adotado é individualizado, visando maior eficácia e melhor prognóstico. Nesse contexto, a cirurgia pode ser a primeira estratégia, especialmente em estágios iniciais da doença ou quando o tumor se encontra em regiões de fácil acesso. Esse procedimento consiste na remoção do tecido tumoral podendo ou não ser conservador. Portanto, em casos nos quais há comprometimento de estruturas adjacentes, pode ser necessária a reavaliação da conduta clínica (Al-Hilli; Wilkerson, 2021). No CMTN, a abordagem cirúrgica segue princípios semelhantes, porém frequentemente é precedida por quimioterapia neoadjuvante, devido ao comportamento mais agressivo desse subtipo e à maior probabilidade de doença sistêmica precoce.

Como complemento às abordagens cirúrgicas, a radioterapia é amplamente adotada. Essa técnica utiliza radiação ionizante, como raios X, para danificar o DNA das células transformadas, impedindo sua proliferação. Como células tumorais apresentam deficiências nos mecanismos de reparo, são mais responsivas à radiação. Apesar de sua eficácia, a radioterapia também pode afetar tecidos saudáveis adjacentes, resultando em efeitos colaterais como reações cutâneas, fadiga e inflamação local (Rose, *et al.*, 2024). No CMTN, a radioterapia possui papel relevante no controle loco regional, especialmente em pacientes com tumores de maior tamanho, margens cirúrgicas comprometidas ou acometimento linfonodal, contribuindo para a redução do risco de recidiva local (Whelan, *et al.*, 2015)

Além das terapias locais, existem abordagens sistêmicas como hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia. A hormonioterapia é indicada para tumores que expressam receptores hormonais. Essa estratégia visa bloquear a sua ação ou reduzir sua produção, interferindo diretamente no crescimento da lesão. Entretanto, a modulação hormonal pode desencadear efeitos adversos, como irregularidades menstruais, menopausa precoce, osteoporose e aumento do risco de eventos trombóticos (Cantini, *et al.*, 2023). Pacientes com CMTN não são elegíveis a esse tratamento, uma vez que são negativos para RE e RP, característica que define esse subtipo e contribui para suas limitações terapêuticas. (Foulkes; Smith; Reis-Filho, 2010)

As terapias-alvo, como os anticorpos monoclonais direcionados ao HER2, atuam reconhecendo moléculas específicas presentes nas células tumorais, podendo bloquear receptores, inibir vias de sinalização e induzir a morte celular. Apesar de representarem um avanço significativo, apresentam limitações como o alto custo e a restrição de uso a determinados subtipos moleculares, não sendo eficazes em todos os casos (Huang; Zhou, 2021). No CMTN, por não haver superexpressão de HER2, essas terapias clássicas não são indicadas; no entanto, têm sido utilizados inibidores de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), especialmente em pacientes com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, frequentes nesse subtipo.

Os inibidores de PARP atuam explorando deficiências nos mecanismos de reparo do DNA presentes em determinadas células tumorais. A enzima PARP participa do reparo de quebras simples da fita de DNA, quando sua atividade é bloqueada, ocorre o acúmulo progressivo dessas lesões, que podem evoluir para danos mais complexos durante a replicação celular. Em células normais, tais alterações são corrigidas principalmente pela via de recombinação homóloga, dependente de proteínas codificadas pelos genes *BRCA1*

e *BRCA2*. Entretanto, em tumores que apresentam mutações nesses genes, esse mecanismo se encontra comprometido, resultando no acúmulo de instabilidade gênica e na morte celular. Esse fenômeno, denominado letalidade sintética, constitui a principal base para a utilização clínica dos inibidores de PARP (Layman; Arun, 2021)

No CMTN, essa estratégia terapêutica tem demonstrado resultados promissores principalmente em pacientes portadores de mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*. Estudos clínicos demonstraram que fármacos como olaparibe e talazoparibe são capazes de aumentar a sobrevida livre de progressão e as taxas de resposta tumoral quando comparados à quimioterapia convencional em pacientes com doença avançada ou metastática associada a essas alterações genéticas (Robson, *et al.*, 2019)

Apesar dos benefícios observados, algumas limitações ainda restringem o uso dessa classe terapêutica. Entre elas destacam-se a eficácia mais limitada em pacientes sem mutações em *BRCA*, o desenvolvimento de mecanismos de resistência adquirida pelas células tumorais e a ocorrência de eventos adversos, principalmente hematológicos, como anemia, neutropenia e trombocitopenia. Além disso, a necessidade de identificação molecular prévia dos pacientes candidatos ao tratamento representa um desafio adicional para sua aplicação clínica em larga escala (Han, *et al.*, 2020)

Já a imunoterapia tem emergido como uma alternativa promissora, especialmente no tratamento do CMTN. Essa abordagem baseia-se na ativação do sistema imunológico do paciente, permitindo o reconhecimento e a eliminação das células tumorais. Estas desenvolvem mecanismos de evasão imunológica, como a ativação de checkpoints, que impedem sua detecção e eliminação. Os imunoterápicos atuam bloqueando esses mecanismos, favorecendo a resposta imune antitumoral. No CMTN, esse tipo de terapia tem mostrado maior eficácia em tumores que apresentam expressão de PD-L1 e alto grau de infiltração por linfócitos tumorais (Lotfinejad, *et al.*, 2020). Apesar dos avanços, a imunoterapia ainda também apresenta limitações, incluindo resposta variável entre os pacientes e potencial para efeitos adversos decorrentes da hiperativação do sistema imune, como inflamações sistêmicas, febre, erupções cutâneas e danos a tecidos saudáveis (Martins, *et al.*, 2019)

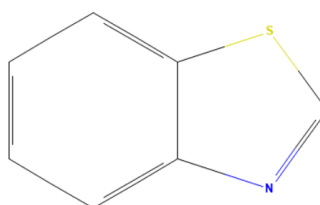
A quimioterapia, por sua vez, utiliza agentes citotóxicos que atuam interferindo na divisão celular, levando à morte das células tumorais. No contexto do CMTN, é ainda amplamente empregada. Esquemas contendo antraciclinas, taxanos e, em alguns casos, compostos de platina têm demonstrado maior eficácia, particularmente em tumores com deficiência em reparo de DNA. (Bianchini, *et al.*, 2016)

Dessa forma, embora existam múltiplas abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento do CM, todas apresentam limitações relacionadas à eficácia, toxicidade, custo e acessibilidade. No caso do CMTN, essas limitações são ainda mais evidentes devido à sua heterogeneidade molecular, comportamento agressivo e ausência de alvos terapêuticos clássicos. Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas seletivas e seguras, que possam ser usadas também em associação a tratamentos disponíveis.

1.3 Compostos derivados de benzotiazol

Derivados de benzotiazóis constituem uma importante classe de compostos heterocíclicos aromáticos que têm despertado interesse na química medicinal devido à sua ampla diversidade de atividades biológicas. Estruturalmente, o benzotiazol (Figura 3) é formado pela fusão de um anel benzênico a um anel tiazólico, o que confere à molécula propriedades físico-químicas favoráveis, como estabilidade, capacidade de interação com diferentes alvos biológicos e versatilidade para modificações químicas (Irfan, *et al.*, 2019)

Figura 3 - Estrutura molecular do benzotiazol



Fonte: PubChem

Farmacologicamente, derivados de benzotiazol apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e antioxidantes, associadas à capacidade desses compostos de interagir com proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Assim, pequenas modificações estruturais no anel benzotiazólico têm sido realizadas, objetivando maior seletividade e potência (Pathak, *et al.*, 2019). A introdução de grupos que removem elétrons, como halogênios ou nitrogrupos, geralmente está associada ao aumento da atividade citotóxica. Já variações no tamanho, na posição e na natureza dos substituintes impactam propriedades como lipofilicidade, permeabilidade celular e

afinidade por alvos moleculares. Dessa forma, o planejamento racional de novos compostos é essencial para sua posterior aplicação (Keri, *et. al.*, 2015)

Em tumores, esses compostos atuam em diferentes alvos, podendo inibir as topoisomerasas, impedindo a replicação e manutenção do DNA; interferir na dinâmica dos microtúbulos, bloqueando o ciclo celular e induzindo a apoptose e modular enzimas do citocromo P450, ativando espécies reativas capazes de danificar o DNA em células tumorais. Adicionalmente, alguns derivados são capazes de interagir diretamente com o material genético, promovendo estresse genotóxico e morte celular (Martins, *et al.*, 2015)

Nos últimos anos, pesquisas também têm explorado a combinação de derivados de benzotiazol com outras estratégias terapêuticas, incluindo quimioterapia convencional e terapias-alvo, com o objetivo de potencializar efeitos citotóxicos e reduzir mecanismos de resistência tumoral. Estudos envolvendo células de CM, pulmão e glioblastoma têm demonstrado resultados promissores (Üremiş; *et al.*, 2025), ampliando o potencial dessas substâncias.

Diante da agressividade e da limitada disponibilidade terapêutica do CNTN, aliada aos resultados promissores de compostos derivados de benzotiazóis em outros modelos tumorais, torna-se necessário investigar o potencial dessa classe de compostos sobre células de CMTN, contribuindo para a busca de novos candidatos a fármacos mais seletivos e eficazes.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de compostos derivados de benzotiazol sobre a proliferação, migração e expressão de genes de células de CMTN.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de diferentes linhagens celulares, não tumorais e tumorais mamárias, após o tratamento com oito compostos derivados de benzotiazol, utilizando o ensaio de MTT;
- Definir a concentração inibitória média (IC₅₀) e o índice de seletividade (IS) dos compostos mais promissores;

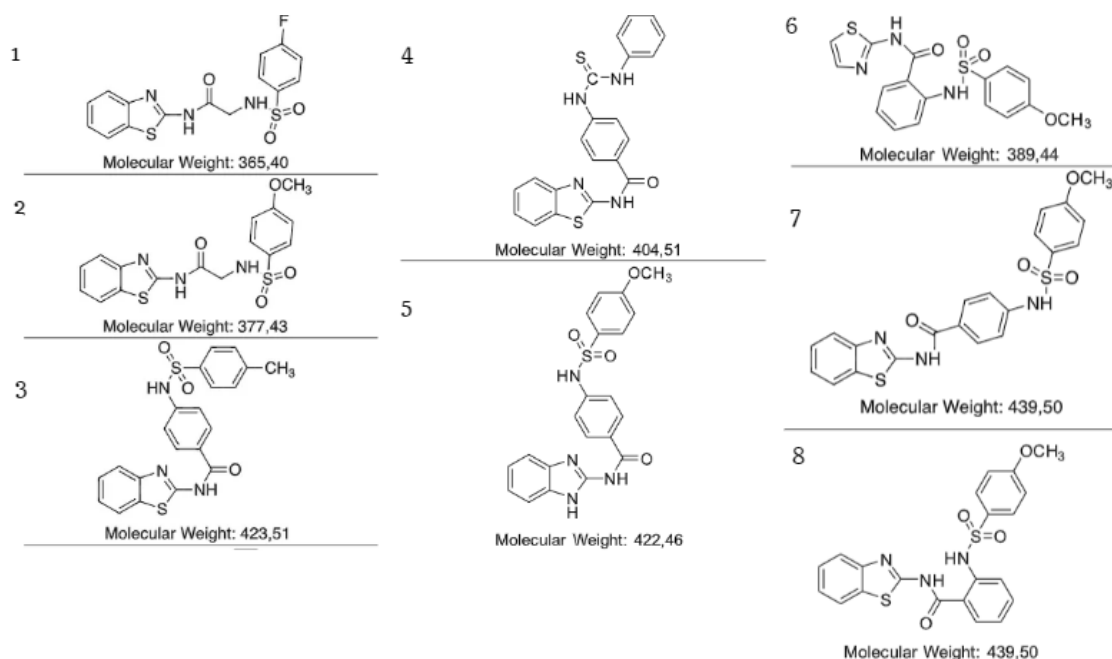
- Determinar o efeito do(s) composto(s) promissores na capacidade proliferativa e formação de colônias de células de CMTN, por meio do ensaio de clogenicidade;
- Investigar a influência do(s) composto(s) promissores na migração celular de células de CMTN, utilizando ensaio de *wound healing*;
- Analisar a expressão relativa de genes relacionados a inflamação e transição epitélio-mesenquimal (EMT) de células de CMTN por meio de qPCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Compostos

Os oito compostos derivados de benzotiazol foram previamente sintetizados pelo grupo de pesquisa do professor Celso de Oliveira Rezende Júnior coordenador do laboratório do LaSFar (Laboratório de Síntese de candidatos a Fármacos) (IQUFU-UFU) (Dias, *et al.*, 2023) e gentilmente cedidos para este estudo (Figura 4). Como diluente, foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração final de 0,6% (m/v) para o preparo de solução de 20 mM. Os compostos foram armazenados -20°C, protegidos de luz.

Figura 4- Estrutura dos 8 compostos testados



Fonte: (Dias, *et al.*, 2023)

3.2 Linhagens e cultivo celular

Para esse estudo foram utilizadas quatro linhagens celulares: HFF (fibroblastos humanos); MCF-10-A (não tumoral mamária); MCF-7 (CM luminal) e MDA-MB-231 (CMTN). Conforme as recomendações do fornecedor, ATCC (*American Type Culture Collection*), todas as linhagens foram mantidas em frascos de cultura apropriados, incubadas em estufa com atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO₂ (Forma Series 3 Water Jacketed, Thermo Scientific™), exceto a linhagem MDA-MB-231, mantida livre de CO₂.

As células MCF-10-A e HFF foram cultivadas em meio DMEM F12 (Gibco®) e DMEM HG (Gibco®) respectivamente, suplementado com 15% e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina (Cultilab®). Adicionalmente, as células MCF-10A foram suplementadas com insulina (10 µg/mL, Gibco®), hidrocortisona (0,25 µg/mL, Sigma-Aldrich®) e fator de crescimento epidérmico – EGF (10 ng/mL, Gibco®).

As células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e Leibovitz's L-15 (Gibco®), respectivamente, ambos suplementados com 10% de SFB (Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina (Cultilab®).

Para todas as linhagens, os meios de cultura foram substituídos periodicamente, de acordo com a demanda celular, e as células foram utilizadas nos experimentos ao atingirem entre 80% e 90% de confluência.

3.3 Citotoxicidade por MTT

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos derivados de benzotiazol, foi realizado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com Mosmann (1983), com algumas modificações. Inicialmente, o ensaio foi conduzido apenas na linhagem MDA-MB-231, objetivando selecionar aqueles capazes de alterar a viabilidade de células de CMTN em menores concentrações (≤ 20 µM), ou seja, passíveis de futura aplicação farmacológica. Para isso, células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 96 poços ($1,5 \times 10^4$ células/poço) e incubadas a 37 °C pelo período necessário para permitir a aderência celular. Em seguida, os compostos foram adicionados nas concentrações de 4 µM, 20 µM e 100 µM e mantidos por 48 horas. Como controles, foram

utilizados poços contendo apenas meio de cultura completo (controle) além de células tratadas apenas com DMSO (controle do diluente).

Decorrido esse período, foi adicionada solução de MTT na concentração final de 0,5 mg/mL (10 µL/poço), e as placas permaneceram incubadas por mais 4 horas a 37 °C, protegidas da luz. Em seguida, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e foram adicionados 100 µL de DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan, com posterior agitação por 10 minutos em Micropore Fast Shaker (Agimaxx). A absorbância foi determinada a 570 nm utilizando leitor de microplacas (Multiskan FC Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific®). A viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula: Viabilidade (%) = [(absorbância das células tratadas / absorbância das células controle) × 100]. Foi selecionado apenas composto **3**, uma vez que diminuiu a viabilidade das células de CMTN em pelo menos 50% em concentração ≤ 20 µM.

Em seguida, todas as linhagens incluídas nesse estudo foram tratadas, por 48 horas com o composto **3** nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5, 6,25 e 3,125 µM. Para isso, placas de 96 poços foram semeadas com HFF (8×10^3 células/poço); MCF-10-A ($1,5 \times 10^4$ células/poço); MCF-7 (3×10^3) e MDA-MB-231 ($1,5 \times 10^4$ células/poço). A avaliação da viabilidade foi conduzida conforme descrito no parágrafo acima.

Foi calculada a concentração inibitória média (IC₅₀) por ajuste de curva de regressão não linear utilizando com o software GraphPad Prism 10 (La Jolla, CA). O índice de seletividade (IS) foi determinado dividindo o valor de IC₅₀ para a linhagem tumoral pelo IC₅₀ das linhagens não tumorais, sendo considerados seletivos valores de IS > 2,0. Como o composto **3** se mostrou mais ativo nas células MDA-MB-231, estas foram utilizadas nos ensaios subsequentes.

3.4 Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade do composto testado de inibir a formação de colônias. Para isso, as células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 12 poços, na densidade de 500 células/poço e tratadas com composto **3**, nas concentrações correspondentes 4,84 µM (IC_{50/4}) e 9,67 µM (IC_{50/2}) por 48 horas. Em seguida, o meio contendo o tratamento foi removido e substituído por meio de cultura completo. Esse procedimento foi repetido a cada três dias, ao longo de um período total de 18 dias de incubação, permitindo o crescimento e a formação de colônias.

Ao final do experimento, as células foram fixadas com formaldeído/metanol 37% (v/v), lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x e coradas com solução de cristal violeta a 0,5% (m/v), preparada em uma mistura de metanol: água (1:30). As colônias formadas foram registradas por meio do sistema de imagem iBright (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA), possibilitando a comparação qualitativa entre os grupos tratados e o controle. Para a análise quantitativa, foi adicionada solução de ácido acético a 33% (m/v) em cada poço para solubilização do corante, e a absorbância foi mensurada a 570 nm utilizando leitor de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA). A porcentagem de colônias formadas foi calculada em comparação com o controle.

3.5 Ensaio *Wound healing*

O efeito do composto **3** sobre a capacidade migratória de células de CMTN foi avaliada pelo método *wound healing*. Células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 12 poços, na densidade de 2×10^5 células/poço e, após confluência e formação de uma monocamada aderente, foi realizado um risco linear utilizando uma ponteira estéril de volume de 200 µL. Em seguida, os poços foram cuidadosamente lavados com PBS 1x para remoção de debris celulares e melhor visualização da área do risco. Foi, então, adicionado meio de cultura e composto **3** nas concentrações 4,84 µM (IC_{50/4}) e 9,67 µM (IC_{50/2}) por 48 horas. Poços controle receberam apenas meio de cultura completo.

Imagens dos poços foram capturadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas, permitindo o acompanhamento do processo de fechamento da lacuna na monocamada, com aquisição de imagens em microscópio EVOS XL Core Imaging System- Invitrogen. A análise das imagens foi realizada com o auxílio do software ImageJ (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), sendo os valores obtidos utilizados para o cálculo do percentual de migração celular apresentado como o valor da área da lacuna em relação à área inicial do arranhão.

3.6 Ensaio qPCR

Experimentos de qPCR foram finalmente conduzidos para a quantificação de transcritos relacionados ao processo de EMT (Tabela 1). Para isso, o RNA total da linhagem celular MDA-MB-231, cultivada em placas de 6 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço)

e tratada nas concentrações 4,84 μM ($\text{IC}_{50/4}$) e 9,67 μM ($\text{IC}_{50/2}$) do composto **3** por 48 horas, foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

A integridade do material genético obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, submetido a 100 V por 1 hora, em tampão de corrida TBE 0,5X (45 mM Tris-borato, pH 8,3, e 1 mM EDTA), corado com GelRed 1X (Amersham) e visualizado sob luz ultravioleta em Transiluminador UV (LOCCUS L-PIX). Adicionalmente, a concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific), com base na razão de absorbância em 260/280 nm.

O RNA foi transcrito reversamente utilizando o Kit Moloney Murine Leukemia Virus (Sigma Aldrich), e o cDNA sintetizado a 37 °C por 1 hora. As reações de qPCR foram preparadas com o kit Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e a detecção da amplificação foi baseada na captada em equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A ciclagem foi padronizada a 50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min, seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

A análise dos dados foi conduzida por meio do software associado ao equipamento, utilizando o método do Cq comparativo para determinação da expressão relativa dos genes avaliados, utilizando o gene Beta-2-microglobulina (*B2M*) como gene de referência.

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos utilizados no ensaio de qPCR

Primer	Sequência (5' – 3')	Amplicon (pb)
<i>IL6</i>	F:GATTCCAAAGATGTAGCCGCC R:ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC	246
<i>IL1β</i>	F: ACAGGATATGGAGCAACAAGTGG R: GGGCTTATCATCTTTCAACACGC	136
<i>VIM</i>	F:GAGACGCATTGTCAACATCCTG R:CAAGAACACCCGCACCAAC	356
<i>CDH1</i>	F: CTGCGCTCTGTAGGAAGGC R:GCTGGCTCAAGTCAAAGTCCTG	240
<i>KRT18</i>	F:GCTCTGGGTTGACCGTGG	151

	R:GTGGTGCTCTCCTCAATCTGC	
<i>IL4</i>	F:CACAGCAGTTCCACAGGCAC R:CCTTCACAGGACAGGAATTCAAG	99
<i>TGFβ1</i>	F:GTACCTGAACCCGTGTTGCTC R:CAGGAATTGTTGCTGTATTTCTGG	107
<i>B2M</i>	F:CCTGCCGTGTGAACCATGT R:CGGCATCTTCAAACCTCC	94

IL6: Interleucina-6; *IL1β*: Interleucina-1 beta; *VIM*: Vimentina; *CDH1*: Caderina 1 (E-caderina); *KRT18*: Queratina 18; *IL4*: Interleucina-4; *TGFβ1*: Fator de Crescimento Transformador beta 1; *VIM*: Vimentina; *CDH1*: Caderina 1 (E-caderina); *B2M*: Beta-2-microglobulina.

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 10 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Para os ensaios de viabilidade celular (MTT), formação de colônias e migração celular, aplicou-se análise de variância *one-way* ANOVA, seguida dos testes de comparações múltiplas de Dunnett ou Tukey, conforme o desenho experimental. A análise dos resultados de qPCR foi realizada utilizando o teste t de *Student* para amostras independentes. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, considerando três repetições experimentais (n=3). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

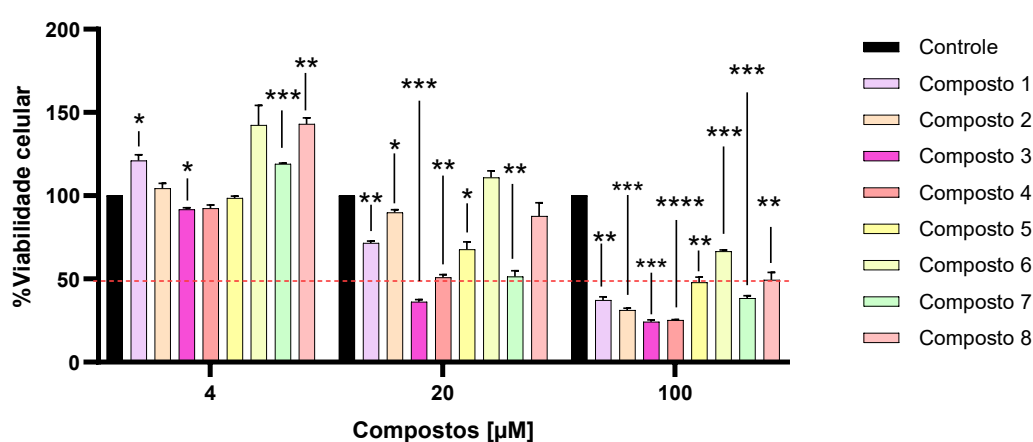
4 RESULTADOS

4.1 Seleção de compostos em células de CMTN

A primeira estratégia adotada nesse estudo foi selecionar, dentre os oito compostos derivados de benzotiazol, aqueles capazes de reduzir em pelo menos 50% a viabilidade de células de CMTN em menores concentrações (Figura 5). Na menor concentração, 4 μ M, nenhum composto alcançou o critério estabelecido; inclusive os compostos **1**, **2**, **6**, **7** e **8** aumentaram a atividade metabólica das células. Na concentração intermediária, apenas o composto **3** se mostrou citotóxico às células de CMTN.

Finalmente, na maior concentração, os compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **7**, reduziram em pelo menos 50% a viabilidade das células MDA-MB-231. Portanto, o composto **3** foi selecionado para a avaliação do comportamento de diferentes linhagens após tratamento, visando definir sua seletividade e as células tumorais mais responsivas.

Figura 5 - Efeito dos compostos derivados de benzotiazol 1-8 sobre a viabilidade da linhagem MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 3$). A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Dunnett, utilizando como referência as células não tratadas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0005$.

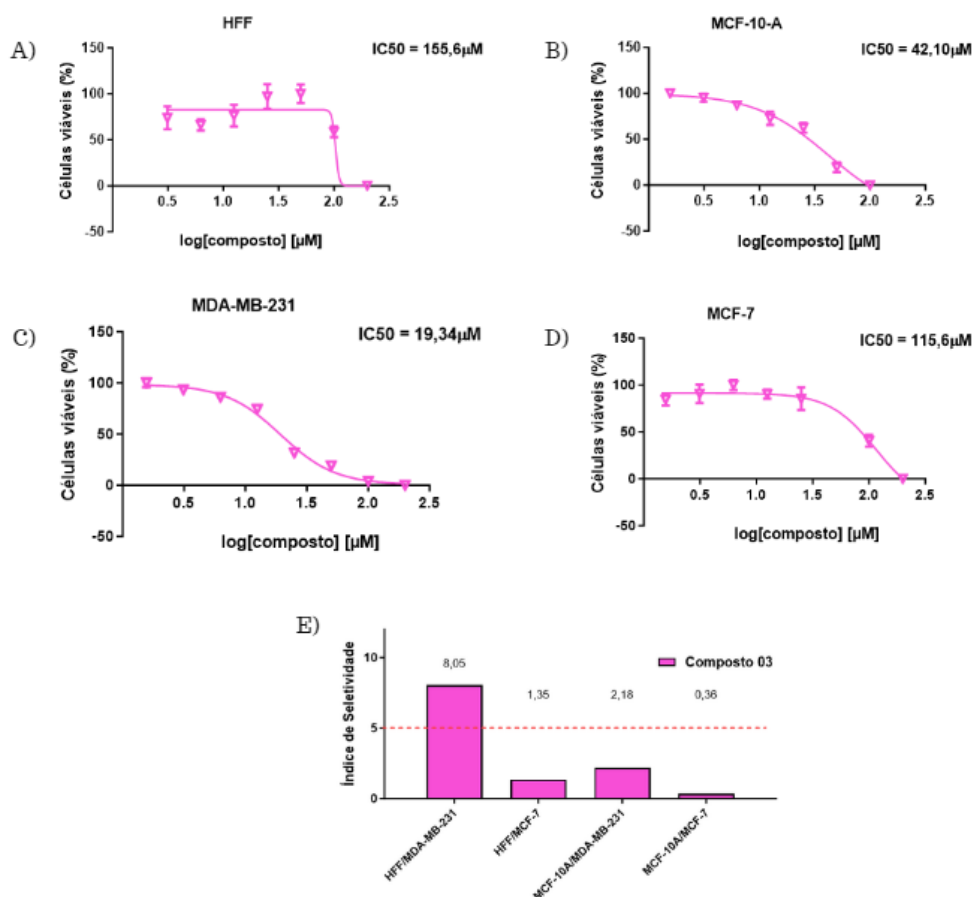


Fonte: Autoria própria

Outro ensaio de MTT foi, então, conduzido nas linhagens HFF, MCF-10-A, MCF-7 e MDA-MB-231, tratadas com o composto **3** nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM por 48 horas (Figura 6). Nas células não tumorais HFF, **3** apresentou menor citotoxicidade, com valor de $\text{IC}_{50} = 155,6 \mu\text{M}$, superior ao valor encontrado para a linhagem não tumoral mamária MCF-10-A, com $\text{IC}_{50} = 42,10 \mu\text{M}$. Entre as linhagens tumorais avaliadas, as células MDA-MB-231 (CMTN) foram mais sensíveis ao composto **3** ($\text{IC}_{50} = 19,34 \mu\text{M}$) do que as células MCF-7 (CM luminal), que apresentaram $\text{IC}_{50} = 115,6 \mu\text{M}$. Interessantemente, **3** foi seletivo apenas para as células de CMTN.

Figura 6 - Curvas dose-resposta de diferentes linhagens celulares tratadas com composto 3 nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM por 48 horas. (A) HFF (fibroblasto humano); (B) MCF-10-A (não tumoral mamária); (C) MDA-MB-231 (CMTN); (D) MCF-7 (câncer de mama)

luminal). As curvas foram construídas após a viabilidade determinada por MTT e a concentração inibitória média (IC₅₀) calculada por regressão não linear. (E) Gráfico representativo da seletividade do composto 3 dividindo o IC₅₀ das células não tumorais pelo IC₅₀ das células tumorais

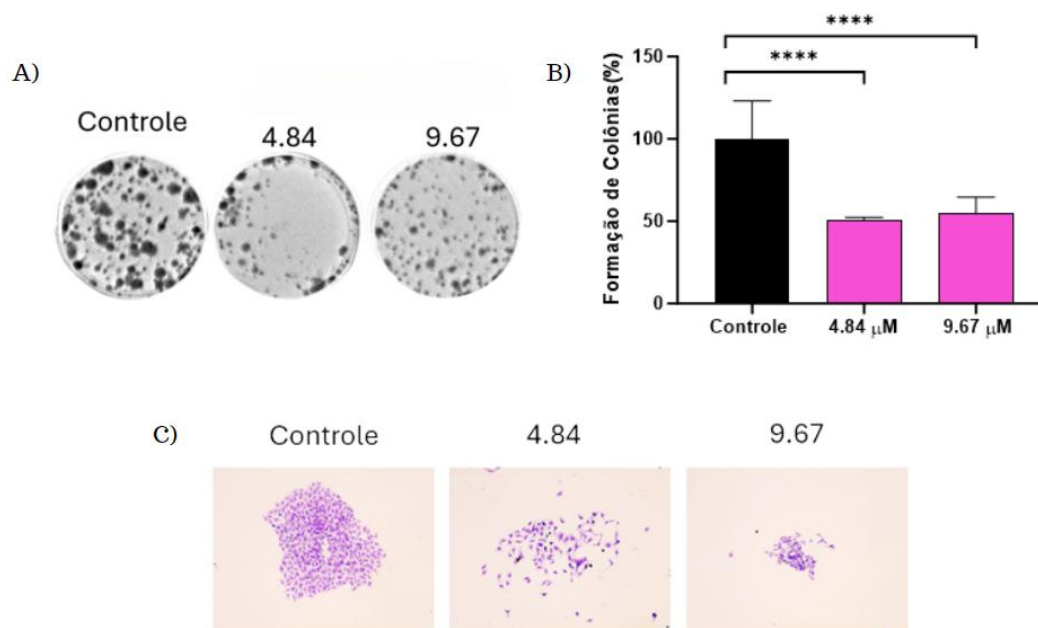


Fonte: Autoria própria

4.2 Inibição da clonogenicidade

A capacidade do composto **3** de inibir a formação de clones de células de CMTN também foi avaliada (Figura 7). Para isso, foram utilizadas concentrações subcitotóxicas, 4,84 μM (IC_{50/4}) e 9,67 μM (IC_{50/2}) por 48 horas. O perfil de inibição foi semelhante para as duas concentrações, sendo que ambas diferiram do controle sem tratamento. A concentração de 4,84 μM reduziu a formação de colônias em aproximadamente 50% e a concentração de 9,67 μM reduziu em 45%, não havendo diferenças significantes entre as duas concentrações.

Figura 7 – Inibição da clonogenicidade induzida pelo composto 3 em células MDA-MB-231. As células foram tratadas com duas concentrações do composto (4,84 e 9,67 μM) durante 48 horas. **(A)** Imagens representativas dos poços evidenciam alterações na formação de colônias após o tratamento. **(B)** Percentual de formação de colônias em comparação ao grupo controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida do teste post hoc de Tukey, considerando-se significativos os valores de **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo não tratado. **(C)** Imagens ilustrativas demonstrando diferenças no tamanho das colônias após o tratamento.

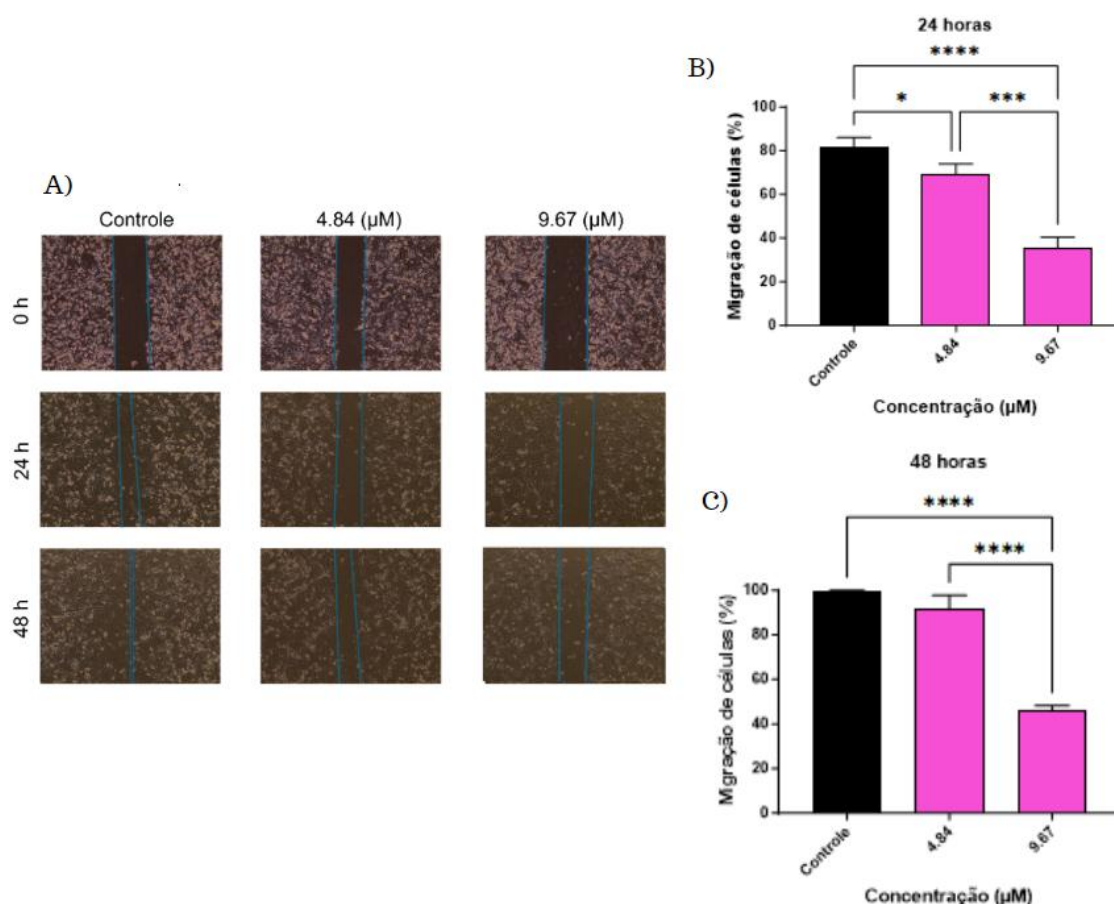


Fonte: Autoria própria

4.3 Inibição da migração horizontal

Outra característica a migração, também foi avaliada em células de CMTN, conhecidas por seu potencial de disseminação e metástase (Figura 8). Após 24 horas, ambas as concentrações, 4,84 μM ($\text{IC}_{50/4}$) e 9,67 μM ($\text{IC}_{50/2}$), reduziram a capacidade migratória das células MDA-MB-231, com efeito mais pronunciado quando o composto **3** foi utilizado na maior concentração, sendo a diferença entre as concentrações significativa. Após 48 horas, apenas quando as células foram tratadas com 9,67 μM de **3** houve redução da migração.

Figura 8 – Ensaio de migração celular (*wound healing*) em células MDA-MB-231 tratadas com composto 3 nas concentrações de 4,84 e 9,67 μM por 24 e 48 horas. (A) Imagens representativas evidenciando o fechamento da área de lesão nos tempos de 0, 24 e 48 horas em comparação ao grupo controle. (B) Gráfico do percentual do fechamento após 24 horas. (C) Gráfico do percentual do fechamento após 48 horas. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). A significância estatística foi determinada em comparação às células não tratadas por análise de variância (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey: *p < 0,05; **p < 0,01; **p < 0,0001.**

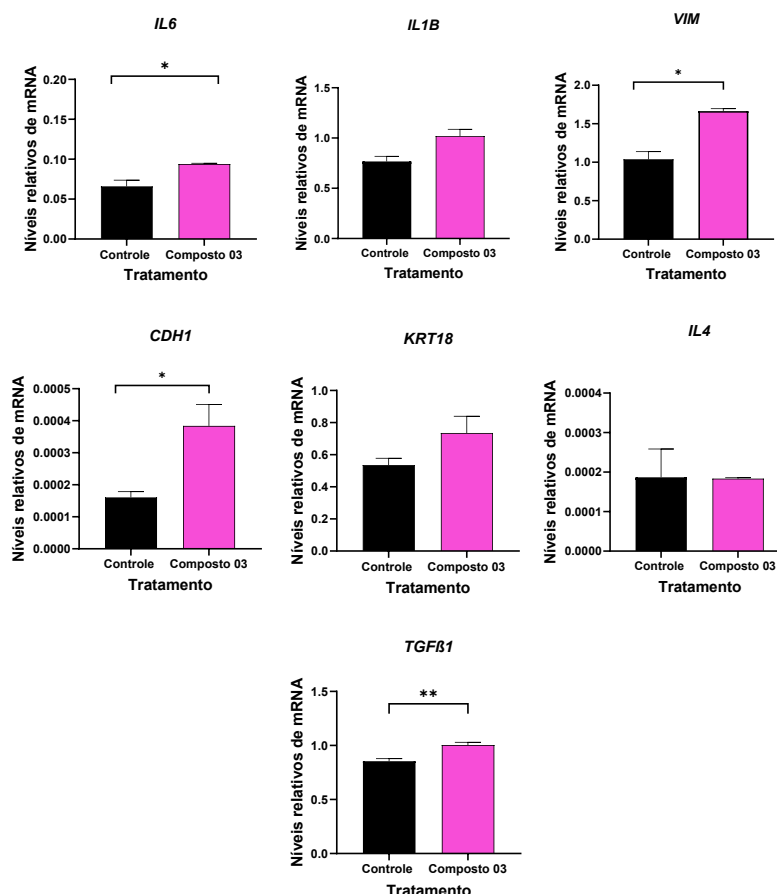


Fonte: Autoria própria

4.4 Modulação de diferentes transcritos

Finalmente, ensaios de qPCR quantificaram marcadores relacionados à EMT na linhagem MDA-MB-231 tratada com composto 3 na concentração de 4,84 μM ($\text{IC}_{50/4}$) por 48 horas (Figura 9). Verificou-se um aumento na expressão das citocinas *IL6* e *TGF β* , assim como dos transcritos de *VIM* e *CDH1*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os demais alvos.

Figura 9 - Avaliação da expressão gênica por qPCR em células MDA-MB-231 tratadas com o composto 3 na concentração de 4,84 μ M por 48 horas. Os gráficos representam os níveis relativos de mRNA dos genes *IL6* (Interleucina 6), *IL1 β* (Interleucina 1 beta), *VIM* (Vimentina), *CDH1* (Caderina E), *KRT18* (Queratina 18), *IL4* (Interleucina 4) e *TGF β 1* (Fator de Crescimento Transformador beta 1) em comparação ao grupo controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste post hoc de Tukey, considerando diferenças estatisticamente significativas para *p < 0,05 e **p < 0,01.



Fonte: Autoria própria

5 DISCUSSÃO

O CMTN desafia a oncologia devido ao seu comportamento agressivo, elevada capacidade metastática e limitada disponibilidade de terapias. Diferentemente de outros subtipos de CM, a ausência da expressão de ER, PR e HER2 restringe as opções disponíveis, com quadros frequentes de resistência e efeitos adversos associados. Nesse

contexto, os derivados de benzotiazol têm despertado crescente interesse diante de sua ampla diversidade estrutural e atividades biológicas (Irfan, *et al.*, 2019). Presentemente, essa classe de compostos foi avaliada em células MDA-MB-231, visando selecionar protótipos promissores. Essa linhagem, amplamente empregada como modelo experimental de CMTN, apresenta características compatíveis com tumores altamente agressivos, com elevada capacidade migratória, invasiva e metastática. Além disso, exibe elevada plasticidade celular e resistência a diferentes agentes terapêuticos, tornando-se um modelo adequado para a triagem de novas moléculas (Sirinian, *et al.*, 2022).

Inicialmente, foi conduzido um ensaio de MTT, com diferenças marcantes nas atividades citotóxicas dos oito derivados benzotiazólicos avaliados. De fato, modificações estruturais podem alterar significativamente o potencial antitumoral de moléculas (Paoletti; Supuran, 2024) e, neste estudo, os oito compostos divergem em sua estrutura. Assim, o comportamento observado está de acordo com estudos de relação estrutura-atividade (SAR), que demonstram que alterações na natureza e na posição de substituintes no núcleo benzotiazólico podem modificar propriedades como lipofilicidade, permeabilidade celular, afinidade pelo alvo molecular e estabilidade química, refletindo diretamente na atividade biológica (Huang; Cierpicki; Grembecka, 2023).

Para os compostos 1, 2, 6, 7 e 8 foi observada uma maior metabolização do formazan na menor concentração (4 μ M) e, na concentração intermediária (20 μ M), apenas o composto 3 reduziu em mais de 50% a viabilidade das células de CMTN. O aumento da metabolização do formazan observado para os compostos 1, 2, 6, 7 e 8 em baixa concentração pode estar relacionado, ao menos em parte, à atividade antioxidante descrita para derivados benzotiazólicos. A redução do estresse oxidativo intracelular pode favorecer a manutenção da função mitocondrial e aumentar a capacidade redutora das células, resultando em maior conversão do MTT em formazan, sem necessariamente refletir um aumento da proliferação celular. Assim, esse efeito pode representar uma resposta metabólica transitória às baixas concentrações dos compostos, e não um efeito proliferativo propriamente dito (Bruggisser, *et al.*, 2002). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a organização estrutural do composto 3 favoreceu sua interação com alvos celulares das células MDA-MB-231, justificando sua maior atividade citotóxica em comparação aos demais derivados avaliados.

Além disso, é importante considerar que o ensaio de MTT avalia a atividade metabólica mitocondrial, e não diretamente o número de células viáveis (Riss, *et al.*,

2016). Assim, a análise metabolômica dessas células após o tratamento também é relevante e será considerada em estudos futuros. Os resultados obtidos são consistentes com estudos realizados com outros derivados benzotiazólicos. Liu *et al.* (2019) demonstraram que modificações estruturais em uma mesma série química resultaram em diferenças marcantes na atividade citotóxica frente às células MDA-MB-231, sendo que apenas alguns derivados se mostraram citotóxicos no ensaio de MTT.

A capacidade do composto **3** de reduzir a viabilidade a 20 μM é relevante, pois a potência farmacológica é um dos principais parâmetros considerados durante as etapas iniciais da descoberta de novos fármacos. De modo geral, moléculas capazes de produzir efeito biológico em concentrações menores são consideradas mais promissoras, uma vez que apresentam maior afinidade pelo alvo biológico ou maior eficiência em desencadear a resposta farmacológica desejada. Além disso, concentrações moderadas reduzem a necessidade de doses elevadas, minimizando a ocorrência de efeitos adversos. Entretanto, a potência observada em cultura celular deve ser interpretada com cautela, pois a eficácia terapêutica depende também de fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos (Jansson-löfmark; Hjorth; Gabrielsson, 2020). Com isso, a atividade observada para o composto **3** é um indicativo favorável para a continuidade dos estudos, reforçando seu potencial como candidato ao desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

Ademais, **3** foi seletivo apenas para a linhagem de CMTN. Evidências apontam que compostos benzotiazólicos apresentam seletividade para células, o que é um aspecto altamente desejável (Paoletti, *et al.*, 2024). Essa seletividade pode estar associada a diferenças metabólicas entre células saudáveis e neoplásicas, bem como à ativação diferencial de vias bioquímicas específicas em tumores. Outro ponto relevante é a capacidade dos compostos de atuar sobre alvos moleculares específicos, como quinases, receptores celulares e proteínas, ampliando seu potencial terapêutico (Singh, M; Singh, S, *et al.*, 2014).

Além da viabilidade, outros estudos funcionais foram realizados com o composto **3** em concentrações subcitotóxicas de 4,84 μM ($\text{IC}_{50/4}$) e 9,67 μM ($\text{IC}_{50/2}$). Ambas as concentrações foram capazes de reduzir em aproximadamente 50% a formação de colônias. Esse comportamento pode indicar que não são necessárias concentrações elevadas para conter a sobrevivência celular e a capacidade de uma célula individual de crescer e formar uma colônia. Esses resultados reforçam que a atividade do composto **3** não se limita à redução da atividade metabólica observada no ensaio de MTT, mas também interfere na capacidade das células tumorais de manter seu crescimento. Essa

redução da capacidade clonogênica observada após o tratamento corrobora os resultados descritos por estudos envolvendo derivados benzotiazólicos com potencial antitumoral. Zheng *et al.* (2013) avaliaram derivados tiazólicos em células MDA-MB-231 e demonstraram que alguns compostos foram capazes de reduzir significativamente a formação de colônias em comparação ao grupo controle.

O composto **3** também reduziu a migração celular já nas primeiras 24 horas de tratamento, sendo esse efeito mais pronunciado na concentração de 9,67 μ M. Após 48 horas, apenas essa concentração manteve diferença significativa em relação ao grupo controle, sugerindo que o efeito antimigratório é dose-dependente. Esses resultados sugerem que o composto **3** interfere em processos necessários para o deslocamento celular, reduzindo a capacidade das células de ocupar a área lesionada. Considerando que a migração representa uma etapa fundamental para a invasão tecidual e o desenvolvimento de metástases (Valastyan; Weinberg, 2011), a diminuição observada neste estudo sugere que **3** pode atuar não apenas sobre a proliferação celular, mas também sobre características associadas ao fenótipo metastático das células de CMTN. Barbarossa *et al.* (2023) também demonstraram que compostos dessa classe reduziram significativamente a migração das células MDA-MB-231 no ensaio *de wound healing*, efeito acompanhado por alterações em marcadores relacionados à EMT, incluindo diminuição da expressão de VIM e aumento de CDH1

Por fim, a análise de transcritos relacionados à EMT revelou que o composto **3** aumentou significativamente a expressão de *IL6*, *VIM*, *CDH1* e *TGFBI*. Embora esses genes sejam frequentemente associados à progressão tumoral, também podem ser modulados em resposta a agentes citotóxicos, refletindo mecanismos adaptativos desencadeados pelo dano celular. A IL-6 constitui uma das principais citocinas envolvidas na resposta ao estresse, sendo rapidamente induzida por dano ao DNA, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, com o objetivo de promover a sobrevivência em condições adversas (Manore, *et al.*, 2022). De maneira semelhante, o aumento de *TGFBI* pode representar uma tentativa das células de restabelecer a homeostase após a exposição ao composto, uma vez que essa citocina participa da regulação de processos como reparo tecidual, remodelamento celular e resposta ao dano (Moses; Barcellos-Hoff, 2010). A superexpressão de *VIM*, por sua vez, pode estar relacionada à reorganização do citoesqueleto necessária para que a célula suporte alterações estruturais decorrentes do tratamento, sendo descrita como uma resposta adaptativa a agentes quimioterápicos (Satelli; Li, 2011).

Já *CDH1* codifica para E-caderina, uma glicoproteína transmembrana essencial para a manutenção da adesão célula-célula e da arquitetura epitelial. A redução da expressão de *CDH1* é considerada um dos principais eventos moleculares associados à EMT, favorecendo a perda da adesão celular, o aumento da motilidade e a disseminação metastática no CMTN (Corso, *et al.*, 2020). Dessa forma, o aumento significativo da expressão de *CDH1* observado sugere que o composto **3** pode contribuir para a preservação do fenótipo epitelial das células MDA-MB-231, reduzindo características associadas ao comportamento invasivo. Essa hipótese é reforçada pelos resultados obtidos nos ensaios funcionais, nos quais foi observada redução da viabilidade celular, da capacidade de formação de colônias e da migração das células tratadas. Embora a progressão tumoral seja regulada por uma complexa rede de vias de sinalização, esses achados indicam que a modulação positiva de *CDH1* pode representar um dos mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do composto **3**, contribuindo para a redução da agressividade das células MDA-MB-231.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os derivados de benzotiazol avaliados alteram o comportamento de células de CMTN MDA-MB-231, com destaque para o composto **3**, que se mostrou mais citotóxico e seletivo. Ademais, **3** foi capaz de reduzir a capacidade de formação de colônias e a migração das células MDA-MB-231, indicando que seus efeitos não se restringem à diminuição da viabilidade celular, mas também afetam características relacionadas à progressão tumoral. Complementarmente, a análise da expressão gênica revelou modulação de genes associados à inflamação e à EMT, de modo que o perfil transcricional observado é condizente com os resultados dos ensaios funcionais.

Portanto, o composto **3** se mostra promissor com características desejáveis para um protótipo antitumoral. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer detalhadamente seus mecanismos de ação e avaliar seu potencial terapêutico em modelos experimentais *in vivo*, contribuindo para o avanço do desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do CMTN.

REFERÊNCIAS

- ADES, Felipe; ZARDAVAS, Dimitrios; BOZOVIC-SPASOJEVIC, Ivana; *et al.* Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 25, p. 2794–2803, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25049332/>.
- AL-HILLI, Zahraa; WILKERSON, Avia. Breast Surgery. *Surgical Clinics of North America*, v. 101, n. 5, p. 845–863, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34537147/>.
- ALZEHR, Aymen; HULME, Claire; SPENCER, Anne; *et al.* The economic impact of cancer diagnosis to individuals and their families: a systematic review. **Supportive Care in Cancer**, v. 30, n. 8, p. 6385–6404, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35235040/>.
- ASHBURY, Fredrick D. COVID-19 and supportive cancer care: key issues and opportunities. **Current Opinion in Oncology**, v. 33, n. 4, p. 295–300, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33720066/>.
- ASIF, Hafiz Muhammad; SULTANA, Sabira; AHMED, Saeed; *et al.* HER-2 Positive Breast Cancer - a Mini-Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 4, p. 1609–1615, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27221828/>.
- BALACHANDER; K. M. K. MASTHAN; N. ARAVINDHA BABU; *et al.* Myoepithelial cells in pathology. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n. 5, p. 190–190, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26015706/>.
- BARBAROSSA, Alexia; CERAMELLA, Jessica; CAROCCI, Alessia; *et al.* Benzothiazole-Phthalimide Hybrids as Anti-Breast Cancer and Antimicrobial Agents. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, p. 1651, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10740580/>.
- BARRÓN A; BERMEJO L; CASTRO I. [Estrogen receptors and the mammary gland]. **Revista de investigacion clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, v. 49, n. 6, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9528313/>.
- BENITEZ FUENTES, Javier David; MORGAN, Eileen; DE LUNA AGUILAR, Alicia; *et al.* Global Stage Distribution of Breast Cancer at Diagnosis. **JAMA Oncology**, v. 10, n. 1, p. 71, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37943547/>.
- BIANCHINI, Giampaolo; BALKO, Justin M.; MAYER, Ingrid A.; *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27184417/>.

BRUGGISSER, Regina; DAENIKEN, Katrin von; JUNDT, Gernot; *et al.* Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445–448, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12058323/>.

CALVO, José Palacios; ALBANELL, Joan; ROJO, Federico; *et al.* Consenso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y la Sociedad Española de Oncología Médica sobre biomarcadores en cáncer de mama. **Revista Española de Patología**, v. 51, n. 2, p. 97–109, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29602380/>.

CAMILLETTI, María A; ABELEDO-MACHADO, Alejandra; FARAONI, Erika Y; *et al.* New insights into progesterone actions on prolactin secretion and prolactinoma development. **Steroids**, v. 152, p. 108496–108496, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31521709/>.

CAMINHA, IUSTA; FÁBIO TÁVORA; BARBOSA, Juliana; *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the diagnosis of lung cancer in northeastern Brazil. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**, p. e20220248–e20220248, 2022. Disponível em: <https://www.jornaldepneumologia.com.br/details/3763/pt-BR/impacto-da-pandemia-de-covid-19-no-diagnostico-de-cancer-de-pulmao-no-nordeste-brasileiro>.

CANTINI, Luca; TRAPANI, Dario; GUIDI, Lorenzo; *et al.* Neoadjuvant therapy in hormone Receptor-Positive/HER2-Negative breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 123, p. 102669–102669, 2023. Disponível em: [https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(23\)00162-7/abstract](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(23)00162-7/abstract).

CARVALHO, Eduarda; CANBERK, Sule; SCHMITT, Fernando; *et al.* Molecular Subtypes and Mechanisms of Breast Cancer: Precision Medicine Approaches for Targeted Therapies. **Cancers**, v. 17, n. 7, p. 1102–1102, 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/17/7/1102>.

CHAMALIDOU, C.; FOHLIN, H.; ALBERTSSON, P.; *et al.* Survival patterns of invasive lobular and invasive ductal breast cancer in a large population-based cohort with two decades of follow up. **The Breast**, v. 59, p. 294–300, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960977621004203?>

CORSO, Giovanni; FIGUEIREDO, Joana; DE ANGELIS, Simone Pietro; *et al.* E-cadherin deregulation in breast cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 11, p. 5930–5936, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7294130/>.

CRUZ, EDWIN FERNÁNDEZ; BRICIA LÓPEZ PLAZA; VIVIANA LORIA KOHEN; *et al.* Diet and lifestyle in cancer prevention. **Nutricion Hospitalaria**, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36040006/>.

DIAS, Renieidy Flávia Clemente; RIBEIRO, Beatriz Murta Rezende Moraes; CASSANI, Natasha Marques; *et al.* Discovery and structural optimization of a new series of N-acyl-2-aminobenzothiazole as inhibitors of Zika virus. **Bioorganic &**

Medicinal Chemistry, v. 95, p. 117488, 2023. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808962300336X?via%3Dihub>.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403–410, 1991. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1757079/>.

FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21067385/>.

GAO, Jennifer J.; SWAIN, Sandra M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist*, v. 23, n. 5, p. 556–565, 2018. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29472313/>.

HAN, Ye; YU, Xiaopeng; LI, Shuqiang; *et al.* New Perspectives for Resistance to PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 578095–578095, 2020. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.578095/full>.

HECHT, Stephen S; HATSUKAMI, Dorothy K. Smokeless tobacco and cigarette smoking: chemical mechanisms and cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 3, p. 143–155, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34980891/>.

HORTOBAGYI, Gabriel N; EDGE, Stephen B; GIULIANO, Armando. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 38, p. 457–467, 2018. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30231399/>.

HUANG, Guang; CIERPICKI, Tomasz; GREMBECKA, Jolanta. 2-Aminobenzothiazoles in anticancer drug design and discovery. **Bioorganic Chemistry**, v. 135, p. 106477, 2023. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10718064/>.

HUANG, Ruixue; ZHOU, Ping-Kun. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34238917/>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *INCA estima 781 mil novos casos de câncer por ano no Brasil entre 2026 e 2028*. Rio de Janeiro: INCA, 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2026/inca-estima-781-mil-novos-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-entre-2026-e-2028>

IRFAN, Ali; BATOOL, Fozia; ZAHRA NAQVI, Syeda Andleeb; *et al.* Benzothiazole derivatives as anticancer agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 265–279, 2019. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6896476/>.

JANSSON-LÖFMARK, Rasmus; HJORTH, Stephan; GABRIELSSON, Johan. Does *In Vitro* Potency Predict Clinically Efficacious Concentrations? **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 108, n. 2, p. 298–305, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275768/>.

KERI, Rangappa S.; PATIL, Mahadeo R.; PATIL, Siddappa A.; *et al.* A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 207–251, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414009878?via%3Dihub>.

LAYMAN, Rachel M.; ARUN, Banu. PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Including Those with BRCA Mutations. **The Cancer Journal**, v. 27, n. 1, p. 67–75, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33475295/>.

LEHMANN, Brian D.; JOVANOVIĆ, Bojana; CHEN, Xi; *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27310713/>.

LEHMANN, Brian D; BAUER, Joshua A; CHEN, Xi; *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 2011. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/45014>.

LIU, Da Chuan; JIA GAO, Mei; HUO, Qiang; *et al.* Design, synthesis, and apoptosis-promoting effect evaluation of novel pyrazole with benzo[d]thiazole derivatives containing aminoguanidine units. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 829–837, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6442160/>.

LOTFINEJAD, Parisa; ASGHARI JAFARABADI, Mohammad; ABDOLI SHADBAD, Mahdi; *et al.* Prognostic Role and Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): A Systematic Review and Meta-Analysis Study. **Diagnostics**, v. 10, n. 9, p. 704, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7554852/>.

MACIAS, Hector; HINCK, Lindsay. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 533–557, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22844349/>.

MAKKI, Jaafar. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26740749/>.

MANORE, Sara G.; DOHENY, Daniel L.; WONG, Grace L.; *et al.* IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35371975/>.

MARTINS, Filipe; SOFIYA, Latifyan; SYKIOTIS, Gerasimos P.; *et al.* Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 9, p. 563–580, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41571-019-0218-0>.

MARTINS, Pedro; JESUS, João; SANTOS, Sofia; *et al.* Heterocyclic Anticancer Compounds: Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16852–16891, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/9/16852>.

MCDONALD, Elizabeth S; CLARK, Amy S; TCHOU, Julia; *et al.* Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. Supplement 1, p. 9S16S, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26834110/>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer (INCA). [s.l.: s.n.], 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175983903034?via%3Dihub>.

MOSES, H.; BARCELLOS-HOFF, M. H. TGF- Biology in Mammary Development and Breast Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. a003277–a003277, 2010. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3003461/>.

MOSTAFA VAGHARI-TABARI; FERNS, Gordon A; DURDI QUJEQ; *et al.* Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 8, p. 5512–5532, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33580511/>.

PAOLETTI, Niccolò; SUPURAN, Claudiu T. Benzothiazole derivatives in the design of antitumor agents. **Archiv Der Pharmazie**, p. e2400259, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38873921/>.

PATEL, Seema; HOMAEI, Ahmad; AKONDI BUTCHI RAJU; *et al.* Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 403–411, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29573619/>.

PATHAK, Nandini; RATHI, Ekta; KUMAR, Nitesh; *et al.* A Review on Anticancer Potentials of Benzothiazole Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 12–23, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31288719/>.

ROBSON, M E; TUNG, N; CONTE, P; *et al.* OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast

cancer. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 4, p. 558–566, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503629/pdf/mdz012..>

ROSE, Fiorenza De; CARMEN, Maria; LUCIDI, Sara; *et al.* Dose constraints in breast cancer radiotherapy. A critical review. **Radiotherapy and Oncology**, p. 110591–110591, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39427931/>.

ROWLAND, Julia H; GALLICCHIO, Lisa; MOLLICA, Michelle; *et al.* Survivorship Science at the NIH: Lessons Learned from Grants Funded in Fiscal Year 2016. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 2, p. 109–117, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30657942/>.

ROY, Madhuchhanda; FOWLER, Amy M.; ULANER, Gary A.; *et al.* Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 18, n. 4, p. 441–458, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37268505/>.

SALCI, MARIA APARECIDA; SÔNIA SILVA MARCON. Enfrentamento do câncer em família. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 20, n. spe, p. 178–186, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tce/a/MJLKgTSWkPsdW3mZkmrn6Hd/>.

SATELLI, Arun; LI, Shulin. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 18, p. 3033–3046, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-011-0735-1>.

SEHRAWAT, Anuradha; SINGH, Shivendra V. Benzyl Isothiocyanate Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Cultured and Xenografted Human Breast Cancer Cells. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 7, p. 1107–1117, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21464039/>.

SINGH, Meenakshi; SINGH, Sushil. Benzothiazoles: How Relevant in Cancer Drug Design Strategy? **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 127–146, 2014. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/54166>.

SIRINIAN, Chaido; PEROUKIDIS, Stavros; KRIEGSMANN, Katharina; *et al.* Cellular Senescence in Normal Mammary Gland and Breast Cancer. Implications for Cancer Therapy. **Genes**, v. 13, n. 6, p. 994, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9223240/>.

SRIVASTAVA, Vasudha; HUYCKE, Tyler R; PHONG, Kiet; *et al.* Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 66, p. 51–58, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32535255/>.

TEICHGRAEBER, Davis C.; GUIRGUIS, Mary S.; WHITMAN, Gary J. Breast Cancer Staging: Updates in the *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the *AJR* Special Series on Cancer Staging. **American Journal of Roentgenology**, v. 217, n. 2, p. 278–290, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33594908/>.

TRUSLER, Oliver; GOODWIN, Jacob; LASLETT, Andrew L. BRCA1 and BRCA2 associated breast cancer and the roles of current modelling systems in drug

discovery. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1875, n. 1, p. 188459–188459, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33129865/>.

TSANG, Julia Y.S.; TSE, Gary M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045583/>.

ULLAH, Safayet; ISLAM, Dewan Zubaer; SHAHAD SAIF KHANDKER; *et al.* Breast Cancer Management in the Era of Covid-19; Key Issues, Contemporary Strategies, and Future Implications. **Breast Cancer Targets and Therapy**, v. Volume 15, p. 51–89, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36733464/>.

VALASTYAN, Scott; WEINBERG, Robert A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, 2011. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3261217/>.

WANG. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 12, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29949179/>.

WANG, Yi; HONG, Zhongshi; SONG, Jintian; *et al.* METTL3 promotes drug resistance to oxaliplatin in gastric cancer cells through DNA repair pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10562647/>.

WHELAN, Timothy J.; OLIVOTTO, Ivo A.; PARULEKAR, Wendy R.; *et al.* Regional Nodal Irradiation in Early-Stage Breast Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 4, p. 307–316, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4556358/>.

WILKINSON, Louise; GATHANI, Toral. Understanding breast cancer as a global health concern. **The British Journal of Radiology**, v. 95, n. 1130, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8822551/>.

ZHENG, Shilong; ZHONG, Qiu; JIANG, Quan; *et al.* Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23526571/>.

ÜREMİŞ, Muhammed Mehdi; ÜREMİŞ, Nuray; CEYLAN, Mustafa; *et al.* Anticancer and Anti-Inflammatory Effects of Benzothiazole Derivatives Targeting NF- κ B/COX-2/iNOS in a Hepatocellular Carcinoma Cell Line. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 207–216, 2025. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12316066/>.