

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

CRISTAL DARINI GARCIA LEAL DE SOUZA RAMOS

**NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE DOS BENZOTIAZÓIS: ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E ALTERAÇÕES MOLECULARES EM CÉLULAS TUMORAIS
MAMÁRIAS TRIPLO-NEGATIVAS**

PATOS DE MINAS – MG
JULHO DE 2026

CRISTAL DARINI GARCIA LEAL DE SOUZA RAMOS

**NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE DOS BENZOTIAZOIS: ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E ALTERAÇÕES MOLECULARES EM CÉLULAS TUMORAIS
MAMÁRIAS TRIPLO-NEGATIVAS**

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

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

Coorientador: Dr. Raoni Pais Siqueira

PATOS DE MINAS – MG

JULHO DE 2026

CRISTAL DARINI GARCIA LEAL DE SOUZA RAMOS

Novos compostos da classe dos benzotiazóis: atividades biológicas e alterações moleculares em células tumorais mamárias triplo-negativas

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

Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas - 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, 29 de julho de 2026

AGRADECIMENTOS

Depois de tanto tempo, finalmente posso agradecer. Em primeiro lugar, a Deus, pois sem ele nada seria possível.

À minha família, àqueles que estão presentes e àqueles que, infelizmente, já se foram. À minha mãe, Alexandra Darini, por sempre fazer o possível e o impossível para me ver feliz e crescer na vida. Ao meu pai, Bran Magnon Ramos, por todas as lições e por contribuir para meu amadurecimento. Ao meu irmão Lucca Darini, que sempre foi e continuará sendo minha inspiração. Aos meus avós, paternos, Vanda e Zé Carlos, e maternos, Regina e Eduardo, que participaram da minha criação e sempre me ensinaram que a educação é a única coisa que jamais poderá ser roubada de nós. Fico feliz em dizer que minha família é minha motivação para ser um pouquinho melhor a cada dia.

Agradeço aos meus amigos que acompanharam toda a minha trajetória desde o ingresso na faculdade e permanecem ao meu lado até hoje (principalmente a Júlia Marani que aguenta meus surtos desde os 13 anos). Em especial, as amigas da graduação, especial Gabi Inhauser e Maju, que tornaram essa caminhada muito mais leve, entre provas, trabalhos, caronas, risadas e momentos que levarei para sempre.

Ao meu quarteto das Superpoderosas, Ana Ligia, Gabriela Barçante e Julia Cristina, por fazerem desses anos os mais especiais da minha vida. Foram incontáveis momentos de alegria, desespero, sorvetes, noites estudando física, intervalos prolongados na Amelinha e conversas que fortaleceram uma amizade que levarei para sempre. Mesmo seguindo caminhos diferentes, continuamos torcendo e cuidando umas das outras, e isso é um dos maiores presentes que a graduação me proporcionou.

E acharam que não ia ter um especial dela? A minha dupla para a vida toda, Ana Ligia. Eu poderia escrever mais páginas sobre nossa amizade do que sobre esta pesquisa, então vou resumir. Obrigada por me mostrar que amizade é apoio, leveza e parceria. Desde o início da graduação estivemos juntas, e, neste momento, enquanto finalizamos nossos TCCs em ligação, só consigo agradecer por cada conselho, incentivo e por sempre estar ao meu lado. Espero continuar retribuindo tudo isso ao longo da vida.

Ao meu namorado, Giuliano Cesar Ferreira, que, mesmo chegando no final dessa jornada, rapidamente se tornou meu apoio, meu porto seguro e meu cantinho de paz. Obrigada por tornar os dias mais leves e por não me fazer duvidar nunca do amor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, por acreditar em mim desde o primeiro momento em que demonstrei interesse pela pesquisa. Obrigada por todos os

ensinamentos, pela confiança e por contribuir para minha formação acadêmica e pessoal. Tenho certeza de que posso sair do laboratório uma pessoa muito melhor do que entrei. Agradeço de coração mesmo!

Ao Raoni Siqueira, que foi como um pai para nossa pesquisa e nos ensinou praticamente tudo o que sabemos sobre a ciência e pesquisa, nós apenas desenvolvemos mais um pouco após sua saída. Espero que ainda venham muitas noites de sinuca pela frente.

Ao GBio, por terem me acolhido e por toda a paciência e ensinamentos durante essa trajetória. Também agradeço a todos os docentes do curso de Biotecnologia que fizeram parte da minha formação e contribuíram para minha visão de que ser professor é a escolha de profissão mais admirável que existe. Também as técnicas, Carla e Luciana, por apoiarem e não deixarem o laboratório pegar fogo.

Agradeço ao CNPq, à CAPES, à FAPEMIG e às demais instituições de fomento, pelo suporte financeiro fornecido para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço aos membros da banca examinadora, MSc. Gislaine Gonçalves Rocha e Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas pela disponibilidade em participar deste momento tão especial para mim. E a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas, pelo apoio e pela estrutura oferecida durante toda a minha graduação.

RESUMO

O Câncer de Mama é o tumor maligno mais comumente diagnosticado em mulheres em todo o mundo. Diferentes estratégias terapêuticas são adotadas, sendo que, para seu subtipo mais agressivo, o triplo-negativo, a quimioterapia permanece como principal conduta clínica. Contudo, a toxicidade das drogas utilizadas, a ativação de mecanismos de resistência e os índices de recidiva são preocupantes. Nesse cenário, a busca por novos compostos é premente e derivados da classe de benzotiazóis têm se destacado, modulando o estado redox e inflamatório das células. O presente estudo objetivou avaliar o efeito de nove compostos inéditos dessa classe em linhagens de CM, realizando ensaios de citotoxicidade, clonogenicidade, migração e qPCR. Foram cultivadas as linhagens humanas não tumorais HFF-1 (fibroblasto) e MCF 10A (mama) e as células tumorais MCF7 (CM luminal) e MDA-MB-231 (CM triplo-negativo). Apenas o composto **2** se mostrou ativo e seletivo, com $IC_{50} = 12,26 \mu M$ e índice de seletividade (IS) $> 2,0$. Ademais, inibiu significativamente a clonogenicidade e migração das células triplo-negativas, quando estas foram tratadas por 48 horas com $3,07 \mu M$ ($IC_{50/4}$) e $6,13 \mu M$ ($IC_{50/2}$) do composto **2**. Por fim, ensaios de qPCR evidenciaram que o composto modula os transcritos de *IL6*, *TGF β* , *KRT18* e *VIM*. Portanto, sugerimos que o composto **2** module o processo de transição epitélio-mesenquimal em células de CMTN, controlando, assim sua agressividade. Ensaios adicionais são necessários para a validação de outros alvos relacionados à EMT, incluindo em modelos animais.

Palavras-chave: Benzotiazol. Câncer de Mama. Citotoxicidade. Compostos orgânicos. Quimioterapia

ABSTRACT

Breast cancer is the most commonly diagnosed malignant tumor among women worldwide. Different therapeutic strategies are employed, and for its most aggressive subtype, triple-negative breast cancer (TNBC), chemotherapy remains the main clinical approach. However, the toxicity of the drugs used, the activation of resistance mechanisms, and recurrence rates remain major concerns. In this context, the search for new compounds is urgent, and benzothiazole-derived compounds have stood out due to their ability to modulate the redox and inflammatory status of cells. The present study aimed to evaluate the effects of nine novel compounds from this class in BC cell lines through cytotoxicity, clonogenicity, migration, and qPCR assays. Human non-tumoral cell lines HFF-1 (fibroblast) and MCF 10A (breast), as well as the tumor cell lines MCF7 (luminal BC) and MDA-MB-231 (triple-negative BC), were cultured. Among the tested compounds, only compound 2 showed activity and selectivity, with an $IC_{50} = 12.26 \mu M$ and a selectivity index (SI) > 2.0 . In addition, it significantly inhibited the clonogenicity and migration of triple-negative cells after 48 hours of treatment with $3.07 \mu M$ ($IC_{50/4}$) and $6.13 \mu M$ ($IC_{50/2}$) of 2. Finally, qPCR assays demonstrated that the compound 2 modulates the transcripts of IL6, TGF β , KRT18, and VIM. Therefore, we suggest that compound 2 modulates the epithelial–mesenchymal transition process in TNBC cells, thereby controlling their aggressiveness. Additional studies are required to validate other EMT-related targets, including animal models.

Keywords: Benzothiazole; Breast cancer; Cytotoxicity; Organic compounds; Chemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRALE: Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia
ATCC: *American type culture collection*
BRCA1: *Breast Cancer gene 1*
BRCA2: *Breast Cancer gene 2*
CDK: *Cyclin-Dependent Kinase*
cDNA: *complementary DNA*
CM: Câncer de mama
CMTN: Câncer de mama triplo-negativo
DMSO: dimetilsulfóxido
EGFR: *Epidermal growth factor receptor*
EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition*
HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*
HER2E: *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 enriched*
IA: Inteligência Artificial
IL1 β : *Interleukin 1 beta*
IL4: *Interleukin 4*
IL6: *Interleukin 6*
TGF β : *Transforming Growth Factor beta*
Ki-67:
KRT18: *Cytokeratin 18*
VIM: *Vimentin*
CDH1: *E-cadherin*
B2M: *Beta-2 microglobulin*
INCA: Instituto Nacional Câncer
IS: Índice de Seletividade
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NSM: *Nipple-sparing mastectomy*
NST: Carcinoma invasivo de tipo não especial
OMS: Organização Mundial da Saúde
PARP: Poli(ADP-ribose)polimerase
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
pCR: *Pathological complete response*
PD-1: *Programmed cell death protein 1*
PD-L1: *Programmed cell death ligand 1*
qPCR: *Quantitative PCR*
RE: Receptores de estrogênio
RP: Receptores de progesterona
SAR: *Structure-Activity Relationship*
SERD: *Selective Estrogen Receptor Degradar*
SERM: *Selective Estrogen Receptor Modulators*
SSM: *Skin-sparing mastectomy*
SUS: Sistema Único de Saúde
TBE: Tris-Borato-EDTA
TN: Triplo-negativo
TP53: *Tumor protein p53*
VEGFR-2: *Vascular endothelial growth factor receptor 2*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de representação multidimensional dos tumores proposto por Hanahan.....	12
Figura 2: Representação da anatomia da mama.....	14
Figura 3: Representação da estrutura química do benzotiazol.....	22
Figura 4: Efeito de nove compostos derivados de benzotiazol sobre a viabilidade das células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento.....	28
Figura 5: Curvas dose-resposta de diferentes linhagens celulares tratadas com composto 2 nas concentrações 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M por 48 horas.....	29
Figura 6: Efeito do composto 2 na formação de colônias na linhagem MDA-MB-231.....	30
Figura 7: Ensaio de migração celular (<i>wound healing</i>) em células MDA-MB-231.....	31
Figura 8: Quantificação relativa dos transcritos de diferentes genes da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com composto 2 por 48 horas.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Câncer: aspectos gerais e epidemiológicos.....	11
1.2 Câncer de Mama	14
1.3 Diagnóstico e classificação	16
1.4 Tratamento	18
1.5 Tratamento de tumores TN	20
1.6 Derivados de benzotiazóis	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Compostos derivados de benzotiazol.....	24
3.2 Cultivo celular.....	24
3.3 Ensaio de MTT	24
3.4 Ensaio de Formação de Colônias	25
3.5 Ensaio de Migração Celular por <i>wound healing</i>	26
3.6 Ensaio de qPCR	26
3.7 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Citotoxicidade dos compostos derivados de benzotiazol.....	28
4.2 Clonogenicidade	30
4.3 Migração horizontal	31
4.4 Quantificação de transcritos.....	32
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: aspectos gerais e epidemiológicos

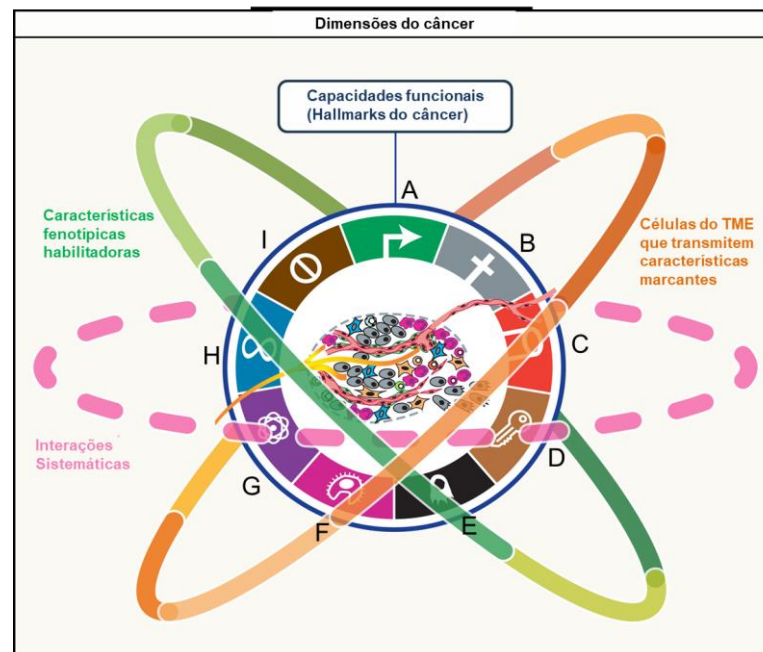
O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células alteradas, sendo estas capazes de atingir tecidos adjacentes e distantes, comprometendo seu funcionamento (Nurmik, . et al., 2020). A divisão celular, ou mitose, é um processo natural que consiste na divisão de uma célula em duas iguais envolvendo diferentes etapas como a condensação do material genético, migração dos cromossomos para a região equatorial da célula, divisão das cromátides irmãs e seu deslocamento para polos opostos e, finalmente, a separação dos citoplasmas (Serrano-del Valle et al., 2021). É um evento extremamente regulado, principalmente, por ciclinas dependentes de quinases (CDK) de modo que diferentes pontos de checagem garantem a integridade do processo e das novas células formadas (Wang., 2021). Nesse contexto, a tumorigênese acontece a partir de mutações ou alterações nas sequências dos principais genes controladores de ciclo celular: os supressores tumorais e os proto-oncogenes. Os supressores tumorais são inibidores de ciclo e, portanto, impedem o surgimento da doença. O gene *TP53* (do inglês, *Tumor Protein p53*) é um dos mais importantes e amplamente estudados. Já os proto-oncogenes, quando mutados, tornam-se oncogenes e estimulam a divisão mitótica, gerando clones de células transformadas (Croce, 2008).

Para auxiliar na compreensão da biologia tumoral, seu desenvolvimento e/ou progressão, Hanahan descreveu diferentes características, ou *hallmarks* do câncer (Figura 1), destacando: a autossuficiência para sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição, invasão tecidual e metástase, potencial replicativo ilimitado, evasão da apoptose, desregulação energética, escape da resposta imune, instabilidade genômica, inflamação e angiogênese sustentada. Posteriormente, foram incluídos: (i) a plasticidade fenotípica, ou seja, a capacidade de impedir o estado de diferenciação terminal celular, restabelecendo um estado progenitor; (ii) a reprogramação epigenética não mutacional, a qual modula o funcionamento molecular e contribui para o desenvolvimento de um microambiente instável; (iii) a senescência celular, em que moléculas sinalizam paracrinamente sustentando o tumor; e (iv) os microbiomas polimórficos, de modo que a microbiota auxilia ou interfere em vias metabólicas, mimetizando sinais extracelulares de proliferação e estimulando a doença (Hanahan, 2022; Hanahan; Weinberg, 2000).

Em uma recente atualização, Hanahan propôs uma organização multidimensional composta por quatro eixos integrados: (i) capacidades funcionais adquiridas pelas células tumorais, descritas inicialmente (ii) características fenotípicas capacitadoras, que possibilitam a evolução e progressão do tumor, como instabilidade genômica, inflamação promotora de tumor, reprogramação epigenética não mutacional, senescência celular e microbiomas polimórficos; (iii) células normais do microambiente tumoral, que são reprogramadas pelo tumor para sustentar sua progressão, incluindo fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e adipócitos; e (iv) interações sistêmicas, reconhecendo que fatores como obesidade, envelhecimento e inflamação crônica podem influenciar diretamente na progressão do câncer. Essa nova organização evidencia a importância de uma visão mais integrada com diversas camadas biológicas, não apenas considerando as alterações intrínsecas das células neoplásicas. Dessa forma, o câncer é compreendido como uma doença multifatorial dinâmica (Hanahan, 2026).

Figura 1: Modelo de representação multidimensional dos tumores proposto por Hanahan.

Destacam-se as capacidades funcionais, ou *hallmarks*; características fenotípicas habilitadoras, células do microambiente tumoral e interações sistêmicas. Encontram-se representadas as capacidades funcionais: (A) Sustentabilidade da sinalização proliferativa, (B) resistência a morte celular, (C) indução a angiogênese, (D) desbloqueio da plasticidade fenotípica, (E) capacidade de invasão e metástase, (F) evasão do sistema imune, (G) desregulação do metabolismo celular, (H) imortalidade replicativa celular, (I) evasão de supressores de crescimento.



Fonte: Adaptado de Hanahan, 2026

Os cânceres são nomeados conforme as células originalmente afetadas, sendo que, quando acometem células epiteliais, são denominados carcinomas e, em tecidos conjuntivos, são conhecidos como sarcomas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2022; INSTITUTO ONCOGUIA - ONCOGUIA, 2022). Trata-se de um problema de saúde pública com casos registrados em todo o mundo, de modo que esses números permitem estabelecer correlações com os aspectos econômicos e sociais como prevalência por países/regiões, índice de desenvolvimento humano e acesso a sistemas de saúde (Li et al., 2024). Em 2022, o câncer atingiu mais de 18,7 milhões de indivíduos (com exceção de pele não melanoma). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer de mama (CM) é o mais incidente entre mulheres (exceto câncer de pele não melanoma), com aproximadamente 2,3 milhões de casos anuais, sendo responsável por cerca de 670 mil óbitos. O câncer de próstata é o mais comumente diagnosticado entre os homens, com aproximadamente 1,4 milhões de casos anuais, responsável por cerca de 375 mil óbitos (WHO, 2025).

No Brasil, estima-se a ocorrência de cerca de 781 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio de 2026 a 2028. O CM é o mais incidente no país (exceto o câncer de pele não melanoma) com cerca de 78.610 casos para cada ano do triênio de 2026 a 2028, com risco de 71,57 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA,2025). Ainda no território brasileiro, na região Sudeste, o CM lidera o maior risco estimado com cerca de 88,29/ 100 mil mulheres, seguido da região Sul, com 77,91/ 100 mil mulheres. Essas regiões são detentoras dos maiores índices de desenvolvimento humano do país (INCA,2025).

Com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), na década de 90, todo o atendimento do paciente diagnosticado com câncer no Brasil é disponibilizado de forma gratuita por hospitais distribuídos por todas as regiões. Esse órgão adota medidas e políticas importantes na área da oncologia, como ações de promoção da saúde, prevenção, monitoramento, avaliação e cuidado integral (BRASIL, 2013). No estudo *“Quanto custa o câncer”* realizado pela Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (ABRALE), foi evidenciado que as despesas públicas diretas com o tratamento do câncer no Brasil, em 2022, alcançaram aproximadamente R\$ 3,9 bilhões, incluindo assistência hospitalar e ambulatorial. Nesse mesmo período, os valores médios destinados aos procedimentos oncológicos, como a quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, aumentaram de cerca de R\$ 305,15 para R\$ 758,93 por procedimento entre 2019 e 2022, representando um crescimento de mais de 400 % em relação aos valores de 2018 (comparados com R\$ 151,33) (ABRALE, 2023; Observatório de Oncologia, 2024).

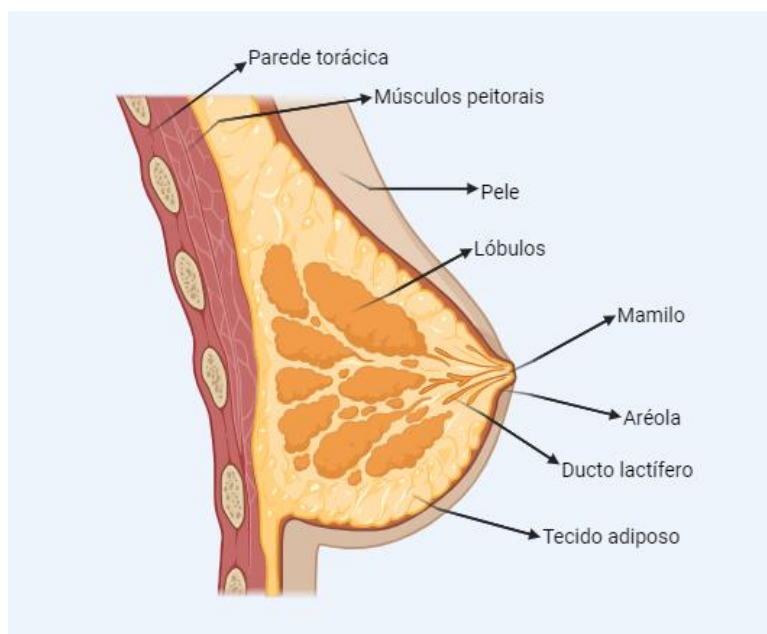
Assim, os dados epidemiológicos refletem a gravidade do cenário do câncer no Brasil e no mundo, sendo o CM altamente incidente e responsável por um número expressivo de mortes

(WHO, 2025). Portanto, compreender essa doença é imprescindível para que, assim, sejam desenvolvidas estratégias de diagnóstico mais assertivo e de tratamento eficaz, de modo que a qualidade de vida e bem-estar dos pacientes sejam prioritários em termos de políticas públicas e pesquisas científicas.

1.2 Câncer de Mama

O CM é uma neoplasia que se origina em células que compõem o tecido mamário, podendo acometer ductos lactíferos e lóbulos (Xiong et al., 2025). Histologicamente, a mama é composta por três principais tipos de tecido: o glandular, adiposo e conjuntivo (fibroso), sendo o adiposo responsável por constituir o maior volume do órgão e conformação. O parênquima glandular é organizado a partir da disposição radial de cerca de 15 a 20 lobos em direção a auréola, região que apresenta glândulas especializadas para proteção e lubrificação. Os lobos podem ser divididos em lóbulos portadores unidades secretoras responsáveis pela produção de leite, as quais se conectam por meio dos ductos lactíferos que convergem ao mamilo para a ejeção do leite no período de lactação. A mama é revestida em pele, sustentada por músculos peitorais (Figura 2) (Khan; Fakoya; Sajjad, 2025).

Figura 2: Representação da anatomia da mama. Destacam-se a parede torácica, músculos peitorais, pele, lóbulos, mamilo, aréola, ducto lactífero e tecido adiposo, principais componentes para a estruturação e fisiologia da mama



Fonte: próprio autor

O número de casos de CM varia entre continentes e países, destacando-se a Argentina - América do Sul, os Estados Unidos - América do Norte, a França - Europa, a Austrália - Oceania, a Argélia - África e Israel - Ásia. A América do Norte, como um todo, lidera o *ranking*, com a maior incidência da doença (95,9 a cada 100.000 indivíduos) seguido pela Oceania, com 91,5 a cada 100.000 indivíduos. Já na Ásia e África, os dados revelam 34,5 e 40,3 casos a cada 100.000 pessoas, respectivamente. (WHO, 2023). A África apresenta números inferiores devido à carência nos registros oncológicos, uma vez que os subsídios do governo são limitados e priorizados para a prevenção e tratamento de doenças transmissíveis (Anyigba; Awandare; Paemka, 2021).

Muitos fatores de risco para o CM são conhecidos e merecem destaque. O primeiro a ser citado é a idade. De fato, com o tempo, há um comprometimento da eficiência das funções celulares, principalmente do sistema imune, o que promove um ambiente favorável ao surgimento de tumores (López-otín et al., 2013). Mutações genéticas herdadas também são importantes, especialmente nos genes *BRCA1* (do inglês, *Breast Cancer gene 1*) e *BRCA2* (do inglês, *Breast Cancer gene 2*) (NCI, 2020) em que ambos exercem função de reparo no DNA. (NCI, 2020; Yoshida; Miki, 2004). Em termos numéricos, indivíduos portadores de mutações em *BRCA1*, sem a influência de fatores externos, possuem uma chance entre 55-72% de desenvolver o câncer até 70 anos de idade. Para o *BRCA2*, as chances são de 45-69%. Portanto, o histórico familiar impacta diretamente no surgimento da doença, principalmente quando parentes de primeiro grau são afetados com CM e ovário antes dos 50 anos (Kuchenbaecker et al., 2017; Silva; Riul, 2011).

Aspectos hormonais precisam ser considerados. A menarca determina o início da produção de hormônios pelos ovários, sendo um evento notado entre 11 e 14 anos. Sua precocidade adianta os impactos do estrogênio nos tecidos femininos, especialmente mamários (Dall; Britt, 2017). Nesse contexto, a menopausa tardia também é um fator de risco, ampliando o tempo de multiplicação das células promovida por hormônios, o que também pode comprometer a renovação de células saudáveis (Breyer et al., 2018; Silva; Riul, 2011).

Ademais, além dos fatores não-modificáveis descritos acima, existem aspectos modificáveis importantes, sendo estes relacionados aos hábitos de vida do indivíduo como prática de atividades físicas, alimentação, consumo de bebidas alcoólicas e o fumo. É notório que a prática regular de exercícios físicos diminui o risco de surgimento de tumores, inclusive em pessoas com histórico familiar, pois fortalece o sistema imune e regula os níveis de hormônios (Cohen et al., 2023). Alimentos ultraprocessados, ricos em açúcares, gorduras saturadas e aditivos, aumentam em 2,25 a chance do desenvolvimento de CM (Chen et al.,

2020). O álcool, por sua vez, além de mutagênico, causa um desequilíbrio nos níveis de estrogênio, contribuindo para o surgimento da doença (Łukasiewicz et al., 2021). Já os carcinógenos encontrados no tabaco causam mutações, principalmente em *TP53*. Além disso, gestantes que fumam tem a maior chance de prejudicar a formação do bebê, além de induzirem mutações, principalmente nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Jones et al., 2017).

1.3 Diagnóstico e classificação

Com o avanço do crescimento populacional e desenvolvimento econômico, as técnicas para o diagnóstico de tumores também foram aprimoradas, viabilizando uma maior precocidade e menor invasividade (Merino Bonilla; Torres Tabanera; Ros Mendoza, 2017). A mamografia, implementada há mais de 30 anos, é um exame baseado na análise de imagens obtidas por radiação. Nos últimos 5 anos, com o avanço da Inteligência Artificial (IA), softwares vêm sendo desenvolvidos para aprender e analisar essas imagens, identificando, de forma mais precisa, a presença de lesões malignas. Contudo, a confirmação diagnóstica permanece sendo realizada por meio da biópsia com agulha e análise histológica do tecido (Sechopoulos; Teuwen; Mann, 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o CM pode ser classificado em 21 subtipos com base no crescimento, morfologia e padrões de arquitetura celular. Histologicamente, o mais comum é o carcinoma invasivo de tipo não especial (NST), ou seja, sem características peculiares, acometendo os ductos mamários. Já o carcinoma lobular invasivo atinge os lóbulos e contabiliza até 15% de todos os casos de CM no mundo (McCart Reed et al., 2021). Essa classificação tem valor prognóstico, direcionando a prática clínica (Zhang et al., 2024).

Os tumores também são estadiados considerando seu tamanho (T), envolvimento nodal (N) e presença de metástase (M) (Tabela 1) (Da luz; Araújo; De Araújo, 2022). No estágio 0 as células transformadas estão localizadas, sem envolvimento de gânglios linfáticos, sem metástase e com microcalcificações nos ductos. Já os estágios I, IIa e IIb são estabelecidos como invasivos precoces, não apresentam metástase e, com lesões menores de 2 centímetros de diâmetro para estágio I e de 2 a 5 cm ou maiores para os estágios II. Ainda, os estágios I e IIa podem apresentar ou não o envolvimento de gânglios linfáticos, enquanto no estágio IIb os gânglios estão comprometidos. Já no estágio III, o tumor se espalha pelas proximidades, como a pele, mas não invade órgãos distantes. Possuem mais do que 5 centímetros de diâmetro, envolvimento nodal, principalmente nas axilas. Para o estágio IV, o estágio mais avançado da

doença, a metástase é a principal característica, com gânglios linfáticos comprometidos, sendo tratado, em geral, com cuidados paliativos para melhorar a qualidade de vida do paciente (Teichgraeber; Guirguis; Whitman, 2021). É importante detalhar que cada uma das características não pode ser analisada de forma individual e deve ser observada pela combinação das três características do TNM.

Tabela 1: Classificação dos estágios do câncer segundo o sistema TNM. T: tamanho tumoral, N: comprometimento linfonodal e M: presença de metástase.

Estágio	Características	Tamanho do Tumor (T)	Envolvimento Nodal (N)	Presença de Metástase (M)
Estágio 0	Células transformadas restritas aos ductos; presença de microcalcificações	Não invasivo	Não	Não
Estágio I	Tumor invasivo precoce	Menor que 2cm	Pode haver ou não	Não
Estágio IIa	Tumor invasivo precoce	Até 5 cm ou maior (dependente de TNM)	Pode haver ou não	Não
Estágio IIb	Tumor invasivo precoce com comprometimento dos gânglios	Entre 2 e 5 cm ou maior	Sim	Não
Estágio III	Tumor avançado localmente	Maior que 5 cm	Sim, principalmente nas axilas	Não
Estágio IV	Disseminação sistêmica da doença	Variável	Sim	Sim

Fonte: próprio autor

Atualmente, o estadiamento do CM também considera sua classificação molecular, aumentando sua eficácia em prever o curso da doença (Jang et al., 2024) Para isso, são consideradas as expressões de receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), do receptor tipo 2 de fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e os níveis de Ki-67 (marcador de proliferação celular). Sendo assim, são estabelecidos quatro subtipos principais: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido (HER2+) e triplo-negativo (TN). O luminal A expressa receptores RE e/ou RP, porém são negativos para HER2 com baixos níveis de Ki-67

(<14%). Representa de 40-50% dos casos e, em termos clínicos, esse subtipo apresenta uma maior taxa de sobrevida e melhor prognóstico, com crescimento lento em comparação aos outros subtipos. O luminal B representa cerca de 10-20% dos tumores de mama, expressa RE e/ou RP, e apresentam maior potencial proliferativo, com Ki-67 > 14% (Zhang et al., 2021). Além disso, podem ser positivos para HER2, sendo assim denominado luminal híbrido ou luminal-HER2 (Łukasiewicz et al., 2021). Quando híbrido, apresenta um pior prognóstico e uma menor taxa de sobrevida entre os luminais, com proliferação mais agressiva. O HER2+ (15-25% dos casos) expressa apenas HER2, não apresentando RE e RP (Smolarz et al., 2022; Orrantia-Borunda et al., 2022). Por fim, os TNs não expressam nenhum dos três receptores, sendo um subtipo molecular altamente heterogêneo e desafiador (SØRLIE et al., 2001).

1.4 Tratamento

As principais estratégias de tratamento do CM incluem cirurgia (mastectomia), radioterapia, hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia. A mastectomia envolve a remoção total ou parcial da mama comprometida. Foi realizada primeiramente no século XIX por William Halsted, uma vez que se acreditava que os tumores fossem essencialmente localizados (Ben-Dror et al., 2022). A mastectomia radical consiste na retirada completa do órgão, com a dissecação dos linfonodos responsáveis por drenar a região (Senoga et al., 2023). A mastectomia conservadora, por sua vez, pode ser dividida em preservadora de pele (*skin-sparing mastectomy*, SSM) e preservadora o complexo aréolo-mamilar (*nipple-sparing mastectomy*, NSM). Na SSM grande parte da pele é mantida para a reconstrução de forma imediata. Na NSM, o complexo aréolo-mamilar também é preservado para melhor resultados estéticos sem a afetar a segurança do paciente (Zaborowski et al., 2023).

A radioterapia utiliza raios X para destruir as células transformadas. É localizada e pode ou não ser combinada à cirurgia (EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group), 2014). A radiação adjuvante é conduzida após a cirurgia, sendo contraindicada apenas em casos de irradiação prévia da parede torácica, gravidez no momento do tratamento e presença de distúrbios vasculares. Assim, é administrada para eliminar a doença residual, diminuindo o risco de recorrência local e contribuindo para melhora da sobrevida (Dufton, 2024).

Sistemicamente, são utilizadas a hormonioterapia, a terapia alvo, a imunoterapia e a quimioterapia. A terapia hormonal é indicada para pacientes com tumores que expressam receptores hormonais. São adotados, para isso, moduladores seletivos dos receptores de

estrogênio (SERMs) como tamoxifeno, compostos que degradam seletivamente os receptores de estrogênio (SERDs) como fulvestranto e ainda inibidores de aromatase como anastrozol, reduzindo a síntese de estrogênio (Will et al., 2023).

A terapia alvo, considerada o futuro da oncologia, utiliza anticorpos ou inibidores sintéticos, alvejando moléculas específicas (Fisusi & Akala, 2019). O anticorpo monoclonal trastuzumabe, por exemplo, bloqueia HER2, sendo administrado em indivíduos que superexpressam esse receptor (HER2+ e luminal-híbrido) (Swain et al., 2023). Inibidores de PARP (poli (ADP-ribose) polimerase) como Olaparibe e Talazoparibe vêm sendo amplamente adotados no tratamento do CM, recomendados quando os pacientes que apresentam mutações germinativas nos genes *BRCA1/BRCA2*. As enzimas PARP são responsáveis pelo reparo de danos causados à fita de DNA. Com o seu bloqueio, há um acúmulo de danos genômicos que são ainda mais expressivos quando os genes *BRCA*, supressores tumorais, encontram-se mutados. Por conseguinte, diante de tantas alterações acumuladas no DNA, especialmente de células transformadas, vias de morte celular são ativadas, eliminando o tumor (Cortesi et al., 2021).

A imunoterapia, por sua vez, objetiva modular diretamente o sistema imune do paciente. Um dos eixos mais explorado é o PD-1/PD-L1. A proteína de morte celular programada 1 (PD-1) é uma proteína transmembrana capaz de inibir respostas imune adaptativas e inatas. Encontra-se expressa em linfócitos T ativados, *natural killers* e macrófagos. Já o ligante de PD-1 (PD-L1) é uma glicoproteína transmembrana superexpressa em células tumorais e no microambiente tumoral. A interação de PD-1 e PD-L1 resulta na inibição da ativação dos linfócitos T, permitindo a evasão tumoral. Assim, os inibidores de ligação PD-1/PD-L1 resultam na restauração da ativação de linfócitos T, viabilizando a ação citotóxica dessas células contra o tumor, controlando a progressão da doença (Salmaninejad et al., 2019).

Finalmente, a quimioterapia utiliza agentes citotóxicos para destruir as células tumorais circulantes. Pode ser empregada em regime neoadjuvante ou adjuvante, ou seja, antes ou após a cirurgia, respectivamente. Na prática neoadjuvante, visa diminuir o tamanho do tumor, para que a cirurgia tenha maior eficácia, além de tornar um tumor inoperável em operável (Y. Chen et al., 2023). Na adjuvante, os compostos previnem a recorrência eliminando células cancerosas remanescentes. Sua eficácia é determinada pela reposta patológica completa (pCR), que indica se ainda há indícios da presença de células tumorais (Harbeck, 2022) (Gonzalez-Angulo et al., 2007).

Apesar da quimioterapia ter sido a primeira estratégia de tratamento para o câncer, com pesquisas e uso do gás mostarda na Segunda Guerra Mundial, a célula tumoral pode escapar da

ação dos agentes químicos ao desregular, por exemplo, vias apoptóticas. Além disso, células cancerosas ativam bombas de efluxo de fármacos, além de serem capazes de reparar danos do DNA e alterar o metabolismo celular (Tilsed et al., 2022). A quimioterapia é uma das principais estratégias para o tratamento do CMTN, já que este carece de receptores específicos. Diferentes regimes são adotados, contudo, a sobrevida das pacientes permanece reduzida, o que tem exigido a descoberta e o desenvolvimento de novos compostos.

1.5 Tratamento de tumores TN

Tratar o CMTN é um desafio diante de sua agressividade, com metástases frequentes que comprometem pulmão, fígado e ossos, principalmente (Vagia et al., 2020). Seu tratamento ainda é limitado, principalmente, a radioterapia e quimioterapia. Contudo, a terapia-alvo tem ganhado destaque, mesmo que restrita a subgrupos específicos de pacientes.

No CMTN, a radioterapia é comumente aplicada após a cirurgia e, embora contribua para a redução do risco de recidiva e para o aumento da sobrevida dos pacientes, os fatores clínicos e cirúrgicos são determinantes na resposta terapêutica, evidenciando a importância de um planejamento individualizado (Bessa; Marta, 2022). Ademais, a resistência das células tumorais à radiação ionizante também acontece, o que tem impulsionado a busca por estratégias de radiosensibilização. Essa resistência pode estar associada a diferentes mecanismos biológicos, como a superexpressão de genes envolvidos no reparo do DNA, a ativação de vias relacionadas à proliferação celular e à sobrevivência tumoral, bem como à presença de subpopulações celulares mais resistentes ao tratamento. Assim, a identificação desses mecanismos moleculares tem sido fundamental para o desenvolvimento de terapias combinadas capazes de potencializar os efeitos da radiação e melhorar o controle da doença (Wang, Y et al., 2025).

A terapia-alvo também vem sendo adotada. Para os tumores TN que expressam receptor de andrógeno, inibidores vêm sendo utilizados como acetato de abiraterona em combinação com prednisona e enzalutamida (Maqbool et al., 2022) (Traina et al., 2018). Já inibidores de PARP constituem uma abordagem promissora. Os fármacos dessa categoria têm melhorado, inclusive, a sobrevida dos pacientes. Entretanto, se restringe apenas àqueles com mutação nos genes *BRCA*, não sendo, portanto, elegível a todos os casos. Ainda, o desenvolvimento de resistência é uma realidade (Bi et al., 2024).

Quando células tumorais TNs expressam proteínas que escapam da vigilância do sistema imune, como PD-1 e PD-L1, são tratados com anticorpos monoclonais, como

pembrolizumabe, nivolumabe, atezolizumbe e avelumabe, que visam restabelecer a resposta imune. Novamente, é uma terapia associada à expressão dessas proteínas. Ademais, efeitos adversos como inflamações sistêmicas e toxicidade em órgãos como fígado, impedem sua ampla aplicabilidade. Desse modo, é necessário traçar um perfil biomolecular do paciente para que a eficácia esperada seja atingida o que dificulta sua ampla aplicação (Katz & Alsharedi, 2018)

Portanto, a quimioterapia permanece como o principal tratamento, sendo as antraciclina e taxanos amplamente utilizados. As antraciclina, como Doxorubicina, Epirubicina e Daunorubicina, atuam intercalando no DNA, inibindo a topoisomerase e, por conseguinte, a replicação celular (Katz & Alsharedi, 2018). Além disso, possuem a capacidade de aumentar a sensibilidade das células tumorais à citotoxicidade de células imunes, potencializando sua ação (Hussen, 2023). Os efeitos adversos incluem toxicidade cardíaca cumulativa, alopecia, náuseas e vômitos (O'Reilly et al., 2021). Os taxanos, por sua vez, estabilizam o fuso mitótico induzindo a apoptose, destacando-se cabazitaxel, docetaxel e paclitaxel, porém podem causar neuropatia periférica, mielossupressão, fadiga e reações de hipersensibilidade, limitando sua adesão ao tratamento (Catalano et al., 2022)

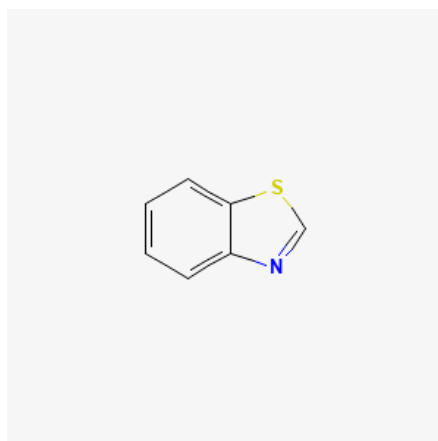
A resistência à quimioterapia é amplamente descrita, principalmente no CMTN. A pCR, definida como a ausência da doença na mama e nos linfonodos regionais está diretamente relacionada à sobrevida livre de doença e sobrevida global. No CMTN a heterogeneidade, a agressividade relacionada a alta taxa de proliferação, bem como a ausência de alvos moleculares estabelecidos, limitam as opções de tratamentos terapêuticos e contribuem para um pior prognóstico quando comparado a outros subtipos de CM. Dessa forma, novas moléculas promissoras tornam-se essenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos de efeito antitumorais. Nesse contexto, os derivados de benzotiazol vêm sendo amplamente estudados como possíveis protótipos para o tratamento dessa doença.

1.6 Derivados de benzotiazóis

Benzotiazóis (Figura 3) são uma classe de compostos heterocíclicos aromáticos estruturados pela fusão de um anel benzênico e um anel tiazol, contendo átomos de nitrogênio e enxofre na estrutura. Devido à sua relativa simplicidade estrutural e à presença de heteroátomos de nitrogênio e enxofre, esses compostos possuem uma alta reatividade química, favorecendo reações moleculares de interesse em fármacos (Keri et al., 2015). Os agentes benzotiazólicos podem ser encontrados em diversos compostos naturais, tanto marinhos quanto

terrestres, além de serem sintetizados quimicamente. Sua aplicabilidade tem sido associada à regulação de crescimento vegetal, fluorescência e inibição enzimática. Ademais, os benzotiazóis possuem um alto potencial biológico com propriedades antifúngicas, antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias já relatadas (Gao et al., 2020).

Figura 3: Representação da estrutura química do benzotiazol.



Fonte: PubChem National Library of Medicine (NCBI)

No contexto do CM, principalmente do CMTN, os efeitos dos compostos benzotiazólicos estão diretamente relacionados às modificações estruturais de seus derivados. Nesse sentido, compostos derivados de benzotiazol têm apresentado efeitos citotóxicos, antiproliferativos e pró-apoptóticos em estudos pré-clínicos, incluindo em células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (Shama.A et al, 2025). Atuam, principalmente, inibindo tirosina quinases, como EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) e VEGFR-2 (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), e interferindo, assim, em vias essenciais para a proliferação e sobrevivência tumorais (Huang, G et al., 2023). Em compostos fluorados, por exemplo, estudos indicam que esses derivados são metabolizados pela enzima do citocromo P450 CYP1A1, cuja expressão é induzida após a exposição ao fármaco. O processo conduz à formação de metabólitos reativos capazes de se ligar ao DNA, majoritariamente de células tumorais, inibindo sua proliferação (Kumbhare et al., 2012).

Compostos benzotiazólicos também podem ser combinados a moléculas com atividades já conhecidas, em um processo denominado hibridização. Chidella *et al.* (2025) demonstraram o potencial de derivados contendo um núcleo benzotiazólico associados com grupos sulfonamida em diferentes linhagens celulares, incluindo de CM. No estudo de Altwaijry *et al.* (2025), o núcleo benzotiazol foi associado a carbohidrazida e grupo sulfonato, atuando sobre células de câncer de próstata, cólon e mama. Portanto, os derivados de benzotiazóis têm sido

amplamente explorados como candidatos para o desenvolvimento de novas estratégias para terapia oncológica. A derivação e hibridização dos compostos benzotiazólicos, utilizando grupos que aprimoram a ligação do agente ao alvo e/ou potencializam seu efeito através de caminhos moleculares seletivos, têm se demonstrando promissoras, contribuindo para o controle de tumores agressivos, como o CMTN.

Considerando elevada agressividade do CMTN, dificuldade em tratamentos convencionais e evidências do potencial antitumoral de derivados de benzotiazol em diferentes modelos tumorais, faz-se necessário o estudo dos efeitos dessa classe de compostos em células de CMTN, com o objetivo de ampliar perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de derivados de benzotiazol em células mamárias, em especial nas representativas do CMTN.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade, através do teste de MTT, de nove compostos derivados de benzotiazol em células tumorais e não tumorais mamárias.
- Determinar a seletividade do(s) composto(s) com os menores valores de concentração inibitória média (IC₅₀)
- Avaliar a capacidade do(s) composto(s) selecionado(s) em inibir a clonogenicidade e a migração de células de CMTN.
- Quantificar os transcritos de *IL1 β* , *IL4*, *IL6*, *VIM*, *CDH1*, *TGF β 1* e *KRT18* em células de CMTN tratadas com o(s) composto(s), sugerindo as possíveis vias relacionados aos efeitos observados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Compostos derivados de benzotiazol

Para o presente estudo, foram utilizados nove compostos derivados de benzotiazol 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 cedidos como colaboração. Para o preparo de solução de 20 mM, os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração final de 0,6% (m/v) e, posteriormente, armazenados a -20°C, protegidos de luz.

3.2 Cultivo celular

As linhagens celulares humanas utilizadas neste estudo foram adquiridas do ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*) e mantidas em estufa com atmosfera úmida e a 37 °C (Forma Series 3 Water Jacketed, Thermo Scientific™). Fibroblastos (HFF-1) foram cultivados com o meio DMEM HG (Gibco®), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®). As células mamárias não-tumoral MCF 10A foram mantidas em DMEM F12 (Gibco®), suplementado com 10% de SFB (FBS, Gibco®), insulina (10 µg/mL, Gibco®), hidrocortisona (0,25 µg/mL, Sigma-Aldrich®) e fator de crescimento epidérmico (EGF, 10 ng/mL, Gibco®). Já as células tumorais mamárias MCF7 (luminal) e MDA-MB-231 (TN) foram cultivadas em RPMI-1640 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e Leibovitz's L-15 (Gibco®), respectivamente, e ambos os meios foram suplementados com 10% de SFB (FBS, Gibco®). A todos os meios foi adicionado 0,1% de antibiótico Gentamicina 50 ug/mL (Cultilab®). Somente a linhagem MDA-MB-231 não foi mantida em atmosfera de 5% CO₂.

3.3 Ensaio de MTT

A viabilidade das linhagens após tratamento com os nove compostos foi determinada utilizando o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) de acordo com Mosmann, (1983), com algumas modificações. Inicialmente, foi realizada uma triagem inicial apenas na linhagem de CMTN MDA-MB-231, para seleção dos mais promissores. Para isso,

$1,5 \times 10^4$ células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e tratadas com os nove compostos a 4 μM , 20 μM e 100 μM . Foram cultivadas células sem tratamento e tratadas com DMSO como controle negativo e controle do diluente, respectivamente. Após 48 horas, foi adicionada a solução de MTT na concentração final de 0,5 mg/mL, com uma incubação de 4 horas a 37°C, protegida da luz. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido, os cristais de formazan solubilizados em 200 μL de DMSO por poço com agitação por 10 minutos em Micropore Fast Shaker (Agimaxx). A absorbância foi, então, quantificada a 570 nm em leitora de microplacas (Multiskan FC Microplate Reader TM FC-Thermo Fisher Scientific®).

A viabilidade foi calculada conforme a seguinte fórmula: Viabilidade (%) = [(absorbância das células tratadas / absorbância das células controle) $\times$ 100]. Foi selecionado o composto **2**, uma vez que diminuiu a viabilidade das células de CMTN em pelo menos 50% em concentração $\leq 20 \mu\text{M}$.

O ensaio de MTT foi, então, realizado novamente nas células MDA-MB-231 e nas linhagens MCF7, MCF 10A e HFF-1, plaqueadas nas densidades $1,5 \times 10^4$ células/poço; 3×10^3 células/poço; $1,5 \times 10^4$ células/poço e 8×10^3 células/poço, respectivamente. Os compostos foram utilizados nas concentrações 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 μM e os tratamentos realizados por 48 horas sob as condições de cultivo previamente descritas. A concentração na qual se observou 50% de inibição (IC_{50}) foi determinada utilizando um ajuste de curva de regressão não linear com o software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA). O índice de seletividade (IS) foi calculado dividindo o valor de IC_{50} para a linhagem não tumoral pelo IC_{50} das linhagens tumorais, sendo considerados significantes valores de $\text{IS} > 2,0$ (Silva et al., 2023). Para os ensaios subsequentes, as células MDA-MB-231, representativas do CMTN foram utilizadas, uma vez que o composto **2** se mostrou mais ativo nessa linhagem.

3.4 Ensaio de Formação de Colônias

Para a análise da capacidade de uma célula isolada de sobreviver, proliferar indefinidamente e formar colônias após exposição a composto **2**, foi conduzido o ensaio clonogênico, descrito inicialmente por Franken et al., (2006), com adaptações. Células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 12 poços (500 células/poço) e tratadas com o composto **2** a 3,07 μM ($\text{IC}_{50/4}$) e 6,13 μM ($\text{IC}_{50/2}$). Após 48 horas, os meios dos poços foram retirados e substituídos por meio de cultura devidamente suplementado, mas sem qualquer tipo de tratamento. Decorridos 18 dias, com troca de meio a cada dois dias, as colônias foram lavadas

com tampão fosfato-salino (PBS) 1x, fixadas com formaldeído 37% (v/v) e metanol que auxiliou na desidratação para permeabilização das células e coradas com solução de cristal violeta a 0,5% (m/v), preparada em uma mistura de metanol:água (1:30). As imagens das colônias formadas foram capturadas em sistema iBright Imaging System (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA). Para análise quantitativa, as colônias foram solubilizadas em ácido acético a 33% (m/v), seguida da leitura da absorbância a 570 nm em leitor de microplacas Multiskan FC Microplate Reader™ (Thermo Fisher Scientific®). Os resultados foram calculados pela razão entre a absorbância do tratamento e a do controle, em suas devidas concentrações e multiplicadas por cem para obtenção da porcentagem da formação de colônias.

3.5 Ensaio de Migração Celular por *wound healing*

O ensaio *wound healing* foi realizado para quantificar o potencial de composto **2** em inibir a migração de células de CMTN fornecendo informações sobre reparo e capacidade metastática (Jonkman et al., 2014). Células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 12 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e mantidas a 37°C até atingirem a confluência de 80 a 90%. Em seguida, com uma ponteira estéril de 200 µL, foi inserido um arranhão retilíneo no centro do poço, formando uma área livre, de modo que células não aderidas foram lavadas com PBS 1x. Após esse procedimento, foram adicionados os tratamentos com composto **2** a 3,07 µM (IC_{50/4}) e 6,13 µM (IC_{50/2}) e imagens do comportamento celular foram capturadas nos tempos 0, 24 e 48 horas em microscópio invertido (EVOS XL Core Imaging System - Invitrogen®). A migração na área livre, estabelecida pela capacidade migratória das células, foi calculada utilizando o software ImageJ (versão 1.54g) e utilizando a fórmula: Migração das células (%) = [(Área Inicial – Área Final) / Área Inicial] × 100.

3.6 Ensaio de qPCR

Células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 6 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e tratadas com o composto **2** na concentração de 3,07 µM (IC_{50/4}) por 48 horas, sendo essa concentração escolhida para melhor avaliação dos efeitos moleculares sem possibilidade de alterações inespecíficas causadas por citotoxicidade. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®), conforme as recomendações do fabricante. A concentração e a

pureza do material extraído foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Fisher). A qualidade também foi avaliada em gel de agarose a 1,5%, corrido em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x por 1 hora a 100 volts e corado com GelRed 1x (Amersham).

A transcrição reversa, para síntese de cDNA, foi realizada a 37 °C por 1 hora, e preparada com Moloney Murine Leukemia Virus (Sigma Aldrich), seguindo o protocolo do fornecedor. As reações de qPCR foram realizadas utilizando o kit Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), com ciclagem 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 em equipamento StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). O gene β -2-microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência para o cálculo da expressão relativa determinada pelo método Cq comparativo. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos utilizados no ensaio de qPCR

Primer	Sequência (5' – 3')	Amplicon (pb)
<i>IL1</i> β	F: ACAGGATATGGAGCAACAAGTGG R: GGGCTTATCATCTTTCAACACGC	136
<i>IL4</i>	F: CACAGCAGTTCCACAGGCAC R: CCTTCACAGGACAGGAATTCAAG	99
<i>IL6</i>	F: GATTCCAAAGATGTAGCCGCCC R: ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC	246
<i>TGF</i> β 1	F: GTACCTGAACCCGTGTTGCTC R: CAGGAATTGTTGCTGTATTCTGG	107
<i>KRT18</i>	F: GCTCTGGGTTGACCGTGG R: GTGGTGCTCTCCTCAATCTGC	151
<i>VIM</i>	F: GAGACGCATTGTCAACATCCTG R: CAAGAACACCCGCACCAAC	356
<i>CDH1</i>	F: CTGCGCTCTGTAGGAAGGC R: GCTGGCTCAAGTCAAAGTCCTG	240
<i>B2M</i>	F: CCTGCCGTGTGAACCATGT R: CGGCATCTTCAAACCTCC	94

IL1 β (Interleucina 1 Beta), *IL4* (Interleucina 4), *IL6* (Interleucina 6), *TGF* β 1 (Fator de Crescimento Transformador Beta), *KRT18* (Citoqueratina 18), *VIM* (Vimentina), *CDH1* (E-caderina), *B2M* (Beta 2 microglobulina)

Fonte: próprio autor

3.7 Análise estatística

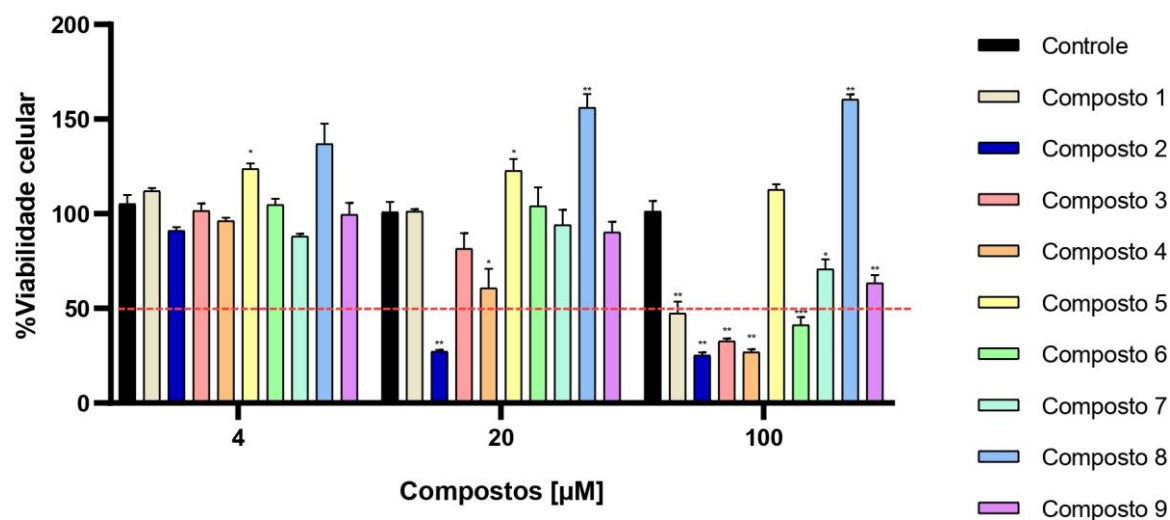
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os ensaios de MTT, clonogênico e migração celular foram analisados por one-way ANOVA, seguida dos testes post hoc de Dunnett ou Tukey, conforme apropriado. Para os dados de expressão gênica por qPCR, foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$), considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade dos compostos derivados de benzotiazol

A viabilidade das células MDA-MB-231 foi inicialmente avaliada pelo ensaio de MTT após tratamento, por 48 horas, com os nove compostos derivados de benzotiazol nas concentrações 4, 20 e 100 μM (Figura 4). Na menor concentração, nenhum composto reduziu significativamente a viabilidade quando comparado com o controle. Na concentração intermediária (20 μM), os compostos **2** e **4** diferiram do controle, diminuindo significativamente a viabilidade das células de CMTN. Contudo, apenas **2** reduziu em mais de 50%. Já na concentração de 100 μM , observou-se a citotoxicidade dos compostos ($> 50\%$), exceto para **5** e **8**, para os quais foi verificado um aumento da atividade metabólica.

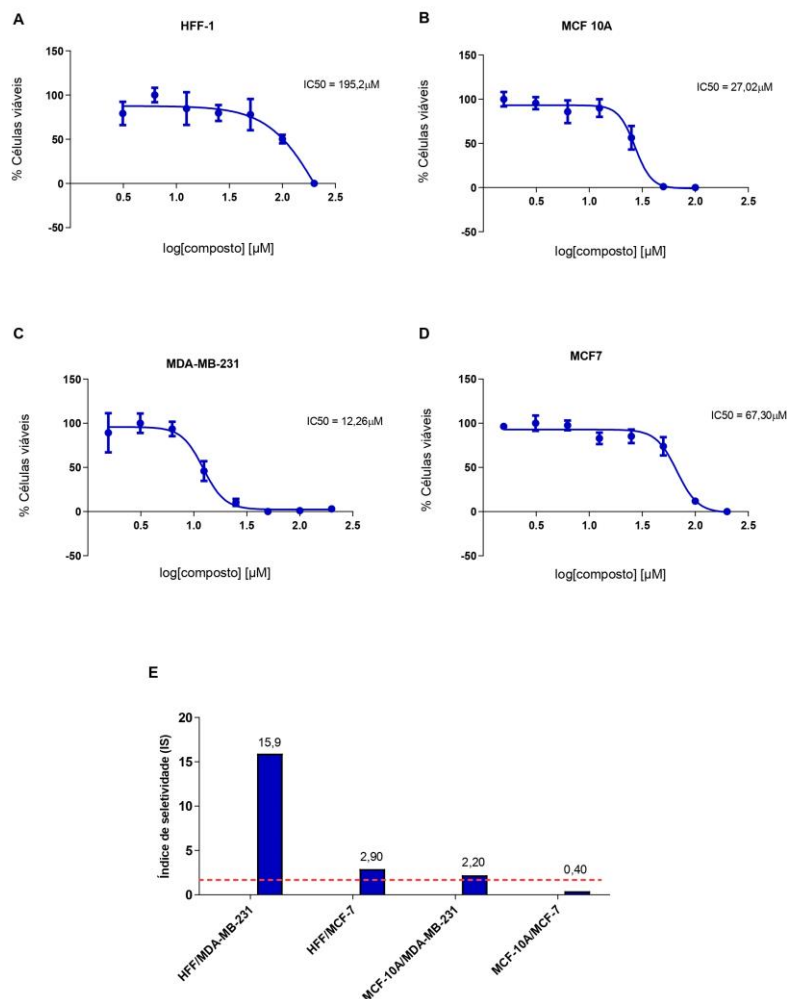
Figura 4: Efeito de nove compostos derivados de benzotiazol sobre a viabilidade das células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=3). A significância estatística foi determinada em comparação às células não tratadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc de Dunnett: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



Fonte: próprio autor

Os efeitos do composto **2** foram analisados em ensaios adicionais, uma vez que foi o único que reduziu a viabilidade em 50% das células MDA-MB-231 na concentração de 20 μ M. Para os demais, foi necessária a maior concentração para esse percentual de inibição. Um novo ensaio de MTT foi, então, conduzido utilizando o composto **2** nas concentrações 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M e as linhagens HFF-1, MCF 10A, MCF7 e MDA-MB-231 (Figura 5). Observou-se que os valores de IC₅₀ para HFF-1 (Figura 5A) e MCF 10A (Figura 5B) foram 195,2 μ M e 27,0 μ M, respectivamente. Já para as células tumorais foi de 67,30 μ M para MCF7 (Figura 5C) e 12,26 μ M para MDA-MB-231 (Figura 5D). Esse fato sugere que as células de CMTN são mais sensíveis ao composto **2** do que as células de CM luminal. Ademais, a concentração do composto necessária para inibir 50% das células MDA-MB-231, não diminuiu, na mesma proporção, células não tumorais. Esse fato evidencia a seletividade do composto **2** para células de CMTN (Figura 5E) quando comparado seu IC₅₀ com os das células HFF-1 e MCF 10A. Para as células MCF7, o composto **2** se mostrou seletivo apenas quando seu IC₅₀ foi comparado ao de fibroblastos.

Figura 5: Curvas dose-resposta de diferentes linhagens celulares tratadas com composto **2** nas concentrações 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM por 48 horas. (A) HFF-1 - fibroblasto humano; (B) MCF 10A - não tumoral mamária; (C) MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo); (D) MCF7 - câncer de mama luminal. As curvas foram construídas após viabilidade determinada por MTT e a concentração inibitória média (IC_{50}) calculada por regressão não linear. (E) Gráfico representativo da seletividade do composto **2** dividindo o IC_{50} das células não tumorais pelo IC_{50} das células tumorais



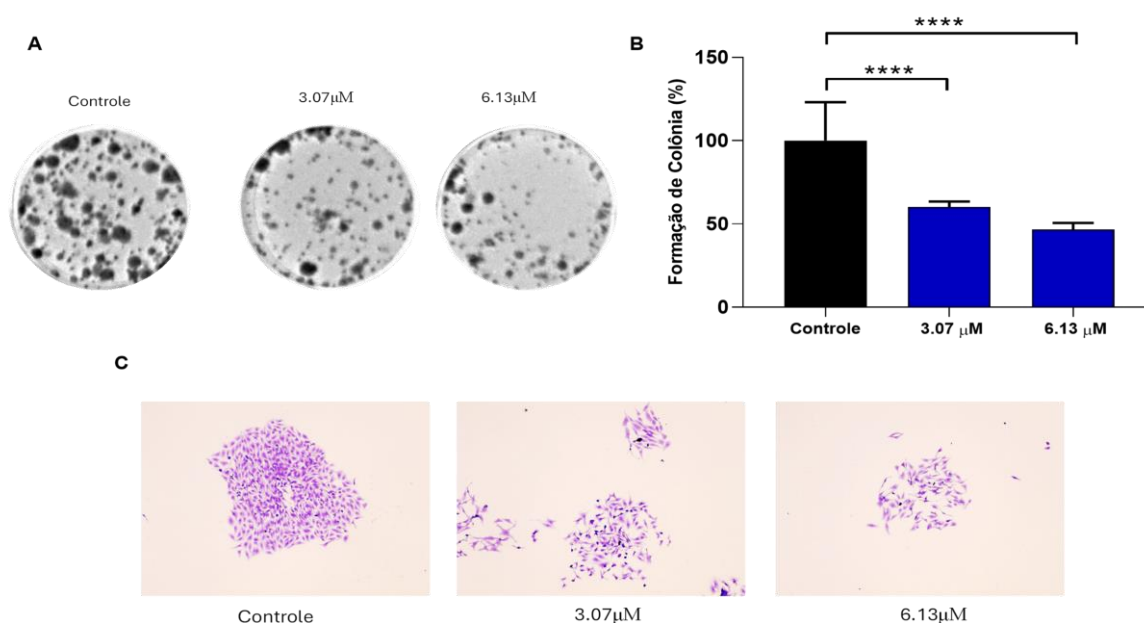
Fonte: próprio autor

4.2 Clonogenicidade

Para avaliar os efeitos do composto **2** sob a formação de colônias da linhagem MDA-MB-231 foi conduzido o ensaio clonogênico utilizando as concentrações subcitotóxicas 3,07 ($\text{IC}_{50/4}$) e 6,13 μM ($\text{IC}_{50/2}$) (Figura 6). O composto **2**, mesmo na menor concentração, diminuiu significativamente as colônias formadas em aproximadamente 40% na concentração de 3,07

μM e 55% na concentração de $6,13 \mu\text{M}$, em relação ao grupo controle, evidenciando seu potencial em modular vias relacionadas à clonogenicidade, sem causar morte celular.

Figura 6: Efeito do composto 2 na formação de colônias na linhagem MDA-MB-231. O tratamento foi conduzido por 48 horas. (A) Imagens representativas dos poços, após o tratamento, para a visualização das colônias formadas. (B) Gráfico do percentual de formação de colônias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). A significância estatística foi determinada por ANOVA em comparação às células não tratadas, seguida do teste post hoc de Tukey: **** $p < 0,0001$. (C) Imagem ilustrativa da diferença do tamanho das colônias após tratamento.

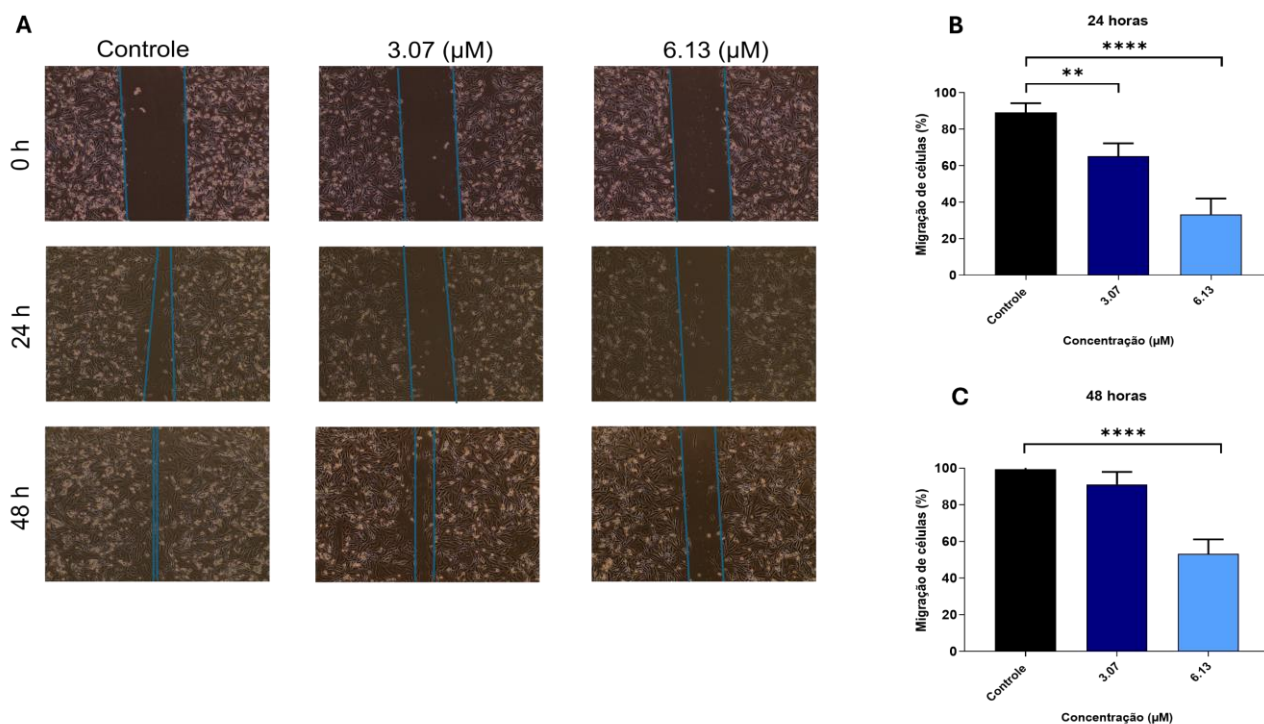


Fonte: próprio autor

4.3 Migração horizontal

Para investigar o perfil migratório das células foi utilizado o teste de migração celular (*wound healing*) com o tratamento de células MDA-MB-231 com composto 2 nas concentrações $3,07 \mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50/4}$) e $6,13 \mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50/2}$). Os efeitos foram observados nos tempos 0, 24 e 48h (Figura 7). Após 24 horas, ambas as concentrações reduziram a capacidade migratória das células de CMTN. Contudo, após 48 horas, apenas a maior concentração conseguiu, de forma significativa, inibir a migração de células em direção ao ferimento quando comparada ao controle.

Figura 7: Ensaio de migração celular (*wound healing*) em células MDA-MB-231. (A) Imagens representativas do fechamento da ferida em tempos de 0, 24 e 48 horas. Linhas azuis representam as bordas da área inicial (em 0 horas) e seu fechamento em 24 e 48 horas. (B) Gráfico do percentual do fechamento após 24 horas. (C) Gráfico do percentual do fechamento após 48 horas. Os dados são apresentados 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 < 0,01, ****p < 0,0001.

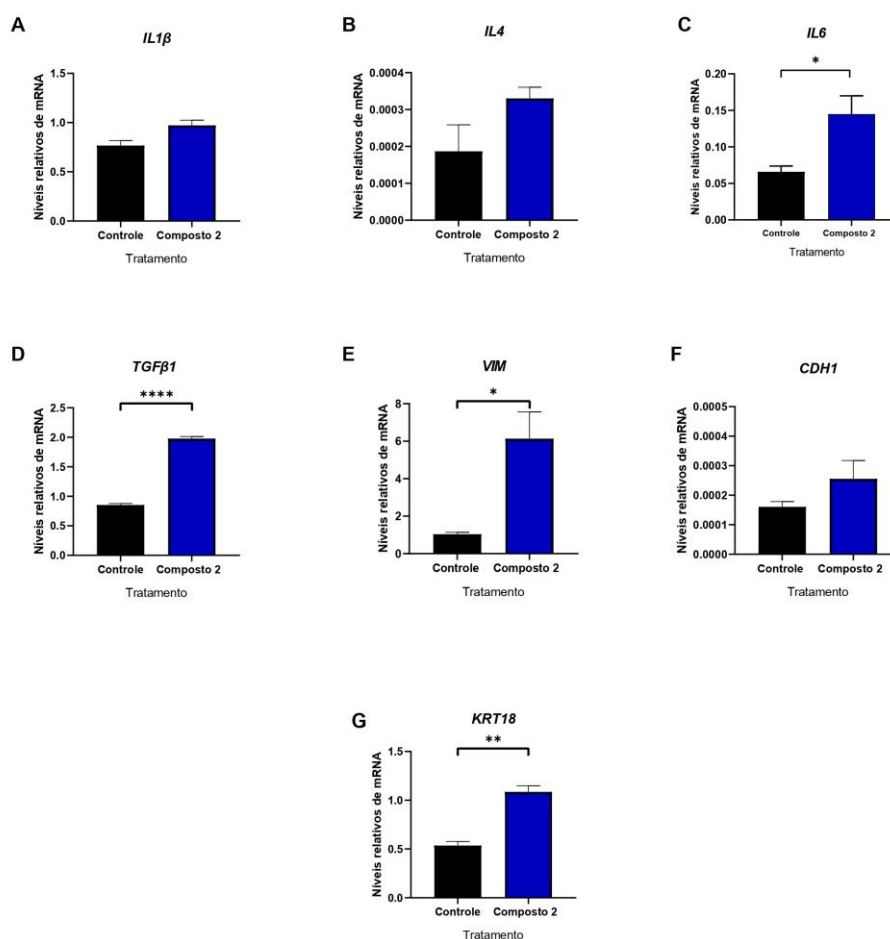


Fonte: próprio autor

4.4 Quantificação de transcritos

Finalmente, transcritos dos genes *IL1β*, *IL4*, *IL6*, *TGFβ1*, *KRT18*, *VIM* e *CDH1* foram quantificados após tratamento das células MDA-MB-231 com o composto **2** a 3,07 μM (IC_{50/4}) por 48 horas. Os níveis relativos de *IL6*, *TGFβ1*, *VIM* e *KRT18* foram aumentados, sem diferença estatisticamente significativa para *IL1β*, *IL4* e *CDH1*.

Figura 8: Quantificação relativa dos transcritos de diferentes genes da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com composto 2 por 48 horas. (A) Expressão relativa de *IL1* (Interleucina 1 β), (B) Expressão relativa de *IL4*, (C) Expressão relativa de *IL6*, (D) Expressão relativa de *TGF β 1*, (E) Expressão relativa de *VIM*, (F) Expressão relativa de *CDH1* e (G) Expressão relativa de *KRT18*. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado (two-tailed), considerando significância estatística para $p < 0,05$. Os níveis de significância comparados entre o grupo controle e tratado, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$



Fonte: próprio autor

5 DISCUSSÃO

O CM é um tumor altamente incidente na população, responsável por um expressivo número de mortes de mulheres anualmente (Bottosso, et al., 2024). Dentre seus subtipos, o TN se destaca por sua agressividade, pior prognóstico e menor sobrevida livre e global. Além disso, a ausência de expressão de receptores hormonais e de HER2 limita o uso de terapias direcionadas a esses alvos, mantendo a quimioterapia como principal estratégia de tratamento (Asleh et al., 2022). Essa ainda enfrenta desafios, como resistência e efeitos adversos, que comprometem a eficácia e evidenciam a necessidade de buscar novos compostos potencialmente promissores.

Nesse contexto, derivados de benzotiazol vêm ganhando destaque como promissores, com efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos já relatados (Kashyap et al., 2023). Ademais, são versáteis, com alterações em seu núcleo heterocíclico que possibilitam a ligação de grupos químicos de interesse, o que aumenta sua eficácia (Chidella et al. 2025). A presença de um átomo de nitrogênio livre e a substituição dos grupos tiazol e tiol por um grupo hidrofóbico, por exemplo, têm sido associadas à ação antitumoral (Aayishamma et al., 2024).

Neste estudo, em um primeiro momento, nove compostos foram avaliados quanto à capacidade de diminuir a viabilidade de células MDA-MB-231, utilizando MTT. A linhagem MDA-MB-231 é derivada de adenocarcinoma mamário humano, sendo TN, com elevado potencial migratório e metastático (Ncube et al., 2025; Pratelli et al., 2023). Já o MTT é amplamente explorado como teste inicial de triagem, de modo que células metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio (MTT) a cristais de formazano. Para isso, o MTT é capaz de atravessar a membrana celular e atingir a mitocôndria da célula viável, sendo reduzido por enzimas oxidorreduzases (Ghasemi et al., 2021). Dos nove compostos, apenas o composto **2** se mostrou citotóxico em concentração $\leq 20 \mu\text{M}$ e, portanto, foi escolhido para testes subsequentes. De fato, compostos que diminuem a viabilidade em concentrações elevadas ($> 20 \mu\text{M}$) não se mostram relevantes, especialmente em função de maior toxicidade sistêmica e possíveis efeitos adversos *in vivo* (Arokia T et al., 2023).

Os valores de IC_{50} foram, então, calculados tanto para a linhagem TN quanto para a linhagem MCF7, representativa do fenótipo luminal. Observou-se que concentrações menores do composto **2** reduziram a viabilidade das células MDA-MB-231. Ademais, sua seletividade foi maior para esse subtipo de CM. Estudos prévios descrevem mudanças nos efeitos citotóxicos de compostos conforme sua estrutura, com relação direta entre os substituintes do núcleo benzênico. Segundo Romagnoli et al. (2010), a capacidade antiproliferativa dos derivados de

benzotifenos pode ser fortemente influenciada pela posição de grupos metoxi no anel aromático. Os autores propõem que seus derivados com grupos metoxi nas posições C-4 e C-7 aumentam a capacidade antiproliferativa média em 19x, enquanto grupos metoxi nas posições C-5 ou C-6 são menos ativos. Embora não sejam da mesma classe, a semelhança estrutural apresentada entre os benzotifenos e os benzotiazóis, pelo fato de serem heterocíclicos aromáticos bicíclicos, pode fortalecer a interpretação dos nossos resultados, os compostos **2** e **5** apresentam a mesma estrutura básica, sendo que no **5** há um grupo metoxi adicional. Contudo, além do número de grupos metoxi, a sua posição também pode ter influenciado diretamente as interações entre os compostos e o alvo, resultando em citotoxicidades distintas. Em contrapartida, o composto **8** induziu um aumento na atividade metabólica. Em relação à sua estrutura, os substituintes presentes no anel benzênico diferem dos demais citados, apresentando um ácido carboxílico livre. É importante ressaltar que os resultados de viabilidade no teste de MTT podem não estar relacionados diretamente com a proliferação celular, mas também com a atividade mitocondrial (Paoletti; Supuran, 2024).

De outra forma, os efeitos antioxidantes observados na literatura em compostos derivados de benzotiazóis podem ter influência direta no teste de MTT. Ao reduzirem a produção de espécies reativas a oxigênio, os compostos podem preservar a função mitocondrial, aumentando a atividade das enzimas responsáveis pela conversão do sal de MTT em cristais de formazana. Dessa forma, o aumento da atividade metabólica observado pode estar ligado a alterações do estado redox celular e à maior atividade mitocondrial e não necessariamente pelo aumento na proliferação ou viabilidade celular. Portanto, são necessários ensaios adicionais dedicados ao estudo do metabolismo dessas células tratadas (SOMAYAJI; SHASTRY, 2021; YADAV et al., 2023)

Os valores de IC_{50} calculados a partir do ensaio de MTT não podem ser considerados isoladamente e experimentos complementares auxiliam na compreensão dos mecanismos envolvidos (Weth R et al., 2024). Assim, a clonogenicidade e a capacidade migratória das células MDA-MB-231 também foram avaliadas. No teste de clonogenicidade, houve diminuição na formação de colônias tanto na concentração de 3,07 μ M ($IC_{50/4}$) como na de 6,13 μ M ($IC_{50/2}$), o que evidencia o potencial do composto **2** em diminuir a capacidade proliferativa de células de CMTN. De forma complementar, o estudo de WU et al. (2024) demonstrou a diminuição da formação de colônias em células de câncer de esôfago, tratando-as com derivados de benzotiazol. O composto **2** também inibiu a migração de células MDA-MB-231 de forma significativa tanto após 24 quanto após 48 horas. Em um estudo recente publicado por Xu et al. (2024), foi demonstrada a capacidade de compostos derivados de benzotiazol de

impedir a migração celular em linhagens A431 (carcinoma epidermoide) e A549 (carcinoma pulmonar), e o efeito foi relacionado à inibição de vias de sinalização associadas à progressão tumoral, como AKT e ERK.

No presente estudo, foram avaliadas as expressões de genes relacionados à inflamação e à transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo pelo qual as células perdem características de adesão célula-célula e adquirem maior capacidade invasiva. Assim, foi observado aumento significativo nos transcritos de *IL6*, *TGFβ1*, *VIM* e *KRT18*. A citocina IL-6, em geral, induz uma resposta pró-inflamatória e é frequentemente associada à via STAT3 de sinalização, promovendo a proliferação e agressividade tumorais (Vecchi et al., 2022). TGFβ1, por sua vez, quando ativado, induz a migração celular (Janus et al., 2024). A VIM é um filamento intermediário presente em células mesenquimais (Usman et al., 2021). Já a KRT18 também é um filamento intermediário expresso em células epiteliais simples, responsáveis pela integridade e arquitetura celulares (Yan, 2024). Em conjunto, esses resultados sugerem uma modulação pró-metastática. Contudo, não podem ser interpretados isoladamente, e os estudos funcionais, de viabilidade, clonogenicidade e migração precisam ser considerados. O aumento desses transcritos é acompanhado pela diminuição de células viáveis, da formação de clones e da migração celular. Assim, o perfil de expressão observado revelaria uma adaptação das células ao estresse, na tentativa de manter sua agressividade. Caruso e colaboradores (2024) sugeriram, por exemplo, que a sinalização de TGFβ1 esteja envolvida em um fenótipo tanto epitelial quanto mesenquimal, o que destaca a plasticidade dos marcadores aqui quantificados. Ademais, a participação de VIM e KRT18 no perfil do citoesqueleto celular também foi previamente descrita (Leggett, 2021; Yan, 2024). Portanto, o aumento dos transcritos *VIM* e *KRT18* sugere remodelação do citoesqueleto, o que foi visualizado no experimento de migração.

Por fim, é importante apresentar algumas limitações deste estudo. Experimentos relacionados a outros *hallmarks* são relevantes, como apoptose, ciclo celular e metabolismo. Adicionalmente, a avaliação de outros marcadores, incluindo a expressão de proteínas e não somente de transcritos, é crucial para elucidação dos principais mecanismos envolvidos. Contudo, o potencial desses derivados de benzotiazol é evidente e abre novos caminhos para o tratamento do CMTN.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram avaliados nove derivados de benzotiazol em células de CM, revelando o potencial do composto **2** de diminuir, seletivamente, a viabilidade da linhagem MDA-MB-231, representativa do CMTN. Além disso, em concentrações subcitotóxicas, de 3,07 μM ($\text{IC}_{50/4}$) e 6,13 μM ($\text{IC}_{50/2}$), inibiu a clonogenicidade e a migração dessas células. Molecularmente, o composto **2** aumentou os transcritos de *IL6*, *TGF β* , *VIM* e *KRT18*, sugerindo uma resposta celular ao estresse gerado pelo tratamento, na tentativa de manter sua agressividade, expressando citocinas relacionadas à EMT e remodelando seu citoesqueleto. Contudo, a avaliação de outros *hallmarks* e marcadores, inclusive em nível proteico, é necessária. Nesse sentido, estudos adicionais serão realizados, inclusive *in vivo*, a fim de validar o potencial do composto **2** no controle do CMTN.

REFERÊNCIAS

ALTWAIJRY, Najla A. *et al.* Design, synthesis, molecular docking and anticancer activity of benzothiazolecarbohydrazide–sulfonate conjugates: insights into ROS-induced DNA damage and tubulin polymerization inhibition. **RSC Advances**, v. 15, n. 8, p. 5895–5905, 2025.

ANYIGBA, C. A., AWANDARE, G. A., & PAEMKA, L. (2021). Breast cancer in sub-Saharan Africa: The current state and uncertain future. **Experimental Biology and Medicine**, 246(12), 1377–1387. <https://doi.org/10.1177/15353702211006047>

AROKIA Femina, T. *et al.* Non-uniformity in in vitro drug-induced cytotoxicity as evidenced by differences in IC50 values – implications and way forward. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 119, p. 107238, jan. 2023.

ASLEH, Karama; RIAZ, Nazia; NIELSEN, Torsten O. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 265, 1 set. 2022

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA (ABRALE). *As perspectivas do mercado de oncologia no Brasil*. São Paulo, 14 set. 2023. Disponível em: [ABRALE – As perspectivas do mercado de oncologia no Brasil](#). Acesso em: 23 mar 2024

BEN-DROR, J., SHALAMOV, M., & SONNENBLICK, A. (2022). The History of Early Breast Cancer Treatment. **Genes**, 13(6), 960. <https://doi.org/10.3390/genes13060960>

BESSA, Jordana de Faria; MARTA, Gustavo Nader. Triple-negative breast cancer and radiation therapy. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, 9 mar. 2022.

BI, Ruomeng *et al.* Emerging strategies to overcome PARP inhibitors' resistance in ovarian cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1879, n. 6, p. 189221, nov. 2024.

BOTTOSSO, M. *et al.* Moving toward precision medicine to predict drug sensitivity in patients with metastatic breast cancer. **ESMO Open**, v. 9, n. 3, p. 102247, mar. 2024.
Breyer, J. Z., Wendland, E. M., Kops, N. L., Caleffi, M., & Hammes, L. S. (2018). Assessment of potential risk factors for breast cancer in a population in Southern Brazil. **Breast Cancer Research and Treatment**, 169(1), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4655-0>

CARUSO, Joseph A.; CHEN-TANYOLAC, Chira; TLSTY, Thea D. A hybrid epithelial-mesenchymal transition program enables basal epithelial cells to bypass stress-induced stasis and contributes to a metaplastic breast cancer progenitor state. **Breast Cancer Research**, v. 26, n. 1, p. 184, 18 dez. 2024.

CATALANO, A., IACOPETTA, D., CERAMELLA, J., et al. (2022). New Achievements for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. **Applied Sciences**, 12(11), 5554. <https://doi.org/10.3390/app12115554>

CHEN, X., ZHANG, Z., YANG, H., QIU, P., WANG, H., WANG, F., ZHAO, Q., FANG, J., & NIE, J. (2020). Consumption of ultra-processed foods and health outcomes: a systematic review of epidemiological studies. **Nutrition Journal**, 19(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12937-020-00604-1>

CHEN, Y., QI, Y., & WANG, K. (2023). Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: an evaluation of its efficacy and research progress. **Frontiers in Oncology**, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1169010>

CHIDELLA, Karunakar *et al.* Design, synthesis and anticancer evaluation of some benzothiazole- sulphonamide hybrids. **Results in Chemistry**, v. 18, p. 102817, nov. 2025.

COHEN, S. Y., STOLL, C. R., ANANDARAJAH, A., DOERING, M., & COLDITZ, G. A. (2023). Modifiable risk factors in women at high risk of breast cancer: a systematic review. **Breast Cancer Research**, 25(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01636-1>

CORTESI, L., RUGO, H. S., & JACKISCH, C. (2021). An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. **Targeted Oncology**, 16(3), 255–282. <https://doi.org/10.1007/s11523-021-00796-4>

CROCE, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. **New England Journal of Medicine**, 358(5), 502–511. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072367>

DA LUZ, F. A. C., ARAÚJO, B. J., & de ARAÚJO, R. A. (2022). The current staging and classification systems of breast cancer and their pitfalls: Is it possible to integrate the complexity of this neoplasm into a unified staging system? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 178, 103781. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103781>

DALL, G. V., & BRITT, K. L. (2017). Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. **Frontiers in Oncology**, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00110>

DIAS, Renieidy Flávia Clemente 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, nov. 2023.

DUFTON, Jane; MEHTA, Shaveta. Adjuvant treatment for breast cancer. **Surgery (Oxford)**, v. 42, n. 12, p. 911–917, dez. 2024.

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). (2014). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. **The Lancet**, 383(9935), 2127–2135. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60488-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60488-8)

FISUSI, F. A., & AKALA, E. O. (2019). Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, 7(1), 3–23. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>

FRANKEN, Nicolaas A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006.

GAO, Xiang *et al.* Recent Advances in Synthesis of Benzothiazole Compounds Related to Green Chemistry. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1675, 5 abr. 2020.

GHASEMI, Mahshid et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021.

GONZALEZ-ANGULO, A. M., MORALES-VASQUEZ, F., & HORTOBAGYI, G. N. (2007). **Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer** (pp. 1–22). https://doi.org/10.1007/978-0-387-74039-3_1

HANAHAHAN, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HANAHAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer—Then and now, and beyond. **Cell**, jan. 2026.
Harbeck, N. (2022). Neoadjuvant and adjuvant treatment of patients with HER2-positive early breast cancer. **The Breast**, 62, S12–S16. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.01.006>

HUANG, Guang; CIERPICKI, Tomasz; GREMBECKA, Jolanta. 2-Aminobenzothiazoles in anticancer drug design and discovery. **Bioorganic Chemistry**, v. 135, p. 106477, jun. 2023.

HUSSEN, Narmin Hamaamin *et al.* Antraciclina em Química Medicinal: Mecanismo de Cardiotoxicidade, Estratégias de Prevenção e Tratamento. **Current Organic Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 363–377, 27 abr. 2023.

I, Aayishamma *et al.* Benzothiazole a privileged scaffold for Cutting-Edges anticancer agents: Exploring drug design, structure-activity relationship, and docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 279, p. 116831, dez. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2026: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2025.

JANG, Min Kyeong *et al.* Prevalence and clinical implications of sarcopenia in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v. 32, n. 5, p. 328, 3 maio 2024.

JANUS, Patryk *et al.* Transcriptional responses to direct and indirect TGFB1 stimulation in cancerous and noncancerous mammary epithelial cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 522, 28 out. 2024.

JONES, M. E., SCHOEMAKER, M. J., WRIGHT, L. B., ASHWORTH, A., & SWERDLOW, A. J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. **Breast Cancer Research**, 19(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0908-4>

JONKMAN, James E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440–451, 3 set. 2014.

KASHYAP, Priyanka *et al.* Recent insights into antibacterial potential of benzothiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 32, n. 8, p. 1543–1573, 29 ago. 2023.

KATZ, H., & ALSHAREDI, M. (2018a). Immunotherapy in triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, 35(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1071-6>

KERI, R. S., Patil, M. R., Patil, S. A., & Budagumpi, S. (2015). A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 89, 207–251. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.059>

KHAN, S.; FAKOYA, A. O.; SAJJAD, H. Anatomy, Thorax, Mammary Gland. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547666/>. Acesso em: 23 mai. 2025

KUCHENBAECKER, K., *et al.* (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. **JAMA**, 317(23), 2402. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>

KUMAR, A.; RAI, Y.; BHATT, Anant Narayan. Anti-cancer drug-mediated increase in mitochondrial mass limits the application of metabolic viability-based MTT assay in cytotoxicity screening. **Cytotechnology**, v. 76, n. 3, p. 301–311, 21 jun. 2024.

KUMBHARE, Ravindra M. *et al.* Synthesis and cytotoxic evaluation of thiourea and N-bis-benzothiazole derivatives: A novel class of cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 1, p. 453–455, jan. 2012.

LEGGETT, Susan E. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. **Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, p. 32, 10 mar. 2021.

LI, Shen *et al.* An umbrella review of socioeconomic status and cancer. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 9993, 18 nov. 2024.

LÓPEZ-OTÍN, C., BLASCO, M. A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., & KROEMER, G. (2013). The Hallmarks of Aging. **Cell**, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

ŁUKASIEWICZ, S., CZECZELEWSKI, M., FORMA, A., BAJ, J., SITARZ, R., & STANISŁAWEK, A. (2021a). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers**, 13(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>

MAQBOOL, M., BEKELE, F., & FEKADU, G. (2022). Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, Volume 14, 15–24. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S348060>

MCCART REED, A. E., KALINOWSKI, L., SIMPSON, P. T., & LAKHANI, S. R. (2021). Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. **Breast Cancer Research**, 23(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01384-6>

MERINO BONILLA, J. A., TORRES TABANERA, M., & ROS MENDOZA, L. H. (2017). Breast cancer in the 21st century: From early detection to new therapies. **Radiología (English Edition)**, 59(5), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.rxeng.2017.08.001>

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, dez. 1983.

NCUBE, Keith N. et al. Utility of Multicellular Spheroids for Investigating Mechanisms of Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 15, p. 7503, 3 ago. 2025.

NURMIK, M., ULLMANN, P., RODRIGUEZ, F., HAAN, S., & LETELLIER, E. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. **International Journal of Cancer**, 146(4), 895–905. <https://doi.org/10.1002/ijc.32193>

O'REILLY, D., SENDI, M. AL, & KELLY, C. M. (2021). Overview of recent advances in metastatic triple negative breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, 12(3), 164–182. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i3.164>

Oliveira, D. *et al.* (2024). Advances in Breast Cancer Drug Discovery: A Review of Therapeutic Strategies and Studies Involving Photosensitizers, Caged Xanthenes and Thiosemicarbazones Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230128>

ORRANTIA-Borunda, E., ANCHONDO-Nuñez, P., ACUÑA-Aguilar, L. E., GÓMEZ-Valles, F. O., & RAMÍREZ-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. In **Breast Cancer** (pp. 31–42). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes>

PAOLETTI, Niccolò; SUPURAN, Claudiu T. Benzothiazole derivatives in the design of antitumor agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 357, n. 9, 14 set. 2024.

PRATELLI, Giovanni *et al.* MCL1 Inhibition Overcomes the Aggressiveness Features of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11149, 6 jul. 2023.

ROMAGNOLI, Romeo *et al.* Substituted 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]thiophene derivatives as potent tubulin polymerization inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 5114–5122, jul. 2010.

SALMANINEJAD, A., VALILOU, S. F., SHABGAH, A. G., ASLANI, S., ALIMARDANI, M., PASDAR, A., & SAHEBKAR, A. (2019). PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. **Journal of Cellular Physiology**, 234(10), 16824–16837. <https://doi.org/10.1002/jcp.28358>

SECHOPOULOS, I., TEUWEN, J., & MANN, R. (2021). Artificial intelligence for breast cancer detection in mammography and digital breast tomosynthesis: State of the art. **Seminars in Cancer Biology**, 72, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.002>

SENOGA, A., WASIKE, R., ALI MWANZI, S., & MUTEBI, M. (2023). Quality of life of patients one year after breast-conserving surgery versus modified radical mastectomy for early breast cancer: a Kenyan tertiary hospital five-year review. **The Pan African Medical Journal**, 46. <https://doi.org/10.11604/pamj.2023.46.69.39151>

SERRANO-DEL VALLE, A., REINA-ORTIZ, C., BENEDI, A., ANEL, A., NAVAL, J., & MARZO, I. (2021). Future prospects for mitosis-targeted antitumor therapies. **Biochemical Pharmacology**, 190, 114655. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114655>

SHAMA, Aamir R.; SAVALIYA, Mehulkumar L. Benzothiazole-triazole hybrids: Novel anticancer agents inducing cell cycle arrest and apoptosis through Bcl-2 inhibition in triple-negative breast cancer. **Bioorganic Chemistry**, v. 155, p. 108150, fev. 2025.

SILVA, P. A. da, & RIUL, S. da S. (2011). Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 64(6), 1016–1021. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672011000600005>

SILVA, Rayanne H. N. *et al.* Molecular Modeling and In Vitro Evaluation of Piplartine Analogs against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1675, 9 fev. 2023.

SMOLARZ, B., NOWAK, A. Z., & ROMANOWICZ, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). **Cancers**, 14(10), 2569. <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>

SOMAYAJI, Ashwini; SHASTRY, C. S. Interference of Antioxidant Flavonoids with MTT Tetrazolium Assay in a Cell Free System. **Journal of Pharmaceutical Research International**, p. 76–83, 11 nov. 2021.

SØRLIE, T *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

SWAIN, S. M., SHASTRY, M., & HAMILTON, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, 22(2), 101–126. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>

TEICHGRAEBER, D. C., GUIRGUIS, M. S., & WHITMAN, G. J. (2021). 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**, 217(2), 278–290. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.25223>

TILSED, C. M., FISHER, S. A., NOWAK, A. K., LAKE, R. A., & LESTERHUIS, W. J. (2022). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. **Frontiers in Oncology**, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>

TRAINA, T. A *et al.* (2018). Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor–Expressing Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 36(9), 884–890. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.3495>

USMAN, Saima *et al.* Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4985, 5 out. 2021.

VAGIA, E., MAHALINGAM, D., & CRISTOFANILLI, M. (2020). The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. **Cancers**, 12(4), 916. <https://doi.org/10.3390/cancers12040916>

VECCHI, Lara *et al.* Interleukin-6 Signaling in Triple Negative Breast Cancer Cells Elicits the Annexin A1/Formyl Peptide Receptor 1 Axis and Affects the Tumor Microenvironment. **Cells**, v. 11, n. 10, p. 1705, 20 maio 2022.

WANG, Rui; YAN, Zhaopeng. Cancer spreading patterns based on epithelial-mesenchymal plasticity. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, 11 abr. 2024.

WANG, Yuxuan *et al.* Mechanisms of radioresistance and radiosensitization strategies for Triple Negative Breast Cancer. **Translational Oncology**, v. 55, p. 102351, maio 2025.

WANG, Z. (2021). Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells*, 10(12), 3327. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>

WETH, Freya R. et al. Unlocking hidden potential: advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. **British Journal of Cancer**, v. 130, n. 5, p. 703–715, 23 mar. 2024.

WILL, M., LIANG, J., METCALFE, C., & CHANDARLAPATY, S. (2023). Therapeutic resistance to anti-oestrogen therapy in breast cancer. **Nature Reviews Cancer**, 23(10), 673–685. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00604-3>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Breast cancer*. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em: 17 abr. 2026.

WU, Bo-Wen *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 1,2,3-triazole benzothiazole derivatives as tubulin polymerization inhibitors with potent anti-esophageal cancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 265, p. 116118, fev. 2024.

XIONG, Xin *et al.* Breast cancer: pathogenesis and treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, p. 49, 19 fev. 2025.

XU, Xuemei *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel benzothiazole derivatives as potential anticancer and antiinflammatory agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, 18 mar. 2024.

YADAV, Kumari Priyanka *et al.* Synthesis and biological activities of benzothiazole derivatives: A review. **Intelligent Pharmacy**, v. 1, n. 3, p. 122–132, out. 2023.

YAN, Jiazhi; YANG, Aiwei; TU, Shuo. The relationship between keratin 18 and epithelial-derived tumors: as a diagnostic marker, prognostic marker, and its role in tumorigenesis. **Frontiers in Oncology**, v. 14, 22 out. 2024.

YOSHIDA, K., & MIKI, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science**, 95(11), 866–871. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x>

ZABOROWSKI, Alexandra M. *et al.* A systematic review of oncological outcomes after nipple-sparing mastectomy for breast cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 127, n. 3, p. 361–368, 8 mar. 2023.

ZHANG, A., WANG, X., FAN, C., & MAO, X. (2021). The Role of Ki67 in Evaluating Neoadjuvant Endocrine Therapy of Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.687244>

ZHANG, Yuyang et al. Prognostic significance and value of further classification of lymphovascular invasion in invasive breast cancer: a retrospective observational study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 206, n. 2, p. 397–410, 21 jul. 2024.