

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

MATHEUS FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN SILICO* E *IN VITRO* DE
COMPOSTOS METÁLICOS EM DIFERENTES LINHAGENS
DE CÂNCER DE MAMA**

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2022**

MATHEUS FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN SILICO* E *IN VITRO* DE
COMPOSTOS METÁLICOS EM DIFERENTES LINHAGENS
DE CÂNCER DE MAMA**

Projeto de dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Robson José
de Oliveira Junior**

**Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thaise
Gonçalves de Araújo**

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2022**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a)
próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Matheus Fernandes da, 1997-
2022 Avaliação da Atividade in silico e in vitro de Compostos Metálicos em
Diferentes Linhagens de Câncer de Mama [recurso eletrônico] / Matheus
Fernandes da Silva. - 2022.

Orientador: Robson Jose de Oliveira Junior.

Coorientador: Thaise Gonçalves de Araujo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

CDU: 60

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.22>

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. I. Oliveira Junior, Robson Jose de, 1984-, (Orient.). II.
Araujo, Thaise Gonçalves de, 1984-, (Coorient.). III. Universidade Federal
de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Av. Getúlio Vargas, 230, 3º andar, Sala 308 - Bairro Centro, Patos de Minas-MG,
CEP 38700-128
Telefone: (34) 3823-3714 - Ramal 39 - www.ppgbiotec.ibtec.ufu.br -
ppgbiotec@ibtec.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	15/12/2022	Hora de início:	08h30	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	42012BTC009				
Nome do Discente:	Matheus Fernandes da Silva				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IN SILICO E IN VITRO DE COMPOSTOS METÁLICOS EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA				
Área de concentração:	Biociências				
Linha de pesquisa:	Prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da atividade citotóxica, antitumoral e genotóxica de 4 complexos metálicos de Cobre(II)				

Reuniu-se, por meio de vídeo-conferência, no Campus Patos de Minas, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra e Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior (UFU), orientador do candidato. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior (UFU), apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robson José de Oliveira Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joyce Ferreira da Costa Guerra, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisângela de Paula Silveira Lacerda, Usuário Externo**, em 15/02/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4137206** e o código CRC **986E385C**.

Referência: Processo nº 23117.091459/2022-16

SEI nº 4137206

MATHEUS FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IN SILICO E IN VITRO DE COMPOSTOS
METÁLICOS EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Aprovado em 15 / 12 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior – Orientador

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra

PATOS DE MINAS – MG

2022

Você é mais corajoso do que pensa, mais forte do que parece e mais esperto do que acredita.

A. A. Milne

Dedicatória

Dedico esta conquista a Deus, sem Ele nada disso teria sido possível. Gostaria de dedicar também a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Agradecimentos

Primeiro quero agradecer a Deus, sem Ele certamente eu não teria chegado até aqui. Somente Ele sabe de todos os desafios e obstáculos que passei. Foi a fé de crer Nele que me sustentou a superar todos os meus limites.

Aos professores Dr. Robson José de Oliveira Júnior e Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, por terem me aceitado como orientado mesmo não me conhecendo, pelo apoio e orientações! Agradeço também pela paciência e compreensão, por entenderem meus limites e minha história. Sou muito grato por todas as oportunidades!

A minha família, pela esforço em me proporcionar os meios para alcançar essa suada conquista.

Ao meu namorado Igor, que me proporcionou momentos incríveis e me trouxe parte do brilho para seguir em frente. Sem você o caminho teria sido mais árduo.

Aos amigos, não tenho palavras para descrever o quanto sou grato a vocês. Essa conquista também é de vocês. Foi graças a vocês que não desisti e continuei perseverante, mesmo diante de todos os problemas enfrentados.

Aos colegas de laboratório e funcionários da UFU, meus sinceros agradecimentos por todo suporte e amparo nessa jornada.

À Gbio e Ldam, que me acolheram e me ensinaram muito! Adquiri conhecimentos que levarei para vida toda.

Aos docentes do Instituto de Biotecnologia, pelos ensinamentos ministrados e pela cooperação.

Ao Programa de Pós-graduação e a UFU, pelas oportunidades e estruturas ofertadas para andamento da pesquisa.

Resumo

A mortalidade associada ao Câncer de Mama (CM) é alarmante, sobretudo diante das restritas estratégias terapêuticas para os quadros de resistência aos fármacos rotineiramente utilizados. Dentre os mecanismos de resistência apresentados pelos tumores mamários, alguns possuem forte relação à expressão de receptores de estrogênio. Nesse contexto, a busca por novos compostos é premente para que haja, de fato, um aumento na sobrevida global das pacientes. Complexos metálicos têm se destacado devido à sua versatilidade, eficácia e seletividade e o presente estudo objetivou avaliar as atividades biológicas de cinco novos protótipos metálicos de cobre (Cu) e níquel (Ni) em linhagens celulares de CM. Inicialmente, foi predita a afinidade pelo DNA, destacando-se o Complexo III. Posteriormente, foi avaliada a citotoxicidade dos cinco complexos às linhagens MCF10A (não tumorigênica), MCF7 (CM luminal) e MDA-MB231 (CM triplo-negativo). O Complexo III foi seletivo à linhagem MCF7 após 48 horas e, por essa razão, também foi utilizado no tratamento dessas células resistente ao hormonioterápico Tamoxifeno (MCF7/TAM). Interessantemente, o Complexo III foi ativo nesta linhagem, com $IC_{50} = 0,66\mu M$. Ao avaliar os mecanismos modulados, observamos que o composto diminuiu os transcritos de *ESR1* e *AR* e *aumentou os de ESR2* na linhagem MCF7, com efeito oposto nas células MCF7/TAM. Em nível proteico, foi observado um aumento na expressão de Caspase 3 clivada e uma diminuição de *Bcl2* na linhagem resistente. Finalmente, o Complexo III também aumentou os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio nas células MCF7/TAM. Portanto, o Complexo III é um potencial candidato no controle de células de CM luminal, podendo ser empregado como ferramenta complementar ao tratamento com Tamoxifeno e, em caso de resistência terapêutica, induz à apoptose das células tumorais, o que o torna potencialmente promissor. Estudos adicionais são necessários para aprofundar a compreensão acerca de seus mecanismos de ação, principalmente em modelos animais.

Palavras-Chave: Câncer de Mama. Citotoxicidade. Cobre. Complexos Metálicos. Níquel. Receptores de Estrogênio. Tamoxifeno.

Abstract

The mortality associated with Breast Cancer (BC) is alarming, especially in view of the restricted therapeutic strategies for cases of resistance to routinely used drugs. Among the resistance mechanisms presented by breast tumors, some are strongly related to the expression of estrogen receptors. In this context, the search for new compounds is urgent so that there is, in fact, an increase in the overall survival of patients. Metal complexes have stood out due to their versatility, effectiveness and selectivity and the present study aimed to evaluate the biological activities of five new metallic prototypes of copper (Cu) and nickel (Ni) in CM cell lines. Initially, affinity for DNA was predicted, highlighting Complex III. Subsequently, the cytotoxicity of the five complexes to MCF10A (non-tumorigenic), MCF7 (luminal CM) and MDA-MB231 (triple-negative CM) strains was evaluated. Complex III was selective for the MCF7 lineage after 48 hours and, for this reason, it was also used in the treatment of these cells resistant to the hormone therapy Tamoxifen (MCF7/TAM). Interestingly, Complex III was active in this strain, with $IC_{50} = 0.66\mu M$. When evaluating the modulated mechanisms, we observed that the compound decreased ESR1 and AR transcripts and increased ESR2 transcripts in the MCF7 cell line, with the opposite effect in MCF7/TAM cells. At the protein level, an increase in the expression of cleaved Caspase 3 and a decrease in *Bcl2* was observed in the resistant strain. Finally, Complex III also increased Reactive Oxygen Species levels in MCF7/TAM cells. Therefore, Complex III is a potential candidate in the control of luminal BC cells, and can be used as a complementary tool to treatment with Tamoxifen and, in case of therapeutic resistance, it induces apoptosis of tumor cells, which makes it potentially promising. Additional studies are needed to deepen the understanding of its mechanisms of action, especially in animal models.

Keywords: Breast Cancer. Cytotoxicity. Copper. Estrogen Receptors. Metal Complexes. Nickel. Tamoxifen.

Abreviaturas e Siglas

A = Adenina

AR = Receptor de Andr geno

APC = Regulador APC da via de sinalização WNT

AP-1 = S tio alternativo de ligação ao DNA

Bcl2 = Linfoma de células B2

BRCA = Câncer de Mama (gene 1 ou 2)

BRCA1 = Câncer de Mama gene 1

BRCA2 = Câncer de Mama gene 2

Bth = benzopirano [4,3-b] tiofeno-2-ácido carboxílico hidrazida

β 2M = Anticorpo Anti- β -actina

cGMP = GMP cíclico

CM = Câncer de Mama

CO = Monóxido de Carbono

CQ = Clioquinol

CSC = Células-tronco Cancerígenas

Cu = Cobre

CYP19 = Citocromo p450

dA = Desoxiadenosina

dC = Desoxicitosina

DCFH-DA = 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato

dG = Desoxiguanosina

DMSO = Dimetilsulfóxido

Dmb = 4-4'-Dimetoxi-2'-2'-bipiridina

DNA =  cido Desoxirribonucleico

DO = Densidade  ptica

Dppz = Fenazina

dT = Desoxitimidina

EDTA =  cido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGF = Fator de Crescimento Epidérmico Humano

ER = Receptor de Estrogênio

EROS = Espécies Reativas de Oxigênio

ESR1 = Receptor de Estrógeno α

ESR2 = Receptor de Estrógeno β

Fe = Ferro

Fen = 1,10-fenantrolina

GH = Hormônio do Crescimento

H = Hidrogênio

HER2 = Receptores do Fator de Crescimento Epidermal Humano II

IC50 = Concentração que inibe 50 % do crescimento celular em relação ao controle

IFN = Interferon

INCA = Instituto Nacional do Câncer

INK4 = Inibidores de CDK4

IS = Índice de Seletividade

LACCA = Laboratório de Cultura de Células Animais

MC = Mastectomia Completa

MLCT = Transferência de Carga Metal-Ligante

MSRE = Modulador Seletivo do Receptor de Estrogênio

MTT = Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio

NAC = N-Acetilcisteína

NaCl = Cloreto de Sódio

NaF = Fluoreto de Sódio

Ni = Níquel

OMS = Organização Mundial da Saúde

p53 = Proteína Tumoral p53

PAAF = Punção Aspirativa por Agulha Fina

PARP = Poli adenosina difosfato-ribose polimerase

PBS = Tampão fosfato-salino

PR = Receptor de Progesterona

PRL = Prolactina

Pt = Platina

RB1 = Co-repressor Transcricional I RB

RM = Ressonância Magnética

RNA = Ácido Ribonucleico

SFB = Soro Fetal Bovino

T = Timina

Tam = Tamoxifeno TGF- β = Fator de Transformação do crescimento Beta

TN = Triplo Negativo

Tpy = 2,2';6',2"-terpiridina

UFU = Universidade Federal de Uberlândia

USG = Ultrassom ou Ultrassonografia

ΔG = Energia de Ligação

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO I	18
REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1 CÂNCER.....	19
1.1 Incidência e Mortalidade	20
1.2 Estratégias de tratamento.....	21
2 CÂNCER DE MAMA.....	23
2.1 Aspectos epidemiológicos e fatores de risco	23
2.2 Anatomia e Fisiologia da Mama.....	24
2.3 Fisiopatologia	26
2.4 Receptores de Estrogênio (RE)	28
2.5 Ações Preventivas e Terapêuticas	29
2.5.1 Tamoxifeno (TAM) e a Hormonioterapia.....	31
3 COMPLEXOS METÁLICOS	32
3.1 Complexos à Base de Cobre (Cu)	34
3.2 Complexos à Base de Níquel (Ni).....	35
3.3 Ligantes Químicos.....	36
4 METAIS NA MEDICINA.....	40
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO II	63
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1 Síntese e Preparação dos Complexos Metálicos.....	65
2.2 Docking Molecular	66
2.3 Linhagens de Células	67
2.4 Viabilidade celular e índice de seletividade	67
2.5 Isolamento de RNA e síntese de cDNA.....	68
2.6 Ensaios de qPCR	69
2.7 Western Blotting	69
2.8 Análise de EROs por citometria de fluxo.....	70
2.9 Análises Estatísticas	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71

3.1 Docking Molecular	71
3.2 Viabilidade Celular, Valores de IC50 e IS	75
3.4 Tratamento da linhagem MCF/TAM com o Complexo III	77
3.5 Análise da expressão gênica de receptores hormonais	79
3.6 Expressão de <i>Bcl2</i> e Caspase 3	81
3.7 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	82
4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação de células transformadas que atingem diferentes órgãos e tecidos. Trata-se de uma patologia altamente complexa e heterogênea, com diferentes origens, etiologias, sintomas e mecanismos de progressão (NURMIK et al., 2020). Embora bastante estudado, o câncer ainda se mantém entre as principais causas de mortes no mundo.

Considerando o câncer de mama (CM), este é o mais incidente, totalizando 11,7% dos casos. Estatisticamente, ultrapassou o câncer de pulmão, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos para 2021 (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021). É também a quinta maior causa de morte por câncer, somando 685 mil óbitos (6,9%) somente no ano de 2020. Diante desse cenário, tumores mamários demandam estratégias terapêuticas bem delineadas e, quando possível, personalizadas (KHAN et al., 2020).

As terapias utilizadas para o CM dependem das características das lesões, assim como das condições físicas e psicológicas do paciente. Dentre as opções de tratamento sistêmico, os quimioterápicos são os mais indicados. Estes podem atuar no DNA promovendo sua quebra ou intercalando em suas bases. Além disso, podem inibir a mitose e ativar mecanismos apoptóticos. Entretanto, é importante lembrar que sua inespecificidade gera efeitos colaterais como anemia, erupções cutâneas, fadiga, perda de cabelo, náuseas e vômitos (XU et al., 2017).

Nesse sentido, torna-se necessário buscar novos medicamentos que tenham a capacidade de associar a ação antineoplásica à baixa toxicidade (YERSAL et al., 2019). Por isso, o presente estudo visa avaliar as propriedades citotóxicas e genotóxicas de cinco novos protótipos metálicos de cobre (Cu) e níquel (Ni), utilizando modelos *in silico* e *in vitro*, sendo que, para estes, foram cultivadas células de tumores mamários.

É importante destacar que elementos como Cu e Ni participam de processos vitais do organismo. O Cu, por exemplo, é fundamental para a produção dos glóbulos vermelhos, do colágeno e para a saúde óssea, além de ser um ativador do sistema imunológico. O Ni atua no metabolismo, sendo também cofator de diferentes enzimas como urease, hidrogenase, desidrogenase e acetil-CoA sintase. Por esse motivo, esses dois metais podem ser amplamente utilizados na síntese de complexos metálicos (ZAMBLE et al., 2017; CHAUDHARY et al., 2019). Ademais, alguns dos compostos testados estão associados a ligantes já conhecidos, como fenantrolina, terpiridina, tetrahidrobenzotiofeno e dimetoxibipiridina. Estes já

demonstraram, em outras formulações, propriedades antiparasitárias, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e antitumorais (KERRU et al., 2020). Sendo assim, os arranjos estruturais delineados neste estudo podem ser favoráveis enquanto recurso terapêutico contra o CM. Espera-se, portanto, um controle promissor das células tumorais mamárias.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 Câncer

O câncer é um termo genérico que engloba mais de 200 doenças caracterizadas, em sua maioria, pelo crescimento desordenado das células. Também pode ser definido como um conjunto de clones de células anormais, as quais apresentam alterações moleculares, estruturais e funcionais, sendo capazes de invadir tecidos e órgãos, ocasionando as metástases (GABRIEL, 2007; STRATTON et al., 2009; HASSANPOUR; DEGHANI, 2017).

Em geral, o surgimento do câncer ocorre em função de alterações em genes-chave, acometendo, principalmente, células somáticas, com diferentes origens. Quando as mutações ocorrem em linhagens germinativas estas podem ser transmitidas hereditariamente promovendo o surgimento de tumores mais agressivos (LIMA et al., 2006). Os proto-oncogenes e genes supressores tumorais são os mais frequentemente mutados, uma vez que são responsáveis por coordenar a sinalização, divisão e apoptose celulares. Além disso, sustentam e controlam estímulos ligados ao reparo, reconhecimento de fatores de crescimento, ativação de cascatas de sinalização pro-tumorais, escape imunológico, alteração metabólica, angiogênese e invasão (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Dentre os principais supressores tumorais destacam-se *BRCA* (*Breast Cancer 1, early onset*), *RB1* (*RB transcriptional corepressor 1*), *p53* (*Tumor Protein p53*), *APC* (*APC regulator of WNT signaling pathway*) e *INK4* (*Inhibitors of CDK4*), os quais desempenham papéis ativos na proliferação e reparo celulares (PARK; VOGELSTEIN, 2003; COSGROVE et al., 2016).

Sobre os tumores sólidos, estes se encontram entre os mais desafiadores devido à sua notável heterogeneidade em relação aos aspectos morfológicos, moleculares, estruturais, respostas terapêuticas e taxas de proliferação. Tais particularidades têm levantado alguns questionamentos sobre seu comportamento. Um desses é se os diferentes subtipos de tumores refletem, de fato, células de origens distintas e até que ponto o perfil mutacional influencia no fenótipo tumoral (VISVADER, 2011; TOMASETTI et al., 2017). Quanto à etiologia, agentes químicos, físicos e biológicos estão diretamente relacionados às mutações, pois provocam danos celulares que comprometem processos como replicação, transcrição, tradução, vias de reparo e apoptose (LOPES et al., 2015; COSTA; MENK, 2000).

Tumores podem ser benignos ou malignos. Nos primeiros, as células são similares ao tecido normal com aspecto de crescimento lento, amplo e local, com difícil recidiva e baixa capacidade invasiva (BABA, CÂTOI, 2007; SUDHAKAR, 2009). Já os malignos manifestam rápido desenvolvimento, alta capacidade de expansão e infiltração e maiores probabilidades de recidiva. A carcinogênese é um processo que envolve, basicamente, três etapas: (i) a iniciação, em que as células sofrem a ação de carcinógenos que provocam alterações genéticas; (ii) promoção, a qual consiste na transformação de uma célula iniciada em uma célula maligna e (iii) a progressão, que é a presença do tumor propriamente instalado, se multiplicando de maneira descontrolada (DANTAS et al., 2009; SARKAR et al., 2013).

1.1 Incidência e Mortalidade

A incidência de um tumor corresponde ao número de indivíduos diagnosticados em uma população durante um determinado período. Enquanto isso, a taxa de mortalidade por câncer está associada ao número de mortes por 100.000 habitantes (MARTEL et al., 2020; WHO, 2021). Em 2020, os cânceres mais comuns no mundo foram: mama (2,26 milhões de casos), pulmão (2,21 milhões de casos), colorretal (1,93 milhão de casos), próstata (1,41 milhão de casos), pele não-melanoma (1,20 milhão de casos) e gástrico (1,09 milhão de casos) (WHO, 2021). Em relação à mortalidade, ocorreram cerca de 10 milhões de óbitos por câncer em todo o mundo somente em 2020, destacando-se os tumores de pulmão (1,8 milhões de mortes), colorretal (935.000 mortes); fígado (830.000 mortes); gástrico (769.000 mortes) e mamário (685.000 mortes) (FERLAY et al., 2020; WHO, 2021).

No Brasil, para o triênio 2020-2022, são estimados 625 mil casos novos de câncer a cada ano. O de pele não melanoma permanece o mais prevalente, acompanhado pelos de mama e próstata, cólon e reto, pulmão e estômago. Os mais comuns entre os homens, com exceção do câncer de pele não melanoma, são próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral. Nas mulheres, excetuando o câncer de pele não melanoma, os cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide estão entre os principais (MATHERS et al., 2003; INCA, 2019).

Em relação a incidência de casos por Região Brasileira, os dados demonstram que a Região Sudeste acumula mais de 60% dos casos, enquanto as regiões Nordeste e Sul apresentam, respectivamente, 27,8% e 23,4% dos diagnósticos. Nas

Regiões Sul e Sudeste, predominam os cânceres de próstata e mama, além de pulmão e intestino. Na Região Centro-Oeste, embora similar, o perfil epidemiológico inclui o câncer do colo do útero e o de estômago. Já nas Regiões Norte e Nordeste a prevalência do câncer do colo do útero e de estômago são evidentes, juntamente com os cânceres de próstata e mama (INCA, 2020a).

Nesse contexto, medidas de prevenção primária devem receber atenção especial, uma vez que buscam evitar a ocorrência da doença, utilizando estratégias para reduzir a exposição aos fatores de risco (FEITOSA; PONTES, 2011; KEY; REEVES, 2016). No intuito de reforçar essas ações, a prevenção secundária se mantém voltada para a vigilância epidemiológica, intermediada por exames de rotina. Esta também tem por finalidade alterar o curso da doença por meio de intervenções que permitam a detecção precoce e o tratamento oportuno. Apesar de não prevenir a causa inicial, pode controlar sua progressão. Por isso, programas de rastreio estão em vigor para conscientizar a população quanto à importância da periodicidade dos exames. Por fim, a prevenção terciária visa agilizar a detecção do câncer em pacientes que já apresentam sintomas. Após detectado, ações devem ser implementadas para reduzir prejuízos funcionais, nas quais inclui reabilitação. A técnica escolhida dependerá da gravidade do quadro (FORMAN et al., 2018).

1.2 Estratégias de tratamento

O tratamento é uma etapa crucial na busca pela cura do câncer, aliando sempre as alternativas existentes com os recursos disponíveis. Além disso, são priorizadas decisões multidisciplinares que considerem as particularidades do paciente (WHO, 2020; KUDO et al., 2015). Dentre as principais alternativas adotadas estão cirurgia, terapia sistêmica (quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo e imunoterapia), radioterapia, medicina nuclear, transplante de medula e terapia celular. A quimioterapia permanece amplamente utilizada, especialmente em casos mais agressivos, de modo que se encontra disponível um vasto leque de substâncias químicas (BRASIL, 2019).

Registros afirmam que o primeiro fármaco antineoplásico foi obtido a partir do gás mostarda, usado como arma química na Primeira Guerra Mundial para o tratamento de linfomas. Contudo, apenas em 1946 surgiram as primeiras publicações clínicas sobre seus efeitos nos pacientes (SILVA et al., 2015).

Atualmente, os quimioterápicos podem atuar sobre ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e enzimas. Em sua maioria, causam danos ao DNA, os quais não são reparados, induzindo as células à apoptose. Esses agentes podem ser classificados conforme seu mecanismo de ação e estrutura química (Tabela 1) (O'CONNOR, 2015; REDDY; COUVREUR, 2010).

Tabela 1. Principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer.

Classificação	Fármacos	Mecanismo	Referência
Alquilantes	Ciclofosfamida Ifosfamida Dacarbazina	Alquilação da base nitrogenada guanina	EMADI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2005
Antibióticos	Doxorrubicina Mitomicina Bleomicina	Intercalação nas bases impedindo a replicação nucleotídica e a ação de polimerases	RANG et al., 2007; GAO et al., 2020
Anticorpos Monoclonais	Lapatinibe Pertuzumabe Trastuzumabe	Interagem com sítios específicos de determinado antígeno diminuindo fatores de crescimento tumoral	ZARDAVAS et al., 2013; ZAHAVI; WEINER, 2020
Antimetabólitos	Gemcitabine Metotrexate Fluorouracil	Inibição da síntese de nucleotídeos, bloqueando a replicação e proliferação celular	PETERS et al., 2000; LU et al., 2020
Antraciclinas	Daunorrubicina Epirubicina Idarrubicina	Bloqueio da topoisomerase II causando quebras da fita dupla de DNA	CAI et al., 2019; JASRA; ANAMPA, 2018
Complexos Metálicos	Cisplatina Carboplatina Oxalapatina	Geram lesões no DNA por meio da formação de adutos que inibem a replicação e a transcrição	CHABNER; CALABRESI, 1995; BARRA; NETTO, 2015
Inibidores da mitose	Docetaxel Paclitaxel Vinorelbina	Conferem estabilidade nos microtúbulos induzindo apoptose	OLSON et al., 2017; BRANDÃO et al., 2010; RANG et al., 2016
Inibidores de topoisomerasas	Topotecan Etoposide Rubitecan	Indução da quebra do DNA por tensão	BRANDÃO et al., 2010; YOU; GAO, 2019
Taxanos	Docetaxel Paclitaxel	Estabilizam os microtúbulos impedindo a quebra e consequentemente a divisão celular	WILLSON et al., 2019; MOSCA et al., 2021

Embora haja uma evolução constante dos quimioterápicos disponíveis para tratamento dos diferentes cânceres, ainda existem alguns desafios que devem ser

considerados, como por exemplo, a superação das vias de resistência e a diminuição dos efeitos colaterais (GARCEZ et al., 2016; TWOMEY et al., 2017). Vale lembrar que as células tumorais regulam a expressão de proteínas, inibem a apoptose, ativam mecanismos de efluxo da droga, inativam o fármaco e alteram alvos biológicos, padrões epigenéticos e vias de reparo. Todos esses mecanismos dificultam a atuação dos quimioterápicos (RAMOS; BENTIRES-ALJ, 2015; PAN et al., 2016). Concomitantemente, a quimioterapia pode causar efeitos colaterais, como queda de cabelo, diarreia, feridas na boca, náuseas, vômitos e aumento da sensibilidade. Logo, ações voltadas para contornar tais reações são necessárias (CHOPRA et al., 2016).

À medida que os mecanismos de resistência e as respostas terapêuticas têm sido caracterizadas, os ciclos de tratamento podem ser mais bem delineados, alvejando maior eficácia. Nesse contexto, a busca por novas estratégias de tratamento é oportuna, visando sempre a otimização dos regimes terapêuticos (THUNDIMADATHIL, 2012; ZUGAZAGOITIA et al., 2016).

2 CÂNCER DE MAMA

2.1 Aspectos epidemiológicos e fatores de risco

Em 2020, o CM acometeu mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo. Sua incidência alcançou 11,7% do número total de casos da doença e a taxa de mortalidade chegou a 6,9%. Esses dados colocam esse tumor entre os mais prevalentes no *ranking* mundial. No mesmo período, o CM foi o segundo mais incidente no Brasil perdendo apenas para os tumores de pele não melanoma. Somente em 2020, foi estimada uma incidência de 66.280 casos, o que representa 61,61 casos a cada 100.000 mulheres. Esses valores também foram estimados para os anos 2021 e 2022 (IARC, 2020; INCA, 2020b).

Para 2023, estima-se 73.610 novos casos de CM, representando uma incidência de 41,89 casos por 100.000 mulheres. Quanto a taxa de mortalidade mais recente, foi calculado 11,84 óbitos/100.000 mulheres, em 2020, sendo as maiores

taxas nas regiões Sudeste e Sul, com 12,64 e 12,79 óbitos/100.000 mulheres, respectivamente (INCA, 2022).

É evidente que o aumento nos índices de CM esteja relacionado ao acesso às tecnologias de diagnóstico, como a mamografia (KEY; REEVES, 2016; HUGHES et al., 2020). Contudo, é importante salientar o papel dos fatores de risco no aumento do número de casos. Delinear esses fatores pode priorizar a definição dos grupos mais susceptíveis. Além disso, o conhecimento pode conduzir às mudanças de hábitos, controlando os dados epidemiológicos (KERR et al., 2017).

A idade é o fator de risco mais bem estabelecido. O envelhecimento promove mudanças fisiológicas na mama, como o aumento da sensibilidade ao estrogênio, alterações das células epiteliais, senescência imunológica e modificações no microambiente tumoral, o que contribui para o aumento da predisposição ao CM (LODI et al., 2017). Outros fatores também se destacam como obesidade, status hormonal, histórico familiar, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, padrão reprodutivo, raça e etnia (MAKAMA et al., 2017).

Alcoolismo, tabagismo, sedentarismo, exposição a agentes carcinógenos, como radiação e metais tóxicos, e o consumo excessivo de alimentos industrializados colaboram para o cenário da doença (DESANTIS et al., 2017; NELSON et al., 2012). Por fim, aspectos gestacionais, perfil socioeconômico, acesso ao sistema de saúde, disponibilidade de tratamento, fatores culturais, comorbidades e aderência ao tratamento também são essenciais no perfil clínico das pacientes (DANFORTH, 2013).

Dentre as principais medidas preventivas, os exercícios regulares atuam como um meio de equilíbrio do balanço energético e previne o acúmulo de gorduras, a qual está diretamente ligada à síntese de hormônios (KERR et al., 2017; FENG et al., 2018). Substâncias alcoólicas também aumentam o estrogênio circulante e seus metabólitos. Além disso, essas substâncias causam o aumento da proliferação das células tumorais e regulam citocinas como interferon (IFN) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (WANG et al., 2017).

2.2 Anatomia e Fisiologia da Mama

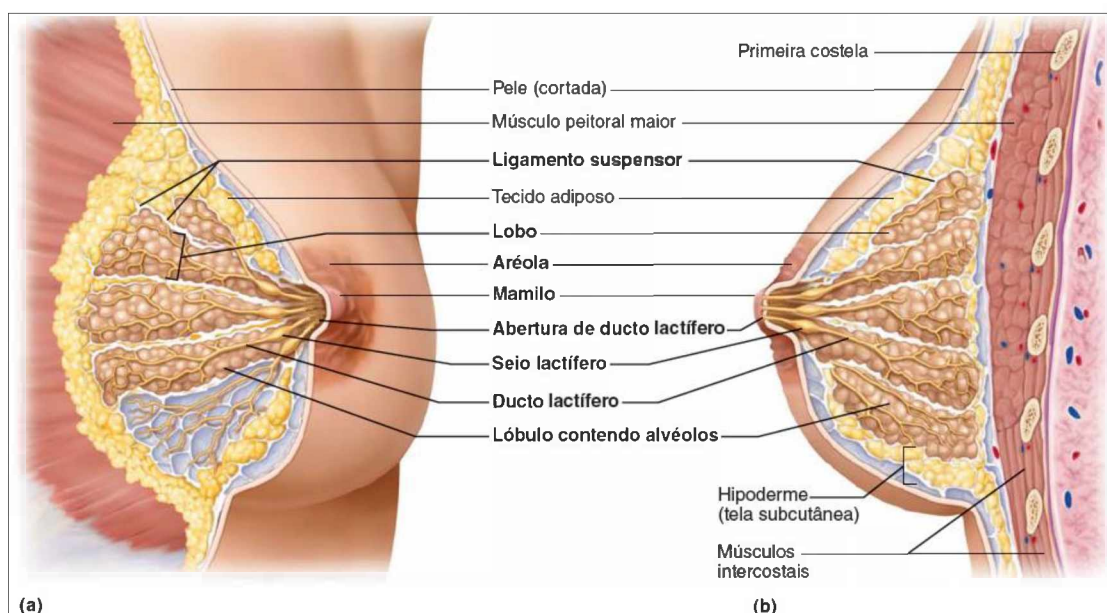
A mama ou seio é uma glândula exócrina de diâmetro variável que se encontra na porção anterior aos músculos do peitoral maior e serrátil inferior. Sua

estrutura é acoplada por uma camada da fáscia constituída de tecido conjuntivo denso não modelado. Esse órgão possui três tipos de tecidos: glandular (parenquimatoso), adiposo e fibroso (estroma) (TORTORA; NIELSEN, 2013).

A glândula mamária (Figura 1) é formada por 15 a 20 lobos que convergem para os ductos de excreção, também conhecidos por ductos lactíferos. Esses ductos são comumente encontrados nos seios lactíferos sob estado de dilatação. Cada ducto converge e se abre na parte externa do mamilo, uma região proeminente, innervada e lubrificada pelas glândulas sebáceas. Já os lobos são constituídos de compartimentos menores (lóbulos), compostos pelos alvéolos, sendo estes os responsáveis pela produção do leite (SOBOTTA, 2013).

Histologicamente, com exceção do polo basal que é formado por uma camada de células mioepiteliais, os demais epitélios como o alveolar e o dos ductos são revestidos por uma dupla camada de células colunares e por uma bainha de tecido conjuntivo com células mioides (JUNQUEIRA et al., 2017). A presença das células esteladas também se faz fundamental para a realização dos movimentos de contração para impulsionar o leite (PANDYA; MOORE, 2011). Durante a puberdade o estrógeno estimula o crescimento e ramificação dos ductos, além de auxiliar na deposição de adipócitos nos tecidos, influenciando no tamanho e formato das mamas (PANDYA; MOORE, 2011, TORTORA; NIELSEN, 2013).

Figura 1. Estrutura anatômica da mama feminina. (a) Vista anterior de uma mama normal parcialmente dissecada. (b) Corte sagital da mama demonstrando lóbulos e alvéolos.



Fonte: Adaptado de MARIEB; HOEHN (2014).

Quanto ao tecido adiposo, este expressa as enzimas citocromo p450 (CYP19), estimulando a síntese de estrógenos e andrógenos. Vale lembrar que durante a gestação ocorre o aumento da produção de hormônios, da ramificação dos canais, além do desenvolvimento dos lóbulos mamários. Existem outros hormônios que também colaboram para a fisiologia das mamas, como o hormônio do crescimento (GH), a prolactina (PRL), os glicocorticoides (cortisol) e a insulina (HALL; GUYTON, 2017).

O sistema linfático se faz presente e desempenha uma função essencial ao órgão. A drenagem linfática da mama é comandada por uma rede de linfonodos axilares que atua no transporte de produtos da linfa. Junto a essa rede, estão também os linfonodos interpeitorais e frênicos, que se localizam logo abaixo da parede torácica anterior. Embora essa densa rede de vasos seja responsável por filtrar a linfa, eliminando as impurezas produzidas pelas células, pode facilitar a disseminação tumorigênica. A proliferação das células epiteliais neoplásicas, muitas vezes, pode se restringir tanto aos ductos mamários, quanto aos lóbulos, contendo ou não evidências de invasão além da membrana basal. Entretanto, a evolução do CM pode contar com o comprometimento dos linfonodos próximos à região permitindo sua expansão para outros tecidos (SOBOTTA, 2013; ZHANG et al., 2017b; PLICHTA et al., 2018).

2.3 Fisiopatologia

São descritos dois modelos fisiopatológicos que explicam o desenvolvimento do CM: (i) a evolução clonal esporádica e (ii) o modelo de células-tronco cancerígenas (CSC). O primeiro defende que qualquer célula epitelial da mama pode sofrer mutações aleatórias e, conforme as alterações genéticas e epigenéticas acontecem, as células podem ser selecionadas, contribuindo para a formação do tumor. No segundo modelo, apenas células-tronco e progenitoras podem iniciar e manter a progressão da neoplasia maligna. Vale ressaltar que as CSC podem gerar diferentes subtipos de CM (BADVE; NAKSHATRI, 2012; PAPACCIO et al., 2017), em geral mais agressivos (BOMBONATI; SGROI, 2011).

O sinal mais característico do CM é a presença de um nódulo, em geral indolor, rígido e com bordas irregulares. Porém, podem ser macios e arredondados, ou até mesmo dolorosos. Por este motivo, qualquer alteração mamária deve ser

verificada por um profissional de saúde. Também podem ser sintomas: inchaço total ou parcial da mama, irritação da pele ou ondulações, dor na mama ou mamilo, retração do mamilo, vermelhidão, descamação e espessamento da mama e secreção pelo mamilo (BENSON et al., 2020).

O diagnóstico inclui métodos por imagem, como mamografia, ultrassom (USG), ressonância magnética da mama (RM) e radiografia gama específica. Porém, o diagnóstico por imagem pode não ser suficiente para elaboração de um laudo, sendo, assim, necessário utilizar outros recursos como a análise histopatológica da peça cirúrgica proveniente de biópsia ou cirurgia aberta (JESINGER, 2014). A biópsia consiste na remoção de uma pequena porção de tecido realizada por punção aspirativa por agulha fina (PAAF); agulha grossa (Core biopsy); ou cirurgicamente (ALIMIRZAIE et al., 2019; ACS, 2019a; BENSON et al., 2020) para confirmação do diagnóstico.

Histologicamente, os tumores mamários podem ser divididos em invasivos e *in situ*. Os invasivos são potencialmente mais agressivos e com maior probabilidade de gerar metástases. Podem ser classificados em: ductal invasivo, lobular invasivo, medular, tubular, metaplásico, apócrino, papilar, mucinoso, cribriforme, adenoide cístico, polimorfo, mucoepidermoide e carcinoma neuroendócrino. Sendo o mais comum o carcinoma ductal invasivo (infiltrante), o qual atinge cerca de 80% dos casos (BACCHI; VIANA, 2019). Geralmente, se inicia em um ducto mamário, mas rompe sua membrana basal, com potencial metastático. Já o CM *in situ* possui melhor prognóstico, uma vez que não há o extravasamento da membrana basal, ficando restritos à mama (DRĂGĂNESCU; CARMOCAN, 2017).

Tumores mamários também são classificados molecularmente conforme a expressão de Receptores de Estrogênio (ER), Receptores de Progesterona (PR) e Receptores do Fator de Crescimento Epidermal Humano II (HER2) (BEGAM et al., 2017; CANGARA, 2016). São, então, definidos os Luminal A com ER e/ou PR positivos e HER2 negativos, com melhor prognóstico, altas taxas de sobrevivência e baixas taxas de recorrência. Os Luminal B são ER e/ou PR positivos, com maior capacidade proliferativa ($ki67 \geq 14\%$) e estratificados em HER2 positivos ou HER2 negativos. Possuem prognóstico mais preocupante, uma vez que pacientes com este subtipo são diagnosticados com tumores em estágios mais avançados e linfonodos positivos, além de maior porcentagem de mutações de p53. Os Triplo-Negativos (TNs) não expressam ER e PR e não possuem HER2 amplificado

(LEHMANN et al., 2016). Geralmente ocorre em mulheres mais jovens com pior prognóstico em comparação aos subtipos luminais. Já os HER2 possuem esse oncogene amplificado, com ER e PR negativos. Geralmente carregam mutação para p53 e menor sobrevida, com recorrência frequente e precoce, além de possuírem metástases (SAVCI-HEIJINK et al., 2015; CHO, 2016; FRAGOMENI et al., 2018).

Diante do amplo espectro de tumores mamários, é importante lembrar que o tempo de progressão para o desenvolvimento tumoral completo é indeterminado, podendo ser necessário muitos anos para que se torne evidente. Portanto, todas as variáveis devem ser consideradas, sejam estas morfológicas ou moleculares priorizando, sempre, uma maior sobrevida e menor sofrimento do paciente (CICCO et al., 2019).

2.4 Receptores de Estrogênio (RE)

Os receptores de estrogênio (RE) fazem parte da família dos receptores esteroidais, dividindo-se em duas classes: receptores nucleares e receptores de membrana. Ambos permanecem inativos quando não formam ligações com os hormônios. Isso porque dependem de fatores hormonais para sua ativação (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Embora dependentes de outros fatores, os RE apresentam uma estrutura com domínios variados e características funcionais semelhantes. A região A/B, por exemplo, é responsável pela ativação (AF-1) e encontra-se na região aminoterminal da molécula. Enquanto isso, a região C, que é o domínio de ligação ao DNA, localiza-se na porção central. A região D é onde a molécula do receptor se dobra. Os domínios E/F, participam do reconhecimento hormonal e da especificidade da resposta fisiológica, localizados na terminação carboxila (SMITH, 1998; YAŞAR et al., 2017).

Em geral, os RE são hiper-expressos na maioria das hiperplasias mamárias. Em condições saudáveis, as células epiteliais apresentam expressão de RE α , sendo diminuída durante a gestação, expressando menos de 5%. Esse valor aumenta na lactação, induzindo também o aumento de RE α . Em geral, os RE β podem ser encontrados em até 70% das células epiteliais de todos os estágios de desenvolvimento mamário. Durante gestação e fase de lactação, há uma co-

expressão dos receptores α e β em cerca de 60% das células epiteliais (SAJI et al., 2000; PORRAS et al., 2021).

A ausência ou presença dos RE é comumente utilizada para delineamento do tratamento, uma vez que, haja correlação direta entre os níveis de expressão dos RE e resposta à terapia endócrina. Sendo assim, determinar o painel gênico do paciente é imprescindível para tratamento, recuperação e aumento das chances de sobrevida do mesmo (BABAYAN et al., 2013).

2.5 Ações Preventivas e Terapêuticas

Conhecer a predisposição genética, buscar uma abordagem multidisciplinar de saúde, realizar mudanças no estilo de vida e gerir riscos são alguns dos métodos de prevenção mais eficazes, sobretudo considerando o CM. As mudanças no comportamento alimentar, aliadas ao uso da terapia e da cirurgia preventiva, podem oferecer maiores chances de cura para mulheres acometidas pela doença (THORAT; BALASUBRAMANIAN, 2019).

Em estágios iniciais é possível a realização da cirurgia conservadora da mama ou até mesmo a mastectomia completa (MC). Estudos clínicos têm demonstrado uma redução de 90% dos quadros de recidiva em mulheres que se submetem à cirurgia. Ao mesmo tempo, revelam decréscimo de 81% a 94% no risco de morte por este tipo de câncer. Entretanto, apesar de curativa, a MC pode afetar a autoestima da paciente (COSTA; SALDANHA, 2017; CAVALCANTE et al., 2020).

As cirurgias conservadoras da mama também são conhecidas por tumorectomia, quadrantectomia, mastectomia parcial ou mastectomia segmentar. Estas consistem na retirada do segmento ou setor do órgão em que se encontra a lesão. O intuito é remover o tecido comprometido com o normal adjacente. O quanto da mama é removida dependerá do tamanho e localização do tumor (ACS, 2019b; JAGSI et al., 2019).

Mulheres com alta predisposição devem considerar ainda medidas preventivas como exames de rastreamento por imagem (principalmente mamografia); mudanças do estilo de vida (modificação dietética e prática de exercícios físicos) e quimioprevenção (uso de anastrozol, raloxifeno e tamoxifeno). Vale lembrar que essas ações devem ser julgadas conforme as condições da

paciente, podendo ser adotados métodos combinados (COSTA; SALDANHA, 2017; SAUTER, 2018).

No caso de pacientes metastáticas, são utilizadas terapias sistêmicas que incluem hormonioterapia, terapia direcionada, imunoterapia e/ou quimioterapia (ACS, 2015). A terapia hormonal é empregada em tumores positivos para ER, uma vez que respondem ao estímulo estrogênico, o qual promove sua progressão. Basicamente, há dois mecanismos de ação para a hormonioterapia que incluem o bloqueio do receptor e da produção de estrogênio (WLUDARSKI et al., 2011; JAGSI et al., 2019).

Enquanto isso, a terapia direcionada busca interromper a ação de moléculas essenciais para o crescimento das células cancerígenas. Consequentemente, afeta as células transformadas, preservando as normais (ALESSANDRINI et al., 2018). Essa estratégia acontece em tumores que superexpressam HER2 com administração do anticorpo monoclonal anti-HER2 (PARAKH et al., 2020). Já em tumores TN têm sido utilizados inibidores de PARP (Poli adenosina difosfato-ribose polimerase) para aquelas pacientes com *BRCA* mutado (JAVLE; CURTIN, 2011; ABDEL-RAZEQ et al., 2021).

No que se refere a imunoterapia, esta tem o objetivo de potencializar o sistema imunológico de modo a combater determinados tipos de doenças. No caso do CM, destaca-se o anticorpo monoclonal anti-PDL1. A expressão aberrante de PD-L1 em tumores estimula o desenvolvimento de estratégias terapêuticas projetadas para impedir a ligação de PD-1 a PD-L1, potencialmente imunossupressora (ANTONIA et al., 2016). Inibidores de PD-L1, como o atezolizumabe, bloqueiam essa proteína, promovendo o aumento da resposta imunológica, o que reduz e retarda o crescimento tumoral (WRAITH, 2017; SCHMID et al., 2018; KOURY et al., 2018).

Por fim, a quimioterapia inclui medicamentos administrados por via oral ou intravenosa em ciclos e combinações pré-definidas. (FALZONE et al., 2018; ABBAS; REHMAN, 2018). A vantagem da quimioterapia é o seu tempo de resposta, contudo, carece de especificidade. Além disso, a combinação com outras terapias pode potencializar sua eficácia. Como de costume, se o paciente não responder ao primeiro quimioterápico ou a combinação de medicamentos, uma segunda ou terceira droga deve ser administrada. É comum pacientes serem submetidos a mais

de um esquema de quimioterapia durante o tratamento, principalmente em casos metastáticos (HEMMATZADEH et al., 2016; SHAKED, 2019; CHI et al., 2019).

Diante da diversidade e complexidade dos tipos de tratamentos, diferentes protocolos foram desenvolvidos para garantir que os pacientes recebam o cuidado mais seguro e eficaz. Dessa maneira, assegura-se que o paciente receba uma abordagem terapêutica padronizada, desenvolvida e otimizada por estudos clínicos. Isso permite a comparação de novos medicamentos com tratamentos já estabelecidos, confirmando, assim, a eficácia de novas estratégias (ALESSANDRINI et al., 2018; BRAVO et al., 2021).

2.5.1 Tamoxifeno (TAM) e a Hormonioterapia

O tamoxifeno (TAM) é um fármaco modulador não-esteróide pertencente à classe trifeniletilênica, cuja fórmula molecular é $C_{26}H_{29}NO$. O isômero Z do TAM apresenta potencial antiestrogênico, sendo este, comercializado como isômero puro. Em isômero E, observa-se notória atividade estrogênica quanto a inibição da proliferação de células do carcinoma mamário humano. Também pode ocorrer aumento da liberação de prolactina de células hipofisárias (WILLIAMS; STANCEL, 1996; PATEL et al., 2022).

O efeito farmacológico desempenhado pelo TAM depende do tipo de receptor, de onde está ocorrendo a interação e do tecido em que o receptor está sendo expresso. Tal fármaco pode se comportar como agonista, agonista parcial ou, ainda, como um antagonista, dependendo da finalidade. Em células de câncer de mama, o TAM impede a proliferação das células agindo como antagonista do estrogênio, entretanto, como agonista parcial, pode estimular a proliferação das células endometriais, elevando as chances de neoplasia endometrial (WILLIAMS; STANCEL, 1996; AHMAD, 2018).

É comum o uso do TAM no tratamento do CM devido seu mecanismo antagonista em células mamárias. Este fármaco é indicado tanto para mulheres pós-menopáusicas quanto pré-menopáusicas, que apresentem tumor RE positivo. A indicação se deve pelo fato da maioria das mulheres que apresentam RE negativo não respondem ao tratamento com TAM (JORDAN, 2003; RANI et al., 2019).

Dentre os mecanismos apresentados pelo TAM, destacam-se a capacidade de inibição da síntese do DNA e indução de apoptose, podendo também ocasionar

bloqueio das células na fase G1/G0 do ciclo celular (KEETON; BROWN, 2005). Um outro mecanismo pelo qual o TAM regula a tumorigênese nas células mamárias, é por meio da transcrição de genes ligados à receptores hormonais. No complexo fármaco-receptor, o RE torna-se ativo, formando dímeros que se ligam ao Elemento de Resposta ao Estrogênio (ERE), o que provoca mudanças conformacionais no domínio aminoterminal do RE. Essas alterações interagem com fatores de ativação transcricional, levando a ativação da transcrição. Entretanto, na presença do TAM, o quimioterápico impede o processo de transcrição, interferindo no ciclo celular (PARK; JORDAN, 2002; OKAT, 2018).

É importante lembrar que o TAM também se liga a outros receptores não nucleares presentes na membrana plasmática e no citoplasma das células mamárias, assim como regula a transcrição de outros genes através de sítios alternativos presentes na molécula de DNA, como o AP-1 (OSBORNE; SCHIFF, 2005).

3 COMPLEXOS METÁLICOS

É conhecida por química de coordenação o estudo dos íons metálicos e suas interações com ligantes químicos. Essa área de estudo se resume aos metais que são acondicionados pelas ligações de coordenação com ligantes previamente direcionados, ativados e polarizados pelas interações com íons de interesse (COTTON; WILKINSON, 1980). Desse modo, a associação entre íons metálicos e ligantes permite a produção de compostos amplos com múltiplas geometrias e estados oxidativos variáveis. Além disso, os aspectos inerentes ao íon metálico somados à cinética e termodinâmica da substância, viabilizam a obtenção de estruturas moleculares com larga reatividade, a qual necessita ser investigada, sobretudo, para o tratamento de doenças (ROCHA et al., 2011; SRIVASTVA, 2020).

De acordo com Shriver (1994) e colaboradores, o conceito “complexo” designa um grupo de estruturas que apresentam um átomo ou íon central envolvido por seus ligantes. Este deve possuir a habilidade de coordenar diferentes metais e íons. Na estrutura final obtida também podem ser inseridos constituintes sem fins de complexação, permitindo solubilidade em vários solventes. A ligação central da

molécula com as imediações dos ligantes geralmente é realizada por um heteroátomo (N, S, O, P, As), um grupo funcional de coordenação, um heterocíclico ou através de ligações simples, duplas ou triplas (GONZÁLEZ-GALLARDO et al., 2012; DURNDELL; ANTONANGELO, 2020). Nesse contexto, a formulação dos novos ligantes é considerada o passo mais importante no desenvolvimento dos complexos metálicos quando pouco se conhece sobre suas propriedades (LAWRANCE, 2010). A projeção de biomoléculas exige planejamento minucioso, uma vez que a adição de átomos ao novo ligante pode gerar contratempos na solubilidade, diminuição da velocidade de reação e flexibilização dos ângulos, além de reações indesejadas (BENITE et al., 2007; BUDZISZ, 2019).

O metal presente no centro da molécula desempenha papel crucial na definição das interações do complexo, em virtude de sua interferência nas propriedades químicas e físicas, no controle da cinética de montagem e na inércia do composto. Os centros metálicos cineticamente inertes são utilizados como blocos de construção para complexos pré-formados. Enquanto isso, os íons metálicos lábeis são comumente encontrados em reações espontâneas de automontagem (CONSTABLE, 2007; SRIVASTVA, 2020).

Manter as funções essenciais de uma célula ao mesmo tempo que se altera o material genético pode ser desafiador. Por isso, é importante entender a energia de associação da molécula de DNA ao complexo metálico, utilizando os princípios de ligação. Em geral, as associações entre DNA e complexos metálicos são induzidas por ligações não-covalentes, como intercalação (π - π) entre bases do DNA, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças de Van der Waals. Estas forças dependem de algumas variáveis incluindo temperatura, pH, pressão e concentração de sal (ERKKILA et al., 1999; SPERLING; PARAK, 2010; ZHOU et al., 2017).

Em razão das propriedades únicas dos metais, a gênese de novos fármacos pode seguir um outro rumo superando grande parte dos medicamentos convencionais. O estudo dos complexos metálicos de transição, bem como a busca de medidas de direcionamento e ativação, deve guiar a produção dos novos fármacos a superarem as desvantagens das terapias atuais. Considera-se a busca a integração entre a redução dos efeitos colaterais e superação da resistência. Sendo assim, a química medicinal aliada as pesquisas interdisciplinares devem explorar os aspectos farmacológicos dos metalofármacos, esclarecendo seus mecanismos e vias de ação nos vários sistemas biológicos (SODHI; PAUL, 2019).

3.1 Complexos à Base de Cobre (Cu)

O cobre é um metal de transição maleável, pertencente ao grupo 11 da tabela periódica. É um elemento dúctil e com grande resistência à corrosão. Possui a capacidade de formar uma rica variedade de compostos com estados de oxidação +1 e +2 (CONRY, 2011). A coordenação varia conforme seu estado, podendo apresentar número de coordenação quatro com estrutura central tetraédrica distorcida. Outros tipos de geometria comum são a tetragonal distorcida no plano equatorial e a estrutura quadrado planar octaédrica distorcida (KRASNOVSKAYA et al., 2020).

A importância do Cu para os seres vivos pode ser observada pelo número de proteínas e enzimas que dependem desse metal para manutenção dos seus processos biológicos. Estima-se que o corpo humano tenha cerca de 80 mg de cobre e somente 10^{-18} M destes íons estão livres, ou seja, não permanecem ligados a uma proteína carreadora ou aminoácido (KAIM, 2003; OSREDKAR; SUSTAR, 2011).

Em geral, as concentrações dos elementos químicos se mantêm estáveis em homeostase. Até mesmo para íons essenciais existe um ponto de saturação a ser tolerado pelo organismo (KAIM et al., 2013). Nesse caso, ao ultrapassar esses limites, o excesso deve ser eliminado. Em concentrações muito elevadas, há o comprometimento do sistema de defesa, causando toxicidade. Esta pode estar relacionada a alguns fatores como bloqueios de grupos funcionais, deslocamento de outros metais e alteração da conformação de sítios ativos e estruturas quaternárias (TAMÁS et al., 2014; AHMEDOVA, 2018).

Tendo em mente as funções essenciais do Cu em meio biológico, podem-se destacar o transporte de elétrons, o metabolismo do oxigênio e a oxidação de substratos como catecóis e fenóis. A sintetização de compostos de coordenação de Cu tem sido ampliada graças à melhor compreensão do comportamento bioinorgânico deste íon no organismo humano. Desde então, percebeu-se que alguns complexos de Cu podem ser empregados como drogas antitumorais (BORGES et al., 2016; POLLONI et al., 2019; ERXLEBEN, 2018). De fato, compostos metálicos à base de Cu vêm sendo cada vez mais explorados pela indústria. Complexos como hidroxiquinolina $[\text{Cu}(\text{8-OHQ})_2]$, clioquinol (CQ) $[\text{Cu}(\text{5-Cl-7-I-8-HQ})]$, Dp44mT (di-2-piridilcetona-4,4-dimetil-3-tiossemicarbazona) e

as casiopeínas $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ estão entre os principais exemplos utilizados no tratamento antitumoral. Dentre seus mecanismos de ação destaca-se a inibição do proteassoma, permitindo, então, a indução da apoptose das células cancerosas (BRAVO-GÓMEZ et al., 2015; PAPE et al., 2018; ZHANG et al., 2017a). Além disso, alguns desses complexos medeiam vias de autofagia induzidas por estresse e atuam no reparo molecular através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) citotóxicas (JANSSON et al., 2010, ZUO et al., 2013). Existem ainda outras vias de interação ligadas à afinidade desses complexos ao DNA, sendo a atividade antineoplásica justificada pelas ligações intercalativas (BRAVO-GÓMEZ et al., 2015; ZHOU et al., 2017).

Diante das potencialidades dos complexos à base de Cu, é de extrema importância buscar novas propriedades terapêuticas que ainda foram pouco exploradas, especialmente na oncologia. Atualmente, existem fármacos em ensaios clínicos que se destacam por seu baixo custo e maior eficácia no controle de tumores (ONG et al., 2019; KRASNOVSKAYA et al., 2020).

3.2 Complexos à Base de Níquel (Ni)

O níquel é um metal branco prateado, inerte na forma maciça e não reagente à água em temperatura ambiente. Este elemento pertence ao grupo 10 da tabela periódica, possuindo estados de oxidação $2+$ e $3+$ e número de coordenação quatro (BARCELOUX, 1999). Quanto a química de coordenação, esse elemento químico possibilita a obtenção de complexos tetraédricos ou quadrados planar. Alguns compostos octaédricos também podem ser comuns. Na maioria das vezes, os complexos a base de níquel são favorecidos pela geometria quadrado planar, em que o ligante é disposto pelo plano geométrico deixando, então, o orbital de alta energia livre (HILL et al., 2020). No corpo humano adulto, considerando condições fisiológicas normais, os íons de níquel estão presentes em baixa quantidade, constituindo aproximadamente 1 mg em uma pessoa de peso médio (SHARMA, 2013).

Os compostos à base de platina (Pt) são bem conhecidos e amplamente utilizados no tratamento de neoplasias. Entretanto, os efeitos colaterais graves, a toxicidade e os mecanismos de resistência estimulam a busca por melhores alternativas terapêuticas. Como tal, o Ni exibe a mesma configuração eletrônica e se

faz análogo a platina. Uma vantagem do Ni é a capacidade de adotar diferentes geometrias de coordenação cis ou trans, enquanto a Pt constitui somente complexos planos quadrados cis ou trans (MUÑOZ-PATÍÑO et al., 2020).

As funções biológicas do Ni podem ser as mais diversas. Este metal encontra-se frequentemente associado a ativação da calcineurina, formação de GMP cíclico (cGMP) e transmissão do código genético (DNA e RNA) (GUO et al, 2015). Além disso, atua na composição da urease, na formação de monóxido de carbono (CO) e desidrogenase, sendo também, cofator de enzimas relacionadas a quebra e utilização da glicose (AL-FARTUSIE; MOHSSAN, 2017). Embora o desempenho do Ni ainda não esteja claro, acredita-se que ele é um importante estimulador do metabolismo por meio do ferro (Fe) e da hemoglobina, agindo sinergicamente com outros metais na composição de estruturas ósseas, regulação hídrica, excitabilidade celular e autoimunidade (GUO et al, 2015; ZAMBELLI; CIURLI, 2013).

Dentre os complexos de Ni existentes, pode-se enfatizar aqueles constituídos por ditiocarbimatos, fosfinas e benzimidazol. Cada qual possui suas particularidades, apresentando efeitos variados por meio de modificações dos grupos ligantes e da substituição de cátions. Seguindo o princípio do efeito citotóxico, os complexos de Ni podem apresentar menor efetividade comparados a cisplatina, porém sua seletividade se mostra superior. Além disso, demonstram outros efeitos incluindo ação anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana, antioxidante e antiproliferativa (ALI et al., 2012; ORVIG; ABRAMS, 1999; HERRERA et al., 2019).

Nesse contexto, os metais de transição exibem grande potencial como agentes antitumorais e, por isso, a gênese de metalofármacos à base de níquel é de suma importância devido à sua alta biocompatibilidade para interagir com moléculas alvo. Essa interação fornece informações úteis sobre os aspectos estruturais que determinam a eficácia terapêutica dos medicamentos, assim como sua farmacologia. Portanto, compreender a interação dos alvos com os complexos metálicos é essencial para a validação de novas drogas (MURALISANKAR et al., 2016).

3.3 Ligantes Químicos

Um ligante é definido como toda molécula ou átomo capaz de se ligar a uma molécula receptora, modulando seus efeitos. Tais respostas, no meio intracelular,

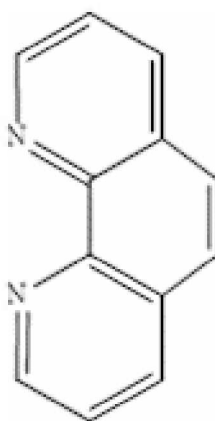
podem culminar em diferentes comportamentos, ao interferir nos processos de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação (ŁĘCZKOWSKA et al., 2018).

A fenantrolina (Figura 2), por exemplo, também conhecida por 1,10-fenantrolina ou orto-fenantrolina (Fen) é um ligante heterocromático com fórmula molecular $C_{12}H_8N_2$ e massa molecular de $180,3 \text{ g/mol}^{-1}$. Esse ligante se apresenta como cristais incolores com ponto de fusão de 117°C . Além disso, está entre os principais utilizados em pesquisas de química de coordenação, graças à facilidade de formar complexos com diferentes metais e a posição que seus átomos de nitrogênio se encontram (BENCINI; LIPPOLIS, 2010).

A molécula de Fen possui dois sítios de coordenação e dois átomos de hidrogênio que formam a base da dureza. Por esse motivo, sua polarizabilidade média pode se coordenar com o Bismuto (III) e outros íons lantanídeos trivalentes. Além disso, esse ligante é um ótimo quelante e cromóforo. Demonstra forte absorção da radiação eletromagnética e, por isso, é ideal para excitação de íons metálicos com baixa absorção molar (ALREJA; KAUR, 2016).

A atividade biológica da Fen varia conforme o íon que ao qual se liga. De maneira geral, propriedades antibacterianas e antifúngicas estão comumente presentes em compostos com ligante Fen. Devido aos seus anéis planares ricos em elétrons π , os quelatos metálicos de 1,10-fenantrolina têm uma grande tendência em interagir com o DNA por intercalação, a qual é definida pela inserção de uma molécula aromática ligada entre os pares de bases do DNA (MARVERTI et al., 2007; EREMINA et al., 2019).

Figura 2. Representação da estrutura química da Fenantrolina (Fen).

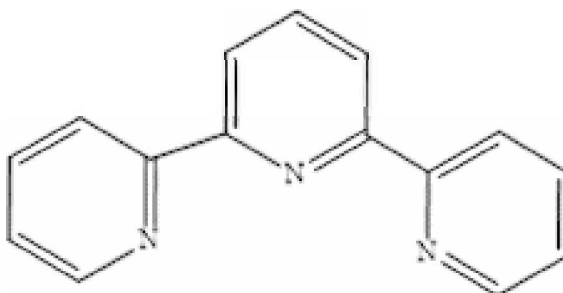


A 2,2';6',2''-terpiridina (Tpy) (Figura 3) é um ligante heterocíclico que se origina a partir da piridina, possuindo fórmula molecular $C_{15}H_{11}N_3$. A Tpy consiste em um sólido branco, solúvel em solventes orgânicos e está entre os principais ligantes da química de coordenação. Além disso, é um ligante tridentado que se liga em metais nos três sítios meridionais, dando origem a dois anéis quelatos. Também constitui complexos com a maioria dos íons de metal de transição, assim como outros compostos de polipiridina (KAMATA, et al., 2012; WEI et al., 2019).

Os complexos contendo Tpy exibem propriedades óticas e eletroquímicas características, incluindo transferência de carga do metal para ligante na região visível, redução e oxidação reversível e luminescência bastante intensa. Por serem aceptores de π , a Tpy, assim como a bipyridina, tende a estabilizar metais em estados de baixa oxidação (HOFMEIERA; SCHUBERT, 2004). No geral, a Tpy age como doadora de nitrogênio aos ligantes tridentados. Utilizando a ligação quelante como base, é necessário, ainda, que haja um ligante livre para alterar a conformação trans para cis, provocando respostas significativas a sua cinética de coordenação (CONSTABLE, 2007; PANEQUE et al., 2009).

Quanto às ações biológicas, a Tpy apresenta notória atividade antitumoral, exibindo citotoxicidade em células p53-mutante e Bax-mutante (KACAR et al., 2014). Além disso, alguns compostos que apresentam o ligante Tpy em sua estrutura revelam alta capacidade fotonucleásica destrutiva sob células cancerosas HeLa (BANIK et al., 2015; FIK et al., 2015).

Figura 3. Representação da estrutura química da Terpiridina (Tpy).

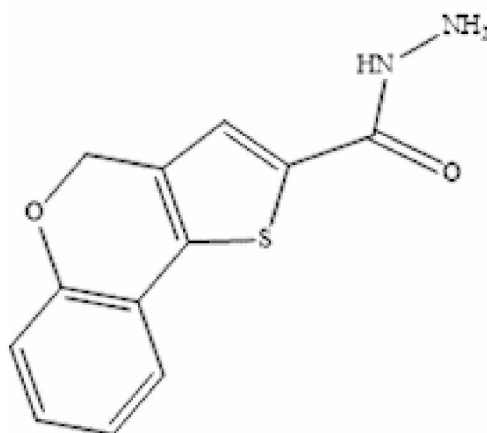


O benzotiofeno é um composto orgânico aromático com fórmula molecular C_8H_6S . Possui odor característico, semelhante ao naftaleno. Ocorre como constituinte de depósitos relacionados ao petróleo, como o alcatrão de linhita. Pode

ser encontrado em drogas farmacêuticas, como raloxifeno, zileuton e sertaconazol. Demonstra também ser um excelente precursor para reações químicas (KUHN et al., 2011; SUN et al., 2011).

Alguns tetrahydro benzotiofenos (Bth) apresentam atividades biológicas comuns como bactericidas, fungicidas, acaricidas e inseticidas, além de efeitos antivirais, antitumorais, anti-inflamatórios, anti-histamínicos e analgésicos (KERI et al., 2017). Um exemplo desse grupo é a benzopirano [4,3-b] tiofeno-2-ácido carboxílico hidrazida (Bth) (Figura 4). Esses derivados também podem atuar como inibidores da polimerase NS5B do vírus da hepatite C. Por isso, se faz necessária a busca por combinações análogas entre esses grupos ativos no intuito de desvendar possíveis efeitos farmacológicos promissores (ABDALHA et al., 2011).

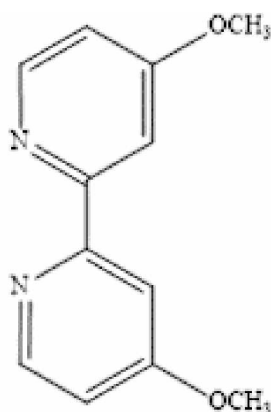
Figura 4. Representação da estrutura química do Tetrahydrobenzotiofeno (Bth).



Em relação a 2,2'-Bipiridina, esta é um ligante cuja fórmula molecular é $C_{10}H_8N_2$. Sólida e incolor, é comumente abreviada como bipy. A bipy é um dos vários isômeros advindos da bipiridina. Sendo um quelante bidentado, é capaz de formar complexos com vários metais de transição. Suas transições eletrônicas são atribuídas a estados excitados de transferência de carga metal-ligante (MLCT). Este tipo de transição é observada quando se tem complexos ligantes que possuem orbitais π de baixa energia, principalmente ligantes aromáticos. Em outras palavras, a transição ocorre em baixa energia e aparece no espectro visível se o íon metálico estiver em um estado de oxidação baixo, quando então, seus orbitais d estão próximos em energia dos orbitais vazios dos ligantes (ANJOMSHOA et al., 2019; EREMINA et al., 2019).

Complexos metálicos contendo ligantes bidentados, como o 4-4'-Dimetoxi-2'-2'-bipiridina (Dmb) (Figura 5) são de grande interesse no campo da química medicinal, especialmente no quesito atividade antitumoral. Sua fórmula molecular em específico é $C_{12}H_{12}N_2O_2$. Em geral, complexos compartilhados por este mesmo grupo abrangem uma ampla capacidade de intercalação com o DNA, o que permite ação ativa contra células neoplásicas. Além disso, estudos têm sugerido notória atividade antiparasitária para este ligante (WILLET et al., 2001; WHEATE et al., 2007; PAIXÃO et al., 2020).

Figura 5. Representação da estrutura química da Dimetoxibipiridina (Dmb).



4 METAIS NA MEDICINA

O desenvolvimento de fármacos é um campo amplo que envolve diferentes áreas, incluindo estudos funcionais das proteínas, busca de inibidores, isolamento de compostos com princípios ativos e síntese de drogas de interesse. Com o rápido crescimento e evolução da indústria farmacêutica, os compostos por coordenação têm se destacado (WHALEN et al., 2016).

Existem relatos do uso de metais no tratamento de doenças há mais de 5 mil anos, porém sua utilização na medicina foi impulsionada por Paul Ehrlich. Em 1909, Ehrlich introduziu o primeiro quimioterápico no tratamento da sífilis, tendo como base compostos arsênicos. O medicamento foi muito utilizado por muitos anos, até o surgimento da penicilina (ANTMAN, 2001; CALVO, 2006; MORRISON, 2010).

Estima-se que um terço das proteínas e enzimas do organismos demandam íons metálicos como cofatores para a execução de suas funções biológicas (BENITE et al., 2007). Os metais de transição, por exemplo, exibem diferentes estados de oxidação, o que permite interagirem com maior número de moléculas negativas, ampliando sua aplicação farmacológica. O avanço científico tem demonstrado progresso no uso de complexos metálicos como fármacos para tratar doenças humanas, como carcinomas, linfomas, diabetes, infecções e desordens neurológicas (WARRA, 2011). Muitos complexos apresentam efeitos que não são observados ao analisar seus ligantes isoladamente. Dessa maneira, suas propriedades biológicas estão relacionadas às combinações estruturais resultantes (LAWRANCE, 2010; PULLEN et al., 2021).

Alguns complexos metálicos potencializam processos específicos como oxidação e hidrólise, gerando atividade biológica. Entretanto, como qualquer agente químico, os metais podem acarretar patologias (BENITE et al., 2007; MOUBEEN et al., 2021). Portanto, as doses devem ser otimizadas pela modificação estrutural dos complexos, aumentando sua seletividade e reduzindo seus efeitos indesejados (NDAGI et al., 2017). Dentre os principais medicamentos utilizados no combate ao câncer estão os fármacos provenientes da platina, como a cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, lobaplatina, nedaplatina e heptaplatina (LIPPERT, 2013; SANTOS, 2014; ERXLEBEN, 2018).

É importante ressaltar que o Cu é um metal que se destaca por sua ação anti-inflamatória. Existem evidências de que os compostos de cobre podem exercer função protetora contra doenças reumáticas e há relatos de que os sais ligados ao carboxilato podem funcionar como agentes de proteção contra radiação (WEDER et al., 2002; LIPPERT, 2013; SZCZEPANIAK; FICHNA, 2019). Sobre o Ni, este possui papel bem definido no sistema biológico. Durante o desenvolvimento uterino, por exemplo, a baixa oferta deste metal prejudica intimamente o crescimento fetal. A deficiência de Ni também acarreta alterações bioquímicas que reduzem a reabsorção de Fe ocasionando alguns tipos de anemias. Vale lembrar ainda que o Ni pode ser encontrado nos ácidos nucleicos, especialmente no RNA. Acredita-se que este metal esteja envolvido na função e na estrutura de algumas proteínas (SHARMA, 2013; KUMAR; TRIVEDI, 2016).

São notórias as diferentes aplicações dos complexos metálicos além da atividade antitumoral. O uso dos metais no combate às inflamações crônicas e

agudas, nos tratamentos e prevenções de infecções e nos diagnósticos por imagem têm sido cada vez mais comum na medicina atual. Propriedades únicas como coordenação variada, diversidade estrutural e fácil funcionalização dos ligantes, estados redox versáteis e caracteres fotofísicos distintos podem produzir um grande número de complexos potencialmente terapêuticos (SANTOS, 2014; PRASAD et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z; REHMAN, S. An overview of cancer treatment modalities. **Neoplasms**, v. 1, p. 139-57, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76558>
- ABDALHA, A. A; ABOU EL-REGAL, M. K; EL-KASSABY, M. A; ALI, A. T. Synthesis of Some New Tetrahydrobenzo [b] thiophene Derivatives and Tetrahydrobenzothienopyrimidine Derivatives Under Microwave Irradiation. **Synthetic Communications**, v. 41, n. 19, p. 2811-2821, 2011. <https://doi.org/10.1080/00397911.2010.501479>
- ABDEL-RAZEQ, H; TAMIMI, F; ABUJAMOUS, L; EDAILY, S; ABUNASSER, M; BATER, R; SALAMA, O. Patterns and Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations Among Patients with Triple-Negative Breast Cancer: Regional Perspectives. **Cancer Management and Research**, v. 13, p. 4597, 2021. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S316470>
- ACS (American Cancer Society). **Breast Biopsy**. 2019a. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-biopsy.html>. Acesso em: 19 mai. 2021.
- ACS (American Cancer Society). **Breast Cancer Facts and Figures 2015-2016**. Atlanta: ACS, 2015.
- ACS (American Cancer Society). **Breast-conserving Surgery (Lumpectomy)**. 2019b. Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer/breast-conserving-surgery-lumpectomy.html#written_by. Acesso em: 21 maio 2021.
- AHMAD, I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, v. 143, p. 515-531, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.056>
- AHMEDOVA, A. Biomedical applications of metallosupramolecular assemblies—Structural aspects of the anticancer activity. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 620, 2018. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00620>
- ALESSANDRINI, L; PERIN, T; KADARE, S; DEL PUP, L; MEMEO, L; STEFFAN, A; COLAROSSO, L; BERRETTA, M; PAOLI, P; CANZONIERI, V. Cancer Targeted Therapy Strategy: The Pathologist's Perspectives. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 5, p. 410-420, 2018. <https://doi.org/10.2174/1568009618666171129145703>
- AL-FARTUSIE, F. S; MOHSSAN, S. N. Essential trace elements and their vital roles in human body. **Indian J Adv Chem Sci**, v. 5, n. 3, p. 127-136, 2017. <https://doi.org/10.22607/IJACS.2017.503003>
- ALIMIRZAIE, S; BAGHERZADEH, M; AKBARI, M. R. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. **Clinical genetics**, v. 95, n. 6, p. 643-660, 2019. <https://doi.org/10.1111/cge.13514>

ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A; REINA, L. del C. B; MONTANARI, C. A; DONNICI, C. L; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

ALREJA, P; KAUR, N. Recent advances in 1, 10-phenanthroline ligands for chemosensing of cations and anions. **RSC advances**, v. 6, n. 28, p. 23169-23217, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA00150E>

ANJOMSHOA, M; TORKZADEH-MAHANI, M; SAHIHI, M; RIZZOLI, C; ANSARI, M; JANCZAK, J; ESFAHANI, SHEILA SHERAFAT; ATAIEI, F; DEHKHODAEI, M; AMIRHEIDARI, B. Tris-chelated complexes of nickel(II) with bipyridine derivatives: DNA binding and cleavage, BSA binding, molecular docking, and cytotoxicity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 15, p. 3887–3904, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1534700>

ANTMAN, K. H. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. **The oncologist**, v. 6, p. 1-2, 2001. https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-suppl_2-1

ANTONIA, S. J; VANSTEENKISTE, J. F; MOON, E. Immunotherapy: beyond anti-PD-1 and anti-PD-L1 therapies. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 36, p. e450-e458, 2016. https://doi.org/10.1200/EDBK_158712

BABA, A. I; CĂTOI, C. **Comparative Oncology**. The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.

BABAYAN, A; HANNEMANN, J; SPOETTER, J; MUELLER, V; PANTEL, K; JOOSSE, S. A. Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75038, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075038>

BACCHI, C. E; VIANA, C. R. Histopathological and Immunohistochemical Classification of Invasive Breast Carcinomas. In: **Breast Diseases**. Springer, Cham, p. 237-247. 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13636-9_26

BADVE, S; NAKSHATRI, H. Breast-cancer stem cells—beyond semantics. **The lancet oncology**, v. 13, n. 1, p. e43-e48, 2012. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70191-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70191-7)

BALSA, L. M; RUIZ, M. C; DE LA PARRA, L. S. M; BARAN, E. J; LEÓN, I. E. Anticancer and antimetastatic activity of copper (II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 204, p. 110975, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191295>

BANIK, B; SASMAL, P. K; ROY, S; MAJUMDAR, R; DIGHE, R. R; CHAKRAVARTY, A. R. Terpyridine oxovanadium (IV) complexes of phenanthroline bases for cellular

imaging and photocytotoxicity in HeLa cells. **European Journal of Inorganic Chemistry**. v.11 p. 1425-1435. 2011. <https://doi.org/10.1002/ejic.201001097>

BARCELOUX, D. G. Nickel. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 239-258, 1999. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102423>

BARRA, C. V; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>

BEGAM, A. J; JUBIE, S; NANJAN, M. J. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. **Bioorganic chemistry**, v. 71, p. 257-274, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.011>

BENCINI, A; LIPPOLIS, V. 1, 10-Phenanthroline: a versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17-18, p. 2096-2180, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>

BENITE, A. M. C; MACHADO, S. de P; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 2062-2067, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800045>

BENSON, R; MALLICK, S; RATH, G. K. Case Carcinoma Breast. In: **Practical Radiation Oncology**. Springer, Singapore, 2020. p. 201-209. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0073-2_33

BOMBONATI, A; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 308-318, 2011. <https://doi.org/10.1002/path.2808>

BORGES, L. J. H; BULL, E. S; FERNANDES, C; JUNIOR, A. H; AZEREDO, N. F; RESENDE, J. A. L. C; FREITAS, W. R; CARVALHO E. C.Q; LEMOS, L. S; JERDY, H; KANASHIRO, M. M. *In vitro* and *in vivo* studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 128-140, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.018>

BRANDÃO, H. N; DAVID, J. P; COUTO, R. D; NASCIMENTO, J. A; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Bases Técnicas da Oncologia – SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais**. 25. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 161 p. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/manual-oncologia-25a-edicao_0.pdf. Acesso em: 30 mai. 2020.

BRAVO-GÓMEZ, M. E; CAMPERO-PEREDO, C; GARCÍA-CONDE, D; MOSQUEIRA-SANTILLÁN, M. J; SERMENT-GUERRERO, J; RUIZ-AZUARA, L. DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas®) and analysis of its biological meaning. **Polyhedron**, v. 102, p. 530-538, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.10.034>

BRAVO, B. S; LOPES, A. B. B; TIJOLIN, M. B; NUNES, P. L. P; LENHANI, T; JUNIOR, S. F. D; CERANTO, D. D. C. F. B. Câncer de mama: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 14254-14264, 2021.

<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n3-357>

BUDZISZ, E. Role of metal ions complexes and their ligands in medicine, pharmacy and cosmetology. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 4, p. 578-579, 2019.

<https://doi.org/10.2174/092986732604190401100950>

CAI, F; LUIS, M. A. F; LIN, X; WANG, M; CAI, L; CEN, C; BISKUP, E.

Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 11, n. 1, p. 15-23, 2019. <https://doi.org/10.3892/mco.2019.1854>

CALVO, A. Ehrlich y el concepto de “bala mágica”. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, p. 90-92, 2006. [PMID: 16688302.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16688302/)

CANGARA, H. Expression of Estrogen Receptor (Er), Progesterone Receptor (Pr), And Human Epi-Dermal Growth Factor Receptor-2 (Her-2) In Growth And Metastases Of Breast Cancer. **Nusantara Medical Science Journal**, v. 1, n. 3, p. 98-103, 2016. <https://doi.org/10.20956/nmsj.v1i3.2227>

CAVALCANTE, F. P; MILLEN, E. C; ZERWES, F. P; NOVITA, G. G. Progress in Local Treatment of Breast Cancer: A Narrative Review. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, p. 356-364, 2020. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1712125>

CHABNER, B. A; CALABRESI, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949, 1995.

CHAUDHARY, J; TAILOR, G; YADAV, B. L; MICHAEL, O. Synthesis and biological function of Nickel and Copper nanoparticles. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01878, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01878>

CHI, J. J; LI, H; ZHOUA, Z; IZQUIERDO-FERRER, J; XUE, Y; WAVELET, C. M; SCHILTZ, G. E; ZHANGI, B; CRISTOFANILLI, M; LU, X; BAHAR, I; WAN, Y. A novel strategy to block mitotic progression for targeted therapy. **EBioMedicine**, v. 49, p. 40-54, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.013>

CHO, N. Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer.

Ultrasonography, v. 35, n. 4, p. 281, 2016. <https://doi.org/10.14366/usg.16030>

CHOPRA, D; REHAN, H. S; SHARMA, V; MISHRA, R. Chemotherapy-induced adverse drug reactions in oncology patients: a prospective observational survey. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology: Official Journal of Indian**

Society of Medical & Paediatric Oncology, v. 37, n. 1, p. 42, 2016.

<https://doi.org/10.4103/0971-5851.177015>

CICCO, P. de; CATANI, M. V; GASPERI, V; SIBILANO, M; QUAGLIETTA, M; SAVINI, I. Nutrition and breast cancer: a literature review on prevention, treatment and recurrence. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1514, 2019. <https://doi.org/10.4103/0971-5851.177015>

CONRY, R. R. Copper: inorganic & coordination chemistry. **Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry**, 19 p. 2011.

<https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0050>

CONSTABLE, E. C. 2, 2': 6', 2''-Terpyridines: From chemical obscurity to common supramolecular motifs. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 2, p. 246-253, 2007.

<https://doi.org/10.1039/B601166G>

COSTA, M; SALDANHA, P. Risk reduction strategies in breast cancer prevention. **European journal of breast health**, v. 13, n. 3, p. 103, 2017.

<https://doi.org/10.5152/ejbh.2017.3583>

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, v. 3, p. 24-26, 2000.

COTTON, F. A; WILKINSON, I. **Advanced Inorganic Chemistry**. A Comprehensive Text, USA: 4ª edição, 1396 p., 1980.

COSGROVE, D; PARK, B. H; VOGELSTEIN, B. Tumor suppressor genes.

Holland-Frei Cancer Medicine, p. 1-20, 2016.

DANFORTH, D. N. Disparities in breast cancer outcomes between Caucasian and African American women: a model for describing the relationship of biological and nonbiological factors. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 3, 2013.

<https://doi.org/10.1186/bcr3429>

DANTAS, E. L. R; LIMA SÁ, F. H; CARVALHO, S. M. D. F; ARRUDA, A. P; RIBEIRO, E. M; RIBEIRO, E. M. Genética do câncer hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 263-269, 2009. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2009v55n3.1619>

<https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2009v55n3.1619>

DESBOWIS, D; TROITSKY, I. P; BELOUSOFF, M. J; SPICCIA, L; GRAHAM, B. Copper (II), zinc (II) and nickel (II) complexes as nuclease mimetics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 11-12, p. 897-937, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.005>

DESANTIS, C. E; MA, J; SAUER, A. G; NEWMAN, L. A; JEMAL, A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 439-448, 2017. <https://doi.org/10.3322/caac.21412>

<https://doi.org/10.3322/caac.21412>

DRĂGĂNESCU, M; CARMOCAN, C. Hormone therapy in breast cancer. **Chirurgia**, v. 112, n. 4, p. 413-417, 2017. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.112.4.413>

DURNDELL, V. C. S; ANTONANGELO, A. R. **Química Inorgânica de Coordenação**. 1 ed. Intersaberes, 314 p. 2020.

EMADI, A; JONES, R. J; BRODSKY, R.A. Cyclophosphamide and cancer: oldenanniversary. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 6, p. 638–647, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>

EREMINA, J. A; LIDER, E. V; SAMSONENKO, D. G; SHELUDYAKOVA, L. A; BEREZIN, A. S; KLYUSHOVA, L. S; OSTROVSKIID, V. A; TRIFONOV, R. E. Mixed-ligand copper (II) complexes with tetrazole derivatives and 2, 2'-bipyridine, 1, 10-phenanthroline: Synthesis, structure and cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 487, p. 138-144, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.12.011>

ERKKILA, K. E; ODOM, D. T; BARTON, J. K. Recognition and reaction of metalointercalators with DNA. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2777-2796, 1999. <https://doi.org/10.1021/cr9804341>

ERXLEBEN, A. Interactions of copper complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 92-121, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.008>

FALZONE, L; SALOMONE, S; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1300, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>

FEITOSA, R. C. L; PONTES, E. R. J. C. Levantamento dos hábitos de vida e fatores associados à ocorrência de câncer de tabagistas do município de Sidrolândia (MS, Brasil). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 605-613, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000200024>

FENG, Y; SPEZIA, M; HUANG, S; YUAN, C; ZENG, Z; ZHANG, L; JI, X; LIU, W; HUANG, B; LUO, W; LIU, B; LEI, Y; DU, S; VUPPALAPATI, A; LUU, H. H; HAYDON, R. C; HE, T. C; REN, G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & diseases**, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

FERLAY, J; ERVIK, M; LAM, F; COLOMBET, M; MERY, L; PIÑEROS, M; ZNAOR, A; SOERJOMATARAM, I; BRAY, F. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acessado em: 15 mai. 2021.

FERLAY, J; COLOMBET, M; SOERJOMATARAM, I; PARKIN, D. M; PIÑEROS, M; ZNAOR, A; BRAY, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, 2021. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

FIK, M. A; GORCZYŃSKI, A; KUBICKI, M; HNATEJKO, Z; WADAS, A; KULESZA, P. J; LEWIN, A; PIETRASZUK, M. G; WYSZKO, E; PATRONIAK, V. New vanadium complexes with 6, 6''-dimethyl-2, 2': 6', 2''-terpyridine in terms of structure and

biological properties. **Polyhedron**, v. 97, p. 83-93, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.05.021>

FORMAN, D; BAULD, L; BONANNI, B; BRENNER, H; BROWN, K; DILLNER, J; KAMPMAN, E; MANCZUK, M; RIBOLI, E; STEINDORF, K; STORM, H; ESPINA, C; WILD, C. P. Time for a European initiative for research to prevent cancer: a manifesto for Cancer Prevention Europe (CPE). **Journal of Cancer Policy**, v. 17, p. 15-23, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2018.07.001>

FRAGOMENI, S. M; SCIALIS, A; JERUSS, J. S. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics**, v. 27, n. 1, p. 95-120, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

FUENTES, N; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 116, p. 135-170, 2019.
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>

GABRIEL, J. A. **The biology of cancer**. John Wiley & Sons (Ed.), 218 p. 2007.

GARCEZ, F. R; GARCEZ, W. S; YOSHIDA, N. C; FIGUEIREDO, P. O. A Diversidade dos Constituintes Químicos da Flora de Mato Grosso do Sul e sua Relevância como Fonte de Substâncias Bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 97-129, 2016. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160008>

GAO, Y; SHANG, Q; LI, W; GUO, W; STOJADINOVIC, A; MANNION, C; MAN, Y; CHEN, T. Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 17, p. 5135, 2020. <https://doi.org/10.7150/jca.47470>

GONZÁLEZ-GALLARDO, S; BOLLERMANN, T; FISCHER, R. A; MURUGAVEL, R. Cyclopentadiene based low-valent group 13 metal compounds: ligands in coordination chemistry and link between metal rich molecules and intermetallic materials. **Chemical reviews**, v. 112, n. 6, p. 3136-3170, 2012.
<https://doi.org/10.1021/cr2001146>

HALL, J. E; GUYTON, A. C. **Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HASSANPOUR, S. H; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>

HEMMATZADEH, M; MOHAMMADI, H; JADIDI-NIARAGH, F; ASGHARI, F; YOUSEFI, M. The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast

cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 129-139, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.026>

HERRERA, K. M. S; FERREIRA, L. S; BRAGA, A. V; SOUZA, J. P; ANDRADE, J. T; SOARES, A. C; SOARES, L. F; CHAGAS, R. C. R; FERREIRA, J. M. S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Cr (III), Co (II) and Ni (II) complexes with 2-thiazoline-2-tiol derivative ligands against bacteria and yeasts of clinical importance. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, e20181077, 2019. n
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-376520181077>

HILL, E. A; ZHAO, N; FILATOV, A. S; ANDERSON, J. S. Nickel (ii)-methyl complexes adopting unusual seesaw geometries. **Chemical Communications**, p. 1-7. 2020. <https://doi.org/10.1039/C9CC09249H>

HOFMEIER, H; SCHUBERT, U. S. Recent developments in the supramolecular chemistry of terpyridine–metal complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 33, n. 6, p. 373-399, 2004. <https://doi.org/10.1039/B400653B>

HUGHES, A. E; LEE, S. C., EBERTH, J. M; BERRY, E; PRUITT, S. L. Do mobile units contribute to spatial accessibility to mammography for uninsured women?. **Preventive Medicine**, p. 106156, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.106156>

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Cancer Today**. World Health Organization. 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 13 mai. 2021.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2020**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 120 p. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2020.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2020**. Introdução. Ministério da Saúde. 2020a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=A%20distribui%C3%A7%C3%A3o%20da%20incid%C3%A7%C3%A3o%20por,as%20diferentes%20Regi%C3%B5es%20do%20Brasil>. Acesso em: 16 maio 2021.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2020**. Síntese de Resultados e Comentários. Ministério da Saúde. 2020b. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20estimam%2Dse,mil%20mulheres%20\(Tabela%201\)](https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20estimam%2Dse,mil%20mulheres%20(Tabela%201)). Acesso em: 17 maio 2021.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2023**: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa> Acesso em: 25 nov 2022.

JAGSI, R; KING, T. A; LEHMAN, C; MORROW, M; HARRIS, J. R; BURSTEIN, H. J. Chapter 79: Malignant Tumors of the Breast. In: DEVITA, V. T; LAWRENCE, T. S; LAWRENCE, T. S; ROSENBERG, S. A. eds. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 11th ed. Philadelphia, 2019.

JANSSON, P. J; SHARPE, P. C; BERNHARDT, P. V; RICHARDSON, D. R. Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5759-5769, 2010. <https://doi.org/10.1021/jm100561b>

JASRA, S; ANAMPA, J. Anthracycline use for early stage breast cancer in the modern era: a review. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1-17, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0547-8>

JAVLE, M; CURTIN, N. J. The potential for poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 3, n. 6, p. 257-267, 2011. <https://doi.org/10.1177/1758834011417039>

JESINGER, R. A. Breast anatomy for the interventionalist. **Techniques in vascular and interventional radiology**, v. 17, n. 1, p. 3-9, 2014. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>

JORDAN, V. C. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. **Nat Rev Drug Discov**. 2:205–13. 2003. <https://doi.org/10.1038/nrd1031>

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KACAR, O; ADIGUZEL, Z; YILMAZ, V. T; CETIN, Y; CEVATEMRE, B; ARDA, N; BAYKALA, A. T; ULUKAYAD, E; ACILAN, C. Evaluation of the molecular mechanisms of a palladium (II) saccharinate complex with terpyridine as an anticancer agent. **Anti-cancer drugs**, v. 25, n. 1, p. 17-29, 2014. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328364c6ad>

KAIM, W. The chemistry and biochemistry of the copper–radical interaction. **Dalton Transactions**, n. 5, p. 761-768, 2003. <https://doi.org/10.1039/B210193A>

KAIM, W; SCHWEDERSKI, B; KLEIN, A. **Bioinorganic Chemistry--Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide**. John Wiley & Sons, 2013.

KAMATA, K; SUZUKI, A; NAKAI, Y; NAKAZAWA, H. Catalytic hydrosilylation of alkenes by iron complexes containing terpyridine derivatives as ancillary ligands. **Organometallics**, v. 31, n. 10, p. 3825-3828, 2012. <https://doi.org/10.1021/om300279t>

KEETON, E. K; BROWN, M. Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor- α and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in

N-CoR and SMRT. **Molecular endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 1543-1554, 2005.
<https://doi.org/10.1210/me.2004-0395>

KERI, R. S; CHAND, K; BUDAGUMPI, S; SOMAPPA, S. B; PATIL, S. A; NAGARAJA, B. M. An overview of benzo [b] thiophene-based medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 138, p. 1002-1033, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.038>

KERR, J; ANDERSON, C; LIPPMAN, S. M. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 8, p. e457-e471, 2017. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30411-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30411-4)

KERRU, N; GUMMIDI, L; MADDILA, S; GANGU, K. K; JONNALAGADDA, S. B. A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1909, 2020.
<https://doi.org/10.3390/molecules25081909>

KEY, T. J; REEVES, G K. Alcohol, diet, and risk of breast cancer. **The BMJ**, v. 353, 2016. <https://doi.org/10.1136/bmj.i2503>

KHAN, J. S; LADHA, K. S; ABDALLAH, F; CLARKE, H. Treating Persistent Pain After Breast Cancer Surgery. **Drugs**, v. 80, n. 1, p. 23-31, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01227-5>

KOURY, J; LUCERO, M; CATO, C; CHANG, L; GEIGER, J; HENRY, D; HERNANDEZ, J; HUNG, F; KAUR, P; TESKEY, G; TRAN, A. Immunotherapies: exploiting the immune system for cancer treatment. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9585614>

KRASNOVSKAYA, O; NAUMOV, A; GUK, D; GORELKIN, P; EROFEEV, A; BELOGLAZKINA, E; MAJOUGA, A. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3965, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21113965>

KUDO, MASATOSH; UESHIMA, K; KUBO, S; SAKAMOTO, M; TANAKA, M; IKAI, I; FURUSE, J; MURAKAMI, T; KADOYA, M; KOKUDO, N. Response evaluation criteria in cancer of the liver (RECICL) (2015 revised version). **Hepatology Research**, v. 46, n. 1, p. 3-9, 2015. <https://doi.org/10.1111/hepr.12542>

KUHN, M; FALK, F. C; PARADIES, J. Palladium-catalyzed C–S coupling: access to thioethers, benzo [b] thiophenes, and thieno [3, 2-b] thiophenes. **Organic Letters**, v. 13, n. 15, p. 4100-4103, 2011. <https://doi.org/10.1021/ol2016093>

KUMAR, S; TRIVEDI, A. V. A review on role of nickel in the biological system. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 5, n. 3, p. 719-727, 2016.
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.084>

LAWRANCE, G. A. **Introduction to coordination chemistry**. John Wiley & Sons, 360 p., 2010.

ŁĘCZKOWSKA, A; GONZALEZ-GARCIA, J; PEREZ-ARNAIZ, C; GARCIA, B; WHITE, A. J; VILAR, R. Binding studies of metal-salphen and metal-bipyridine complexes towards G-Quadruplex DNA. **A European Journal**. 35 p. 2018.
<https://doi.org/10.1002/chem.201802248>

LEHMANN, B. D; JOVAMOVIC, B; CHEN, X; ESTRADA, M. V; JOHNSON, K. N; SHYR, Y; MOSES, H. L; SANDERS, M. E; PIETENPOL, J. A. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. **Plos One**, v. 11, p. 1-22, 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>

LIMA, J. M. DE; SERAFIM, P. V. P; SILVA, I. D. C. G. DA; FORONES, N. M. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 8-13, mar. 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0004-28032006000100005>

LIPPERT, B. Uses of Metal Compounds in Medicine. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, Technische Universität Dortmund, Dortmund, p. 1-6, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.05375-0>

LODI, M; SCHEER, L; REIX, N; HEITZ, D; CARIN, A. J; THIÉBAUT, N. NEUBERGER, K. TOMASETTO, C; MATHELIN, C. Breast cancer in elderly women and altered clinico-pathological characteristics: a systematic review. **Breast cancer research and treatment**, v. 166, n. 3, p. 657-668, 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10549-017-4448-5>

LOPES, J. C; MACHADO, N. M; SATURNINO, R. S; NEPOMUCENO, J. C. Recombinogenic activity of Pantoprazole® in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 101-106, mar. 2015.
<https://doi.org/10.1590/S1415-475738120140154>

LU, C. S; LIN, C. W; CHANG, Y. H; CHEN, H. Y; CHUNG, W. C; LAI, W. Y; HO, C. C; WANG, T. H; CHEN, C. Y; YEH, C. L; WU, S; WANG, S. P; YANG, P. C. Antimetabolite pemetrexed primes a favorable tumor microenvironment for immune checkpoint blockade therapy. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 8, n. 2, 2020. <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2020-001392>

MAKAMA, M; DRUKKER, C. A; RUTGERS, E. J. T; SLAETS, L; CARDOSO, F; ROOKUS, M. A; TRYFONIDIS, K; VEER, L. J. V; SCHMIDT, M. K. An association study of established breast cancer reproductive and lifestyle risk factors with tumour subtype defined by the prognostic 70-gene expression signature (MammaPrint®). **European Journal of Cancer**, v.75, p. 5-13, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.12.024>

MARIEB, E. N; HOEHN, K. **Human Anatomy & Physiology**. 9th Edition. New York: Pearson, 2014.

MARVERTI, G; CUSUMANO, M; LIGABUE, A; DI PIETRO, M. L.; VAINIGLIA, P. A.; FERRARI, A.; BERGOMI, M.; MORUZZI, S.; FRASSINETI, C. Studies on the

anti-proliferative effects of novel DNA-intercalating bipyridyl–thiourea–Pt(II) complexes against cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 699-712, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.10.015>

MARTEL, C. de; GEORGES, D; BRAY, F; FERLAY, J; CLIFFORD, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e180-e190, 2020. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)

MATHERS, C. D; BERNARD, C; IBURG, K. M; INOUE, M; FAT, D. M; SHIBUYA, K; STEIN, C; TOMIJIMA, N; XU, H. **Global burden of disease in 2002**: data sources, methods and results. [Geneve]: World Health Organization, Global programme on evidence for health policy discussion paper, v. 54, 2003.

MORRISON, W. B. Cancer chemotherapy: an annotated history. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1249-1262, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0590.x>

MOSCA, L; ILARI, A; FAZI, F; ASSARAF, Y. G; COLOTTI, G. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. **Drug Resistance Updates**, v. 54, p. 100742, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100742>

MOUBEEN, S; EL-SHAHAT, M; AZIZ, A; ATTIA, A. Synthesis, characterization and biological evaluation of novel octahedral Ru (III) complexes containing pentadentate Schiff base ligands. **Current Chemistry Letters**, v. 10, n. 1, p. 17-32, 2021. <https://doi.org/10.5267/j.ccl.2020.7.001>

MUÑOZ-PATIÑO, N; SÁNCHEZ-EGUÍA, B. N; ARAIZA-OLIVERA, D; FLORES-ALAMO, M; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S; MARTÍNEZ-OTERO, D; CASTILLO, I. Synthesis, structure, and biological activity of bis (benzimidazole) amino thio-and selenoether nickel complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 211, p. 111198, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111198>

MURALISANKAR, M; HARIBABU, J; BHUVANESH, N. S; KARVEMBU, R; SREEKANTH, A. Synthesis, X-ray crystal structure, DNA/protein binding, DNA cleavage and cytotoxicity studies of N (4) substituted thiosemicarbazone based copper (II)/nickel (II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 449, p. 82-95, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.04.043>

NDAGI, U; MHLONGO, N; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 599, 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

NELSON, H. D. ZAKHER, B; CANTOR, A; FU, R; GRIFFIN, J; O'MEARA, E. S; BUIST, D; KERLIKOWSKA, K; RAVESTEYN, N. T; TRENTAM-DIETZ, A; MANDELBLATT, J. S; MIGLIORETTI, D. L. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v. 156, n. 9, p. 635-648, 2012. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-9-201205010-00006>

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

OKAT, Z. Molecular dynamics of estrogen receptors. **Eurasian Journal in Medicine and Oncology**, v. 2, n. 4, p. 189-197, 2018. <https://doi.org/10.14744/ejmo.2018.76476>

OLSON, O. C; KIM, H; QUAIL, D. F; FOLEY, E. A; JOYCE, J. A. Tumor-associated macrophages suppress the cytotoxic activity of antimetabolic agents. **Cell Reports**, v. 19, n. 1, p. 101-113, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.038>

ONG, Y. C; ROY, S; ANDREWS, P. C; GASSER, G. Metal compounds against neglected tropical diseases. **Chemical reviews**, v. 119, n. 2, p. 730-796, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00338>

ORVIG, C; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 1999. <https://doi.org/10.1021/cr980419w>

OSBORNE, C. K; SCHIFF, R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1616-1622, 2005. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.036>

OSREDKAR, J; SUSTAR, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. **J Clin Toxicol S**, v. 3, n. 2161, p. 0495, 2011. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-001>

PAIXÃO, D. A; OLIVEIRA, B. C; ALMEIDA, J. do C; SOUSA, L. M; LOPES, C. D; CARNEIRO, Z. A; TEZUKA, D. Y; CLAVIJO, J. C. T; ELLENA, J; POLLONI, L; MACHADO, P. A; ALBUQUERQUE S; JÚNIOR, R. J. de O; GUILARDI, S; GUERRA, W. Crystal structure, anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of Cu (II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, p. 119164, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>

PAN, S. T; LI, Z. L; HE, Z. X; QIU, J. X; ZHOU, S. F. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 8, p. 723-737, 2016. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12581>

PANDYA, S; MOORE, R. G. Breast development and anatomy. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 54, n. 1, p. 91-95, 2011. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318207ffe9>

PANEQUE, M; POVEDA, M. L; VATTIER, F; ALVAREZ, E; CARMONA, E. Synthesis and structural characterization of a binuclear iridium complex with bridging, bidentate N-heterocyclic carbene coordination of 2, 2': 6', 2''-terpyridine. **Chemical Communications**, n. 37, p. 5561-5563, 2009. <https://doi.org/10.1039/B909837B>

PAPACCIO, F; PAINO, F; REGAD, T; PAPACCIO, G; DESIDERIO, V; TIRINO, V. Concise review: cancer cells, cancer stem cells, and mesenchymal stem cells:

influence in cancer development. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 12, p. 2115-2125, 2017. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0138>

PAPE, V. F. S; MAY, N. V; GÁL, G. T; SZATMÁRI, I; SZERI, F; FÜLÖP, F; SZAKÁCS, G; ENYEDY, É. A. Impact of copper and iron binding properties on the anticancer activity of 8-hydroxyquinoline derived Mannich bases. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 47, p. 17032-17045, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8DT03088J>

PARAKH, S; KING, D; GAN, H. K; SCOTT, A. M. Current development of monoclonal antibodies in cancer therapy. **Current Immunotherapeutic Strategies in Cancer**, p. 1-70, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23765-3_1

PARK, B. H; VOGELSTEIN, B. DNA Repair Pathway Genes. In: KUFÉ, D. W; POLLOCK R. E; WEICHSELBAUM, R. R. editors. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12469/>>. Acessado em: 24 nov. 2020.

PARK, W; JORDAN, V. Craig. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. **Trends in molecular medicine**, v. 8, n. 2, p. 82-88, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02282-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02282-7)

PATEL, R. D; BHALANI, Y. A; SUDANI, D. S; VACHHANI, L. A. Tamoxifen: An Investigative Review for Nano Dosage Forms and Hyphenated Techniques. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 12, n. 1, p. 01-06, 2022. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2022.1.1>

PETERS, G. J; VAN DER WILT, C. L; VAN MOORSEL, C. J. A; KROEP, J. R; BERGMAN, A. M; ACKLAND, S. P. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. **Pharmacology & therapeutics**, v. 87, n. 2-3, p. 227-253, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00086-3)

PIZZINO, G; IRRERA, N; CUCINOTTA, M; PALLIO, G; MANNINO, F; ARCORACI, V; SQUADRITO, F; ALTAVILLA, D; BITT, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

PLICHTA, J. K; CAMPBELL, B. M; MITTENDORF, E. A; HWANG, E. S. Anatomy and Breast Cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 27, p. 51-67, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.07.010>

POLLONI, L; SILVA, A. C. de S; TEIXEIRA, S. C; AZEVEDO, F. V. P. DE VASCONCELOS; ZÓIA, M. A. P; SILVA, M. S. da; LIMA, P. M. A. P; COREIA, L. I. V; ALMEIDA, J. do C; SILVA, C. V. da S; ÁVILA, V. de M. R; GOULART, L. R. F; MORELLI, S; GUERRA, W; JÚNIOR, R. J. de O. Action of copper (II) complex with β -diketone and 1, 10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108586, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>

PORRAS, L; ISMAIL, H; MADER, S. Positive regulation of estrogen receptor alpha in breast tumorigenesis. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 2966, 2021.

<https://doi.org/10.3390/cells10112966>

PRASAD, P; GUPTA, A; SASMAL, P. K. Aggregation-induced emission active metal complexes: a promising strategy to tackle bacterial infections. **Chemical Communications**, v. 57, n. 2, p. 174-186, 2021.

<https://doi.org/10.1039/D0CC06037B>

PULLEN, S; TESSAROLO, J; CLEVER, G. H. Increasing structural and functional complexity in self-assembled coordination cages. **Chemical Science**, v. 12, n. 21, p. 7269-7293, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1SC01226F>

RAMOS, P; BENTIREN-ALJ, M. Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. **Oncogene**, v. 34, n. 28, p. 3617-3626, 2015.

<https://doi.org/10.1038/onc.2014.314>

RANG, H. P; RITTER, J. M; FLOWER, R. J; HENDERSON, G. **Rang & Dale's Pharmacology**. 8ª ed. London (UK): Churchill Livingstone Elsevier; 2016.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 829 p. 2007.

RANI, A; STEBBING, J; GIAMAS, G; MURPHY, J. Endocrine resistance in hormone receptor positive breast cancer—from mechanism to therapy. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 245, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00245>

REDDY, L.; COUVREUR, P. H. **Macromolecular anticancer therapeutics**. New York: Springer, 1 ed., 500 p., 2010.

ROCHA, D. P; PINTO, G. F; RUGGIERO, R; OLIVEIRA, C. A. de; GUERRA, W; FONTES, A. P. S; TAVARES, T. T; MARZANO, I. M; PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000100022>

SAJI, S; JENSEN, E. V; NILSSON, S; RYLANDER, T; WARNER, M; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 1, p. 1-1, 2000. <https://doi.org/10.1186/bcr182>

SANTOS, M. A. Iões Metálicos em Medicina: do Diagnóstico à Terapia. **Química** **132**, Universidade de Lisboa, Lisboa, p. 22-32, mar. 2014.

<https://doi.org/10.52590/M3.P663.A30001882>

SARKAR, S; HORN, G; MOULTON, K; OZA, A; BYLER, S; KOKOLUS, S; LONGACRE, M. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 21087-21113, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>

SAUTER, E. R. Breast cancer prevention: Current approaches and future directions. **European journal of breast health**, v. 14, n. 2, p. 64, 2018.

<https://doi.org/10.5152/ejbh.2018.3978>

SAVCI-HEIJINK, C. D; HALFWERK, H; HOOIJER, G. K; HORLINGS, H. M; WESSELING, J; VAN DE VIJVER, M. J. Retrospective analysis of metastatic behaviour of breast cancer subtypes. **Breast cancer research and treatment**, v. 150, n. 3, p. 547-557, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3352-0>

SCHMID, P; ADAMS, S; RUGO, H. S; SCHNEEWEISS, A; BARRIOS, C. H; IWATA, H; DIÉRAS, V; HEGG, R; IM, S. A; WRIGHT, G. S; HENSCHER, V; MOLINERO, L. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2108-2121, 2018.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>

SHAKED, Y. The pro-tumorigenic host response to cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 12, p. 667-685, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0209-6>

SHRIVER, D. F; ATIKNS, P; LANGFORD, C. H. **Inorganic Chemistry**. W. H. Freeman and Company: 2 ed., 819 p., 1994.

SHARMA, A. D. Low nickel diet in dermatology. **Indian Journal of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 240, 2013. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.110846>

SILVA, P; HECK, A. P; SILVA, B. T. D; AZAMBUJA, A. A. O manejo das reações agudas em quimioterapia. **Acta méd.** (Porto Alegre), v. 36, 2015.

SMITH, C. L. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 3, p. 627-632, 1998.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.627>

SOBOTTA, J. **Atlas de Anatomia Humana**. 3 vol. 23. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SODHI, R. K; PAUL, S. Metal Complexes in Medicine: An Overview and Update from Drug Design Perspective. **Canc Therapy & Oncol Int J**. v. 14(2): 555883, 2019.

<https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2019.14.555883>

SPERLING, R. A; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1915, p. 1333-1383, 2010. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>

SRIVASTVA, A. N. **Stability and Applications of Coordination Compounds**. Muzaffarpur, India: Intechopen, 176 p. 2020.

STRATTON, M. R; CAMPBELL, P. J; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719-724, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature07943>

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 1, p. 1–4, 2009. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>

SUN, L. L; DENG, C. L; TANG, R. Y; ZHANG, X. G. CuI/TMEDA-catalyzed annulation of 2-bromo alkynylbenzenes with Na₂S: synthesis of benzo [b] thiophenes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 18, p. 7546-7550, 2011. <https://doi.org/10.1021/jo201081v>

SUNG, H; FERLAY, J; SIEGEL, R. L; LAVERSANNE, M; SOERJOMATARAM, I; JEMAL, A; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 71, ed. 3, p. 209-249. 4 feb. 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

SZCZEPANIAK, A; FICHNA, J. Organometallic Compounds and Metal Complexes in Current and Future Treatments of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer — a Critical Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 398, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9090398>

TAMÁS, M. J; SHARMA, S. K; IBSTEDT, S; JACOBSON, T; CHRISTEN, P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 252-267, 2014. <https://doi.org/10.3390/biom4010252>

THORAT, M. A; BALASUBRAMANIAN, R. Breast cancer prevention in high-risk women. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 65, p. 18-31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2019.11.006>

THUNDIMADATHIL, J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. **Journal of amino acids**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/967347>

TOMASETTI, C; LI, L; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. American Association for the Advancement of Science (AAAS). **Science**, [s.l.], v. 355, n. 6331, p.1330-1334, mar. 2017. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>

TORTORA, G. J; NIELSEN, M. T. **Princípios de Anatomia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12 ed., 1114 p., 2013.

TWOMEY, J. D; BRAHME, N. N; ZHANG, B. Drug-biomarker co-development in oncology – 20 years and counting. **Drug Resistance Updates**, v. 30, p. 48-62, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2017.02.002>

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314-322, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature09781>

WANG, J; HENG, Y. J; ELIASSEN, A. H; TAMIMI, R. M; HAZRA, A; CAREY, V. J; AMBROSONE, C. B; ANDRADE, V. P; BRUFISKY, A; COUCH, F. J; KING, T. A; MODUGNO, F; VACHON, C. M; HUNTER, D. J; BECK, A. H; HANKINSON, S. E.

Alcohol consumption and breast tumor gene expression. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 108, p. 2-15, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0901-y>

WRAITH, D. C. The future of immunotherapy: a 20-year perspective. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1668, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01668>

WARRA, A. A. Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics-a Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 951-958, 2011.

WEDER, J. E; DILLON, C. T; HAMBLEY, T. W; KENNEDY, B. J; LAY, P. A; BIFFIN, J. R; REGTOP, H. L; DAVIES, N. M. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1-2, p. 95-126, 2002.

WEI, C; HE, Y; SHI, X; SONG, Z. Terpyridine-metal complexes: Applications in catalysis and supramolecular chemistry. **Coordination chemistry reviews**, v. 385, p. 1-19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.01.005>

WHALEN, K; FINKEL, R; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia Ilustrada**. 6ª ed. Artmed Editora, 680 p., 2016.

WHEATE, N. J; TALEB, R. I; KRAUSE-HEUER, A. M; COOK, R. L; WANG, S; HIGGINS, V. J; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Novel platinum (II)-based anticancer complexes and molecular hosts as their drug delivery vehicles. **Dalton Transactions**, n. 43, p. 5055-5064, 2007. <https://doi.org/10.1039/B704973K>

WILLETT, R. D; PON, G; NAGY, C. Crystal Chemistry of the 4,4'-Dimethyl-2, 2'-bipyridine/Copper Bromide System. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 17, p. 4342-4352, 2001. <https://doi.org/10.1021/ic010229v>

WILLIAMS, C. L; STANCEL, G. M. Estrogênios e progestogênios. In: HARDMAN, J. G. et al. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 1055.

WILLSON, M. L; BURKE, L; FERGUSON, T; GHERSI, D; NOWAK, A. K; WILCKEN, N. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 9, 2019. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004421.pub3>

WLUDARSKI, S. C. L; LOPES, L. F; DUARTE, Í. X; CARVALHO, F. M; WEISS, L; BACCHI, C. E. Estrogen and progesterone receptor testing in breast carcinoma: concordance of results between local and reference laboratories in Brazil. **Sao Paulo Med. J.**, São Paulo, v. 129, n. 4, p. 236-242, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802011000400007>

World Health Organization (WHO). **Cancer**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 16 mai. 2021.

World Health Organization (WHO). **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all**. Geneva: World Health Organization; 2020.

Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1267643/retrieve>. Acesso em: 31 mai. 2020.

XU, M. J; JOHNSON, D. E; GRANDIS, J. R. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 3, p. 463-473, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9687-8>

YAŞAR, P; AYAZ, G; USER, S. D; GÜPÜR, G; MUYAN, M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. **Reproductive medicine and biology**, v. 16, n. 1, p. 4-20, 2017. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>

YERSAL, Ö; KAPLAN, M.A; IŞIKDOĞAN, A; ÖZDEMİR, N; ALIUSTAOĞLU, M; BARUTCA, S; ERDOĞDU, H. I; MEYDAN, N. Molecular subtypes are prognostic for N3 breast cancer patients in the modern therapeutic era. **Molecular and clinical oncology**, v. 10, 180-n. 184. 2019. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1771>

YOU, F; GAO, C. Topoisomerase inhibitors and targeted delivery in cancer therapy. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 9, p. 713-729, 2019. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190401112948>

ZAHAVI, D; WEINER, L. Monoclonal antibodies in cancer therapy. **Antibodies**, v. 9, n. 3, p. 34, 2020. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>

ZAMBELLI, B; CIURLI, S. Nickel and human health. **Interrelations between essential metal ions and human diseases**, p. 321-357, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_10

ZAMBLE, D; ROWIŃSKA-ŻYREK, M; KOZŁOWSKI, H. **The Biological Chemistry of Nickel**. Royal Society of Chemistry, 380 p. 2017. <https://doi.org/10.1039/9781788010580>

ZARDAVAS, D; CAMERON, D; KROP, I; PICCART, M. Beyond trastuzumab and lapatinib: new options for HER2-positive breast cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 33, n. 1, p. e2-e11, 2013. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2013.33.e2

ZHANG, Z; WANG, H; YAN, M; WANG, H; ZHANG, C. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment. **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 1, p. 3-11, 2017a. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6022>

ZHANG, M; LEE, A. V; ROSEN, J. M. The cellular origin and evolution of breast cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 3, p. 1-14, 2017b. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027128>

ZHOU, W; SARAN, R; LIU, J. Metal sensing by DNA. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 8272-8325, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00063>

ZUGAZAGOITIA, J; GUEDES, C; PONCE, S; FERRER, I; MOLINA-PINELO, S; PAZ-ARES, L. Current challenges in cancer treatment. **Clinical therapeutics**, v. 38, n. 7, p. 1551-1566, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>

ZUO, J; BI, C; FAN, Y; BUAC, D; NARDON, C; DANIEL, K. G; DOU, Q. P. Cellular and computational studies of proteasome inhibition and apoptosis induction in human cancer cells by amino acid Schiff base–copper complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 118, p. 83-93, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.10.006>

CAPÍTULO II

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de mortes no mundo, sendo o Câncer de Mama (CM) o mais frequente e responsável por cerca de 685.000 óbitos, anualmente (FERLAY et al., 2021; CAO et al., 2021). Tumores mamários são heterogêneos e subclassificados molecularmente em três subtipos principais: Luminais, quando positivos para receptores de estrógeno (RE) e/ou progesterona (RP), HER2- enriquecidos, quando superexpressam apenas o Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano e em Triplo-Negativos, quando não expressam RE, RP e HER2 (TESTA et al., 2020).

Tumores luminais, quando RE-positivos, são elegíveis à terapia endócrina. Em geral, são tratados com terapia anti-hormonal/endócrina que tem como alvo a atividade do receptor ou a disponibilidade de estrogênio. Entretanto, é comum o surgimento de mecanismos de resistência, podendo ocorrer de forma intrínseca, presente no indivíduo antes do início de tratamento, ou adquirida durante o curso do tratamento. Em pacientes, altos níveis de *ESR2* correlacionam melhor sobrevida e melhor resposta a tratamentos com Tamoxifeno (Tam) independente de *ESR1*. Porém, baixos níveis de *ESR2* podem contribuir para a resistência à terapia endócrina. Estudos afirmam que a superexpressão de *ESR2* é observada em tumores de mama pré-invasivos resistentes ao tamoxifeno e *ESR2* parece ter efeito negativo na transcrição estimulada por *ESR1* (THOMAS; GUSTAFSSON, 2011; HAQUE; DESAI, 2019).

Embora os RE sejam um preditor de resposta a determinados tipos de terapias, existe a necessidade de encontrar mais biomarcadores e novos alvos para tratar tumores resistentes. Utilizando agentes que atuem na recuperação efetiva do estado de saúde do paciente, é possível elevar as chances de sobrevida dos acometidos (BALSA et al., 2020; HAQUE; DESAI, 2019). Metais de transição se destacam e têm sido, de fato, amplamente explorados no tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo mama, cólon e pulmão (NDAGI et al., 2017).

Metais como Cobre (Cu) e Ni (Níquel) são elementos essenciais ao metabolismo e a processos fisiológicos normais (ZUGHAIPI et al., 2020; TABREZ et al., 2022). Em tumores, Polloni et al. (2019) e Sousa et al. (2020) demonstraram que se ligam ao DNA, induzindo sua clivagem, ativando a apoptose, aumentando a

produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alterando o ciclo celular. Contudo, sua capacidade em reverter a resistência terapêutica, sobretudo de células tumorais mamárias resistentes a Tamoxifeno foi pouco explorada.

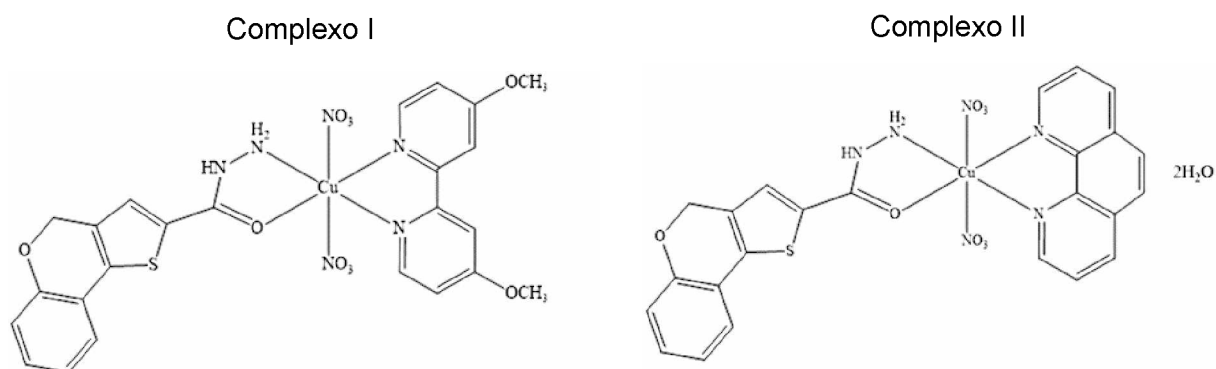
Por esta razão, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de cinco protótipos metálicos, de Cu ou Ni, utilizando como ligantes: 1,10-fenantrolina (Fen), 2,2';6',2''-terpiridina (Ter), benzopirano [4,3-b] tiofeno-2-ácido carboxílico hidrazida (Bth) e 4-4'-Dimetoxi-2'-2'-bipiridina (Dmb) em células de CM, principalmente nas células de CM luminal resistente a Tamoxifeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

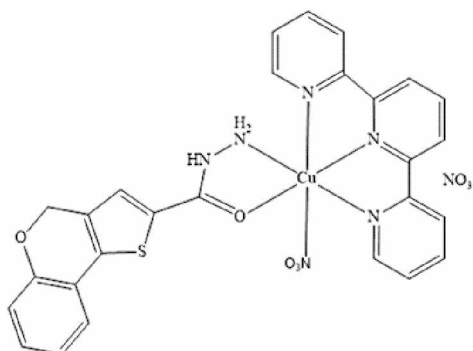
2.1 Síntese e Preparação dos Complexos Metálicos

Os cinco complexos metálicos foram sintetizados conforme a metodologia descrita por Almeida (2015) e Sousa (2020). Os compostos testados são coordenados por dois ligantes que estão ligados a uma molécula de Cu ou Ni. As estruturas dos complexos (Figura 1) estão a seguir: Complexo I ($[\text{Cu}(\text{Bth})(\text{Dmb})]\text{NO}_3)_2$, Complexo II ($[\text{Cu}(\text{Bth})(\text{Fen})]\text{NO}_3)_2$, Complexo III ($[\text{Cu}(\text{Bth})(\text{Tpy})](\text{NO}_3)_2$), Complexo IV ($[\text{Ni}(\text{Bth})(\text{Bth})]\text{NO}_3)_2$ e Complexo V ($[\text{Ni}(\text{Bth})(\text{Dmb})]\text{NO}_3)_2$. Previamente, a análise elementar foi realizada a fim de se avaliar a pureza dos complexos. Para realização dos experimentos, os compostos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 0.5%.

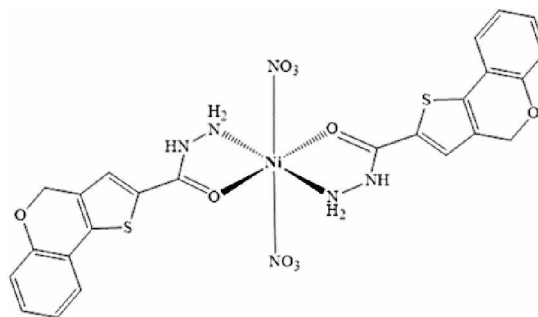
Figura 1. Representação das estruturas químicas dos complexos metálicos testados.



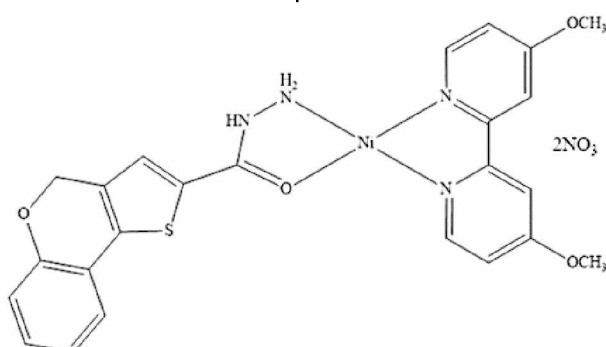
Complexo III



Complexo IV



Complexo v



2.2 Docking Molecular

O estudo da interação molecular dos complexos com o DNA foi realizado utilizando o molde de DNA duplex (PDB ID: 1BNA), cuja estrutura está disponível no banco de dados Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb). A simulação do *docking* foi aplicada pelo AutoDock 4.2, o qual calcula a probabilidade de interação de cada complexo metálico com a molécula de DNA modelo (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA) (MACINDOE et al., 2010). A princípio, as moléculas de água foram removidas e os átomos de hidrogênio polar, cargas parciais do átomo unido de Kollman e desenhos parciais de Gasteiger foram adicionados ao BNA como alvo, usando o programa AutoDock. A estrutura dos complexos foi esboçada pelo programa ChemDraw e a energia minimizada e convertida para o formato PDB por meio do software Mercury (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>) (ZEHR et al., 2019).

Ferramentas MGL 1.5.6 presentes no AutoGrid4 e AutoDock4 foram empregadas para configurar e realizar cálculos do *docking* entre os complexos de Cu e a sequência de DNA (MORRIS et al., 2008). Por fim, algoritmos genéticos lamarckianos foram utilizados para realização dos cálculos de encaixe, conforme

implementados no AutoDock. As estruturas moleculares foram otimizadas pelo UCSF Chimera 1.4 e as imagens produzidas pelo PyMol (SHAHABADI et al., 2017).

Nas simulações do docking, foram estipuladas pelo programa 100 ancoragens para cada complexo, sendo selecionadas as conformações de menor energia de encaixe. As interações do DNA com os complexos foram avaliadas usando UCSF Chimera (MALEKSHAH et al., 2019). Posteriormente, a análise de cluster foi realizada usando tolerância de raiz quadrada média (RMS) de 0,5Å, e as coordenadas iniciais do ligante foram usadas como referência (SHAHABADI et al., 2017).

2.3 Linhagens de Células

Para realização dos experimentos, foram utilizadas três linhagens mamárias adquiridas do ATCC: (i) MCF-10A (CRL-10317) não tumorigênica, cultivada em meio DMEM/F12 (Gibco) suplementada com o fator de crescimento epidérmico humano (EGF) (5ng/mL), hidrocortisona (0,25ug/mL), insulina (10mg/mL); (ii) MCF7 (HTB-22), tumoral e RE-positiva, cultivada em RPMI-1640 (Gibco) e (iii) MDA-MB 231 (HTB-26), tumoral triplo-negativa, cultivada em L15 (Gibco). As células resistentes a Tamoxifeno (MCF7/TAM) foram estabelecidas por nosso grupo de pesquisa após exposição persistente ao hormonioterápido (BRANDÃO et al., 2022), sendo cultivada em RPMI-1640 (Gibco) sem vermelho de fenol. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (50 µg/mL). Todas as linhagens foram mantidas em um incubador úmido a 37°C. Apenas a linhagem MDA-MB 231 foi privada de 5% de CO₂. Após atingirem a confluência de 80%, as células foram utilizadas nos devidos ensaios.

2.4 Viabilidade celular e índice de seletividade

As células tumorais e não-tumorais utilizadas para o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) foram cultivadas em 100 µL de meio correspondente usando placas de 96 poços. A densidade utilizada por poço variou conforme a linhagem, sendo padronizado $1,5 \times 10^4$ de células para MCF10A, 5×10^3 para as linhagens MCF7 e MCF7/TAM e $1,5 \times 10^4$ para MDA-MB 231. Conduzido o plaqueamento, realizou-se o tratamento das células com os complexos nas

concentrações de 0.05, 0.25, 1.25, 6.25, 31.25 e 156.25 μM . Cada tratamento foi realizado em triplicata e os controles incluíram células não-tratadas (controle de viabilidade) contendo somente meio de cultura e células tratadas com DMSO (Sigma Aldrich, Brasil Ltda, Lote: SHBM4137). Todas as placas foram incubadas a 37°C e os experimentos conduzidos por 24 e 48h quando, então, foi adicionado o reagente MTT (10% p/v) durante 4h. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e 200 μL de DMSO foi pipetado nos poços. Os valores de densidade óptica (DO) foram obtidos por meio do equipamento ELISA Reader (ThermoScientific, Multiskan FC), considerando absorvância de 570nm.

A concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀) foi calculada para cada linhagem e utilizada na determinação do índice de seletividade (IS). Os resultados foram expressos pela porcentagem de viabilidade em relação ao controle conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (IC}_{50}\text{)} = \frac{Aa - (Ab_{sc} - Ab_{sm})}{Ad_{mso} - (Ab_{sc} - Ab_{sm})} \times 100$$

Aa = Absorbância da amostra; Ab_{sc} = Absorbância do controle de viabilidade (células não tratadas); Ab_{sm} = Absorbância do controle negativo (poços apenas com meio de cultura); Ad_{mso} = Absorbância do controle de diluente (células tratadas com DMSO).

Os valores capazes de inibir em 50% a viabilidade (IC₅₀) foi calculado e o índice de seletividade (IS) definido a partir da razão do IC₅₀ das células tumorais sobre o a linhagem não-tumorigênica. Valores de IS ≥ 2 foram considerados significativos (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

2.5 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

Inicialmente foram plaqueadas células MCF7 e MCF7/TAM em placas de 12 poços a uma densidade de 5×10^5 . O RNA foi extraído após 48h de tratamento, utilizando a concentração de 0,33 μM do Complexo III (referente à metade do valor do IC₅₀). Foi utilizado o reagente Trizol (Life Technologies) e seguidas as recomendações do fabricante. O rendimento e a pureza do RNA foram estabelecidos usando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Na transcrição reversa, 2 μg de RNA total foi desnaturado a 70°C por 5 min, resfriado em gelo por 5 min e adicionado a uma mistura contendo 10 μL de GoScript Reverse Transcription

Oligo(dT) (A2791, Promega). As amostras foram incubadas em termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystem, EUA) e as condições utilizadas foram 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior amplificação.

2.6 Ensaios de qPCR

As análises foram conduzidas em termociclador StepOnePlus™ Real Time-PCR (Applied Biosystems, EUA) e quantificados os genes alvo *ESR1* (Receptor de Estrogênio α), *ESR2* (Receptor de Estrogênio β) e *AR* (Receptor de Andr geno). O gene β 2M (Anticorpo Monoclonal Anti- β -actina) foi utilizado como referência. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. As re  es foram preparadas um volume final de 10 μ L, incluindo cDNA, primers e SYBR Green Real-Time PCR (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram: desnaturação de 95°C por 1 min, seguido de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/amplificação a 60°C por 1 min. A expressão relativa de cada mRNA foi calculada pelo método Cq comparativo após otimização da curva padrão relativa.

Tabela 1. Sequências de primers utilizados nos ensaios de qPCR.

Gene	Sequência (5' - 3')
<i>β2M</i>	F' CCT GCC GTG TGA ACC ATG T R' GCG GCA TCT TCA AAC CTC C
<i>AR</i>	F' CAT GTG GAA GCT GCA AGG TCT R' GTG TAA GTT GCG GAA GCC AGG
<i>ESR1</i>	F' CTA ACT TGC TCT TGG ACA GGA AC R' GAT TTG AGG CAC ACA AAC TCC TC
<i>ESR2</i>	F' GGG AAT GGT GAA GTG TGG CT R' TCA TGT GTA CCA ACT CCT TGT CGG

β 2M (Anticorpo Monoclonal Anti- β -actina), *AR* (Receptor de Andr geno), *ESR1* (Receptor de Estrogênio α) e *ESR2* (Receptor de Estrogênio β)

2.7 Western Blotting

Após plaqueamento das células MCF7 e MCF7/TAM utilizando uma densidade de 3×10^6 , estas foram tratadas com o Complexo III a 0,33 μ M por 48 horas. Após este período, as proteínas foram extraídas com solução tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM de NaCl, 0,25mM de EDTA pH 8,0, 1% de

Triton® X-100, 7µL β-mercaptoetanol, 4mL de glicerol, 50 mM de NaF e coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e resolvidas (20 µg para a marcação de *Bcl2* e 40 µg para Caspase 3) em gel SDS-PAGE 12%. Como normalizador foi utilizado a β-actina.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,22 µm (Bio-Rad Laboratories), as quais foram bloqueadas por xxx horas com leite desnatado 5% solubilizado em tampão Tris salino com Tween 20 (TBS-T). Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-*Bcl2* (1:2000 – Cell Signaling Technology e anti-Caspase 3 (1:1000 – Cell Signaling Technology) por 14 horas. No dia seguinte, lavou-se a membrana com TBS-T por 5 vezes para a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse (1:5000 – Sigma Aldrich) conjugado com HRP (Peroxidase de rabanete). As membranas foram, então, visualizadas com reagentes de detecção de quimioluminescência (ECL Ge Healthcare Life Sciences) em filmes autorradiográficos (GE Healthcare). Após incubação com tampão de Stripping 1x, as membranas foram marcadas com o anticorpo primário anti-β-actina por 2 horas (1:3000- Sigma Aldrich) e revelados conforme descrito anteriormente.

2.8 Análise de EROs por citometria de fluxo

A liberação de EROs foi mensurada com sonda não-fluorescente de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma Aldrich, Darmstadt, GER). Inicialmente, células MCF7/TAM (1×10^5) foram semeadas em placas de 6 poços. Após aderência, foi realizado pré-tratamento com N-Acetilcisteína 10mM (NAC) para confirmar relação entre citotoxicidade e possível indução de EROs. Depois de 30 min, os poços foram tratados com Complexo III, utilizando concentrações de 0.33 e 0.66 µM. As células foram incubadas a 37°C por 48h, lavadas com PBS, centrifugadas e o pellet ressuspensão para incubação com sonda (20 µM) por 30 min a 37°C na ausência de luz. A intensidade da fluorescência foi detectada pelo citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter) e os dados analisados no software Kaluza (versão 1.5).

2.9 Análises Estatísticas

Foram realizados três ensaios independente em triplicata, os resultados apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os dados analisados no programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). Após confirmação da distribuição normal dos dados pelo teste Kolmogorov–Smirnov, as diferenças estatísticas para o teste de citotoxicidade foram determinadas por variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey HSD post hoc. O IC50 foi definido a partir da regressão não linear relacionando a porcentagem de viabilidade celular em função do logaritmo das concentrações testadas. Para os ensaios de RT-qPCR e Western Blot foi utilizado o teste t. Finalmente, para os ensaios em citometria de fluxo, foi empregado ANOVA e teste de Dunnet HSD post hoc. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

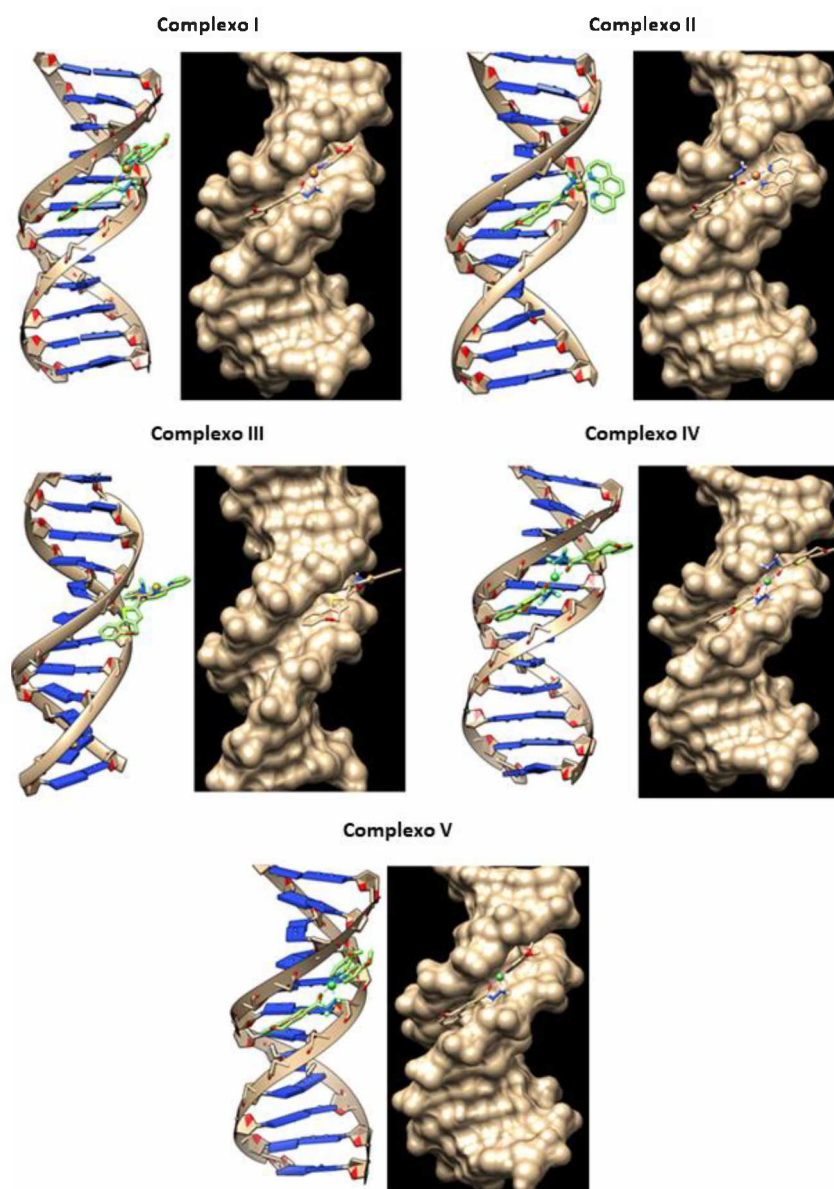
3.1 Docking Molecular

Estudos de *docking* molecular são importantes na compreensão de interações moleculares (DHAHAGANI et al., 2018). O uso de softwares de acoplamento, como o AutoDock Tools 4.2, permite prever os tipos de ligação que ocorrem fornecendo informações importantes sobre diferentes complexos com potencial terapêutico (SHAHABADI et al., 2017). Neste trabalho, as ancoragens moleculares *in silico* foram realizadas para compreender as prováveis interações entre os complexos e o DNA, predizendo a energia de ligação (ΔG) das moléculas em estudo com o dodecâmero de DNA duplex de sequência CGCGAATTCGCG (PDB ID: 1BNA) (MALEKSHAH et al., 2019).

Para cada complexo, foram realizadas 100 docagens, as quais foram selecionadas a partir dos valores de ΔG , ranqueados pelo próprio programa (MENG et al., 2011; ABDOLMALEKI et al., 2021). Todos os complexos testados apresentaram preferência pelas regiões dos sulcos menores de DNA (Figura 2). Compostos que interagem diretamente com os sulcos de DNA desempenham papel

crucial no desenvolvimento de agentes antitumorais, uma vez que podem influenciar a expressão de genes (ALI; BHATTACHARYA, 2014; VARDEVANYAN et al., 2018).

Figura 2. Arranjos geométricos de *docking* molecular dos complexos metálicos de Cu e Ni.



Para os complexos avaliados nesse estudo, os valores de ΔG estão apresentados na Tabela 2. As pontuações obtidas *in silico* indicam alta probabilidade de interação com o DNA molde (HALEEL et al., 2014; NOORUSSABAH et al., 2020), uma vez que os valores de ΔG são inversamente proporcionais, ou seja, quanto menores, maior a afinidade entre as moléculas (KITAMURA et al., 2014). Além disso, observou-se que as ligações intermoleculares entre os complexos e o DNA se deram por meio de ligações de hidrogênio (H) e ligações hidrofóbicas. As ligações

de H estiveram presentes nos seguintes resíduos de DNA: Complexo I dA18 e dC9; Complexo II dC9 e dG10; Complexo III dC9 e dG 10; Complexo IV dC9 e dA18; e Complexo V dC9 e dA18. Nesse tipo de ligação ocorre o fenômeno de otimização e minimização do encaixe molecular, processo no qual se previne o colapso entre ligante e alvo. Em outras palavras, a estabilidade dos ligantes no sítio-ligação permite uma melhor afinidade de ligação entre as moléculas e consequentemente aumenta a eficácia do medicamento (SASTRY et al., 2013; SALO-AHEN et al., 2021).

Tabela 2. Principais parâmetros de *docking* molecular dos complexos metálicos de Cu e Ni.

Complexo Proteína Ligante	Energia de Ligação Livre Estimada ΔG	Sulco de Ligação	Resíduos de DNA que interagiram por ligações de H	Resíduos de DNA que interagiram por ligação hidrofóbica
I	-12.73 kcal/mol	Sulco menor	dA18, dC9	dA17, dC11, dG10, dG16, dT7, dT8, dT20, dT19
II	-12.61 kcal/mol	Sulco menor	dC9, dG10	dT7, dT8, dT19, dT20
III	-11.69 kcal/mol	Sulco menor	dC9, dG10	dA18, dT7, dT8, dT19, dT20
IV	-14.99 kcal/mol	Sulco menor	dC9, dG10	dA18, dC11, dG12, dT8, dT19, dT20
V	-12.77 kcal/mol	Sulco menor	dC9, dA18	dA17, dC11, dG10, dG16, dT7, dT8, dT19, dT20

Vale destacar também as interações hidrofóbicas que ocorreram: Complexo I dA17, dC11, dG10, dG16, dT7, dT8, dT20, dT19; Complexo II dT7, dT8, dT19, dT20; Complexo III dA18, dT7, dT8, dT19, dT20; Complexo IV dA18, dC11, dG12, dT8, dT19, dT20; e Complexo V dA17, dC11, dG10, dG16, dT7, dT8, dT19, dT20. As ligações hidrofóbicas também são peças-chave na estabilização dos ligantes em um ambiente dotado de estruturas proteicas. Assim como ocorre nas ligações de H, os íons metálicos otimizam as interações hidrofóbicas aumentando a afinidade de ligação e a atividade biológica de moléculas complexas (PATIL et al., 2010; SALO-AHEN et al., 2021).

Embora as ligações de H sejam um forte indicativo para a seleção de moléculas com alta estabilidade e passíveis de se tornarem fármacos, tal parâmetro não pode ser considerado isoladamente. É importante considerar interações

estéricas (gauss1, gauss2 e repulsão), hidrofobicidade e número de ligações rotacionáveis entre átomos (TROTT; OLSON, 2010). Ademais, as ligações de H podem variar conforme o meio em que se encontram. Quando em ambiente neutro (pH 7), uma única ligação é considerada fraca, ao passo que em meio básico ou ácido a ligação pode apresentar-se mais forte. Sendo assim, as interações químicas nos sistemas biológicos variam de acordo com o estado de ionização do ligante e da macromolécula (HUNT et al., 2015; FREITAS; SCHAPIRA, 2017; PANTSAR; POSO, 2018).

Diversas drogas com ação antitumoral se ligam ao DNA. Já foi descrito que complexos de Cu apresentam capacidade de interações específicas com o DNA causando danos e conferindo atividade citotóxica que direcionam a morte celular (SANDHAUS et al., 2016). Estudos também demonstram que complexos de Ni com geometria quadrado planar têm preferência por se associar aos sulcos menores em locais ricos em A e T (YILMAZ et al., 2016). Além disso, complexos com ligantes heterocíclicos planares são eficientes e com mais afinidade ao DNA do que os ligantes livres (DESBOWIS et al., 2012; BARONE et al., 2013).

Dentre os ligantes utilizados na síntese dos complexos, o Dmb, em I e V, alonga, enrijece e desenrola a dupla hélice (BARRA; NETTO, 2015). A Fen, presente em II, é uma nucleasse artificial (PAGES et al., 2015; LOPES et al., 2018) e a Tpy, incluída em III, pode desempenhar função dupla como catalisador químico e regulador da estrutura catalítica do DNA, facilitando e acelerando suas reações (LI et al., 2015).

Referente aos complexos de Ni, Anjomshoa et al. (2019) avaliaram dois compostos a base deste metal, contendo em sua composição o ligante Dmb. Os estudos revelaram que ambos os complexos apresentaram afinidade pelos sulcos do DNA interagindo com diferentes nucleotídeos. Um dos complexos demonstrou ainda sofrer intercalação parcial. Além disso, ambos exibiram clivagem oxidativa de DNA plasmidial na presença do peróxido de hidrogênio como seu ativador. Isso justifica a citotoxicidade *in vitro* observada nas linhagens MCF7, HT-29 e U-87.

Diante de todos os dados, a ancoragem molecular realizada pelo AutoDock sugere que os cinco complexos interagiram com o DNA. Em relação a ordem crescente de probabilidade de ancoragem, baseada na melhor pontuação, foi observada a seguinte ordem para os complexos: IV>V>I>III>II. Todos os compostos apresentaram preferência de intercalação pelo sulco menor do DNA molde. Vale

lembrar que a docagem molecular permite a compreensão qualitativa acerca da atuação da molécula, mesmo não havendo a identificação e mensuração quantitativa (MENG et al., 2011; PANTSAR; POSO, 2018; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2018).

3.2 Viabilidade Celular, Valores de IC50 e IS

A citotoxicidade dos complexos de Cu e Ni sobre linhagens mamárias foi avaliada por meio de ensaios de MTT. Nos experimentos, foram testadas concentrações de 0,05, 0,25, 1,25, 6,25, 31,25 e 156,25 μ M. Embora os complexos de Cu tenham demonstrado mais citotóxicos em relação aos de Ni, ambos apresentaram efeito dose-dependente quanto a viabilidade celular. Além disso, é possível verificar que os efeitos celulares diferiram entre os tempos de tratamento. Isso mostra o papel do metabolismo em resposta aos agentes químicos. Em geral, quanto maior o tempo de exposição das células a esses compostos, mais grave é o dano oxidativo, levando, então, à apoptose (HAZEKAWA et al., 2019; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016 ZAAL; BERKERS, 2018; PIZZINO et al., 2017). Ao mesmo tempo, alguns metabólitos de agentes antitumorais podem alterar a eficácia terapêutica da droga (EDWARDSON et al., 2015).

Fármacos com base metálica são comumente caracterizados pela notória capacidade de reagir com biomoléculas e gerar metabólitos ativos (WANG et al., 2015; LISTON; DAVIS, 2017). No caso dos complexos de Cu, estes podem se ligar aos átomos de oxigênio e peróxido de hidrogênio, gerando EROs que levam ao dano oxidativo do DNA, lipídios e proteínas (SLATOR et al., 2018). Complexos de Ni também podem expressar mecanismos oxidativos por reações de acoplamento cruzado entre carbono ou por catálise (KLEIN et al., 2016; BOROS et al., 2020).

Na Tabela 3 estão os valores de IC50 e o IS para os tratamentos com os cinco complexos. Comparado a linhagem controle MCF10A, o Complexo I foi mais ativo na linhagem MCF7, principalmente após 48 horas. Enquanto isso, o Complexo II foi igualmente citotóxico a todas as linhagens. Já para o Complexo III, as linhagens tumorais apresentaram maior sensibilidade após 48 horas de tratamento, com especial destaque à linhagem MCF7. Para o Complexo IV, a viabilidade das linhagens tumorais se manteve acima de 50% nos períodos de 24 e 48 horas, exceto quando tratadas com a maior concentração da substância. Finalmente, em

relação ao Complexo V, também não foi observada atividade citotóxica para as linhagens mamárias. Apesar do Complexo I ter apresentado um IS para a linhagem MCF7 de 4,44 após 48 horas de tratamento, o IS do Complexo III para essa mesma linhagem foi de 10,8, o que direcionou os experimentos conduzidos posteriormente.

Tabela 3. Concentração necessária dos Complexos I-V para inibir a viabilidade das células mamárias em 50% (IC₅₀). Também se encontra apresentado o respectivo índice de seletividade (SI).

IC ₅₀ (SI)	24h			48h		
	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231
Complexo I	34.26	11.47 (2.98)	47.42 (0.72)	31.50	7.11 (4.44)	65.6 (0.48)
Complexo II	12.22	7.87 (1.55)	6.62 (1.84)	7.22	5.71 (1.26)	5.33 (1.07)
Complexo III	72.16	7.29 (9.89)	7.29 (6.00)	9.73	0.90 (10.8)	6.33 (1.53)
Complexo IV	75.89	NA	NA	33.94	NA	99.8 (0.34)
Complexo V	31.29	19.39 (1.61)	96.40 (0.32)	37.25	125.3 (0.29)	110.0 (0.33)

NA: não ativo na faixa de concentração avaliada. Os valores de IC₅₀ são expressos em micromolar (μ M) e foram calculados por meio da regressão não linear obtida pelo GraphPad Prism 8.0. O índice de seletividade foi determinado utilizando a razão entre o IC₅₀ da MCF10A e o IC₅₀ da linhagem de células cancerígenas.

Alguns complexos de Cu(II) já se mostraram citotóxicos a células tumorais de CM. O complexo bis [(μ 2-cloro) cloro (1,10 fenantrolina) cobre (II)], por exemplo, apresentou atividade antitumoral contra linhagens celulares B16, MDA-MB 32, A549, HT-29 e SF, com valor médio de IC₅₀ de 1,15 μ M, em comparação com 16,3 μ M para a cisplatina. A atividade do complexo foi atribuída à moderação adequada do Cu às células tumorais com o auxílio da Fen, levando à inibição do proteassoma e elevação do dano oxidativo intracelular (MROUEH et al., 2015). O ligante misto de cobre (II), [Cu(tdp)(Fen)]⁺ também foi capaz de controlar as linhagens tumorais MCF7 e MDA-MB 231, se mostrando seletivo, induzindo apoptose e necrose (LI et al., 2019). Também constituído pela Fen, o Complexo II se mostrou citotóxico às linhagens estudadas, com IC₅₀ = 6,62 e 5,33 para a MDA-MB231 após 24 e 48 horas, respectivamente e IC₅₀ = 7,87 e 5,71 para a MCF7 após 24 e 48 horas, respectivamente.

Um outro complexo de Cu (Cu (SBCM)₂) avaliado por Foo et al. (2019), foi capaz de induzir a parada do ciclo celular e a apoptose em células MCF7 deficientes

em Caspase 3, possivelmente por meio da ativação de p53. Também foi observado que antioxidantes aumentam a citotoxicidade do Cu (SBCM)₂ às células MCF7, agindo sobre a topoisomerase I, o que necessita ser avaliado em nosso estudo. Adicionalmente, o ligante Bth, presente em todos os complexos, atua como Modulador Seletivo do Receptor de Estrogênio (MSRE), o que justifica a maior sensibilidade das células MCF7. O Bth também apresenta efeito antiproliferativo, demonstrando capacidade de inibição da polimerização da tubulina e parada do ciclo celular (KERI et al., 2017). Isso explicaria a predisposição dos nossos compostos a reduzir a viabilidade celular.

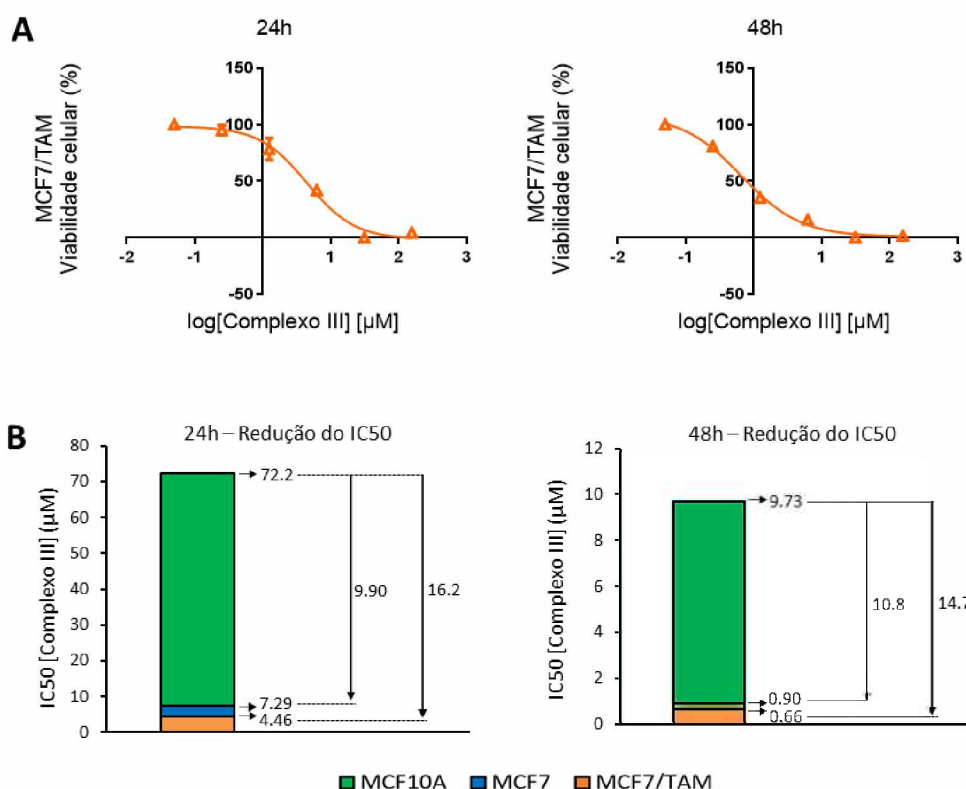
No tratamento das linhagens, o Complexo III (Bth acrescido de Tpy), revelou ser o mais promissor, principalmente contra a MCF7. Corroborando com os resultados de Karges et al. (2021), compostos com a presença do ligante Tpy tiveram efeito celular correspondente à cisplatina, tornando as espécies avaliadas potencialmente úteis para tratar cânceres resistentes. Rajalakshmi e colaboradores (2012) avaliaram o complexo [Cu(meotpy)(dmp)](NO₃)₂ em MCF7. No estudo, o valor de IC₅₀ foi de 6,25 µM. Comparativamente, nossa IC₅₀ foi menor considerando o tempo de 48 horas. O mesmo estudo sugere que as ligações de H presentes nas bases de DNA, interagindo com os átomos de N e grupos NH, no substituinte de Tpy, provocam clivagem hidrolítica do DNA elevando os níveis de citotoxicidade. Além disso, ensaios prévios de interação do complexo com DNA sugerem que o [Cu(tpy) fenazina (dppz)]²⁺ se insere nos pares de bases do DNA com seu anel aromático conjugado estendido de dppz. Graças a essa conformação, o complexo, em consonância com os nossos resultados, se revelou um potente agente antitumoral contra células MCF7, com valor de IC₅₀ de 4,57 µM. Tal resultado mantém forte correlação com sua propriedade de ligação ao DNA (ABDI et al., 2012). Portanto, apesar de não apresentado a maior pontuação nas análises *in silico*, o Complexo III foi o mais seletivo a linhagem MCF7, potencialmente aplicável como um MSRE devido à presença do Bth e potencialmente aplicável no tratamento de linhagens resistentes à presença de Tpy.

3.4 Tratamento da linhagem MCF/TAM com o Complexo III

Nesse momento, foi incluída no estudo a linhagem MCF/TAM resistente a Tamoxifeno estabelecida por nosso grupo de pesquisa e avaliada a citotoxicidade do

Complexo III a essas células (Figura 3). Interessantemente, o Complexo III foi ainda mais ativo nessa linhagem, com efeito dose-dependente com IC₅₀ de 4,46 e 0,66 μ M nos tempos de 24 e 48h, respectivamente (Figura 3A). Ademais, a seletividade foi ainda mais evidente, com valores de 16,2 e 14,7 nos tratamentos de 24 e 48h, respectivamente (Figura 3B). Essa atividade citotóxica otimizada sobre as células tumorais pode resultar na consequente minimização de efeitos adversos (NUSSBAUMER et al., 2011).

Figura 3. Efeito do Complexo III na viabilidade celular de células MCF7 resistentes ao tamoxifeno. (A) Células MCF7/TAM foram tratadas com concentrações crescentes (0 – 156,25 μ M) de Complexo III por 24 ou 48h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT. (B) Valores de IC₅₀ para Complexo III contra MCF10A, MCF7 e MCF7/TAM. A redução de IC₅₀ vezes foi determinada como a razão do IC₅₀ para MCF10A ou MCF7 para o IC₅₀ para a linha celular MCF7/TAM.



A redução do IC₅₀ foi determinada como a razão do IC₅₀ para MCF10A ou MCF7 em relação ao IC₅₀ para a linhagem celular MCF7/TAM.

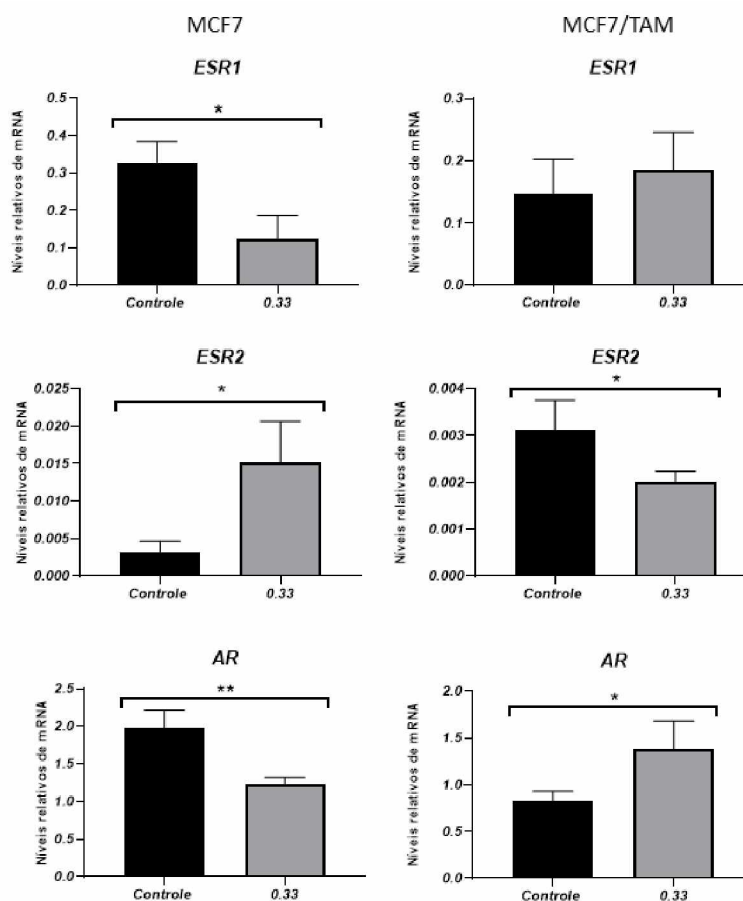
Pouco se sabe ainda sobre os efeitos do Cu em linhagens de CM RE-positivas. No estudo de Hu e colaboradores (2018), foram avaliados diferentes complexos conjugados de Platina (Pt) associados ao tamoxifeno (Pt), utilizando como modelo linhagens RE-positivas. Todos os complexos resultantes mostraram

citotoxicidade considerável às linhagens A2780 e MCF7, também com menores valores de IC₅₀ para as células MCF7/TAM. Por outro lado, o Complexo III se mostrou ainda mais ativo e eficaz e, por isso, foram avaliados os possíveis mecanismos moleculares associados à sua citotoxicidade.

3.5 Análise da expressão gênica de receptores hormonais

A partir dos valores de IC₅₀ observados para a linhagem MCF/TAM foi avaliada a expressão dos transcritos de receptores hormonais (Figura 4). A linhagem MCF7 também foi incluída no estudo. Foi estabelecida a concentração de 0,33 μ M (metade do IC₅₀) para que os efeitos observados não sejam decorrente pela expressiva morte das células.

Figura 4. Níveis relativos dos transcritos de receptores hormonais nas linhagens MCF7 e MCF/TAM após tratamento com Complexo III por 48 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 3. A significância (* p < 0,05, ** p < 0,01) foi calculada pelo teste t. *ESR1*: Receptor de estrogênio alfa, *ESR2*: Receptor de estrogênio beta e *AR*: Receptor de andrógeno.



Observou-se um comportamento oposto nas duas linhagens analisadas com diminuição da expressão de *ESR1* e *AR* e aumento de *ESR2* nas células MCF7, ao passo que na MCF/TAM houve uma diminuição dos transcritos de *ESR2* e aumento de *AR*. Contudo, na linhagem resistente, as mudanças nos níveis de mRNA não foram superiores a 2 vezes. Portanto, se mostra evidente a atuação em diferentes mecanismos do Complexo III conforme o fenótipo da célula tumoral.

O *ESR1*, quando mutado e superexpresso pode resultar em hipersensibilidade ao estrogênio, bem como em uma diminuição na sensibilidade ao tratamento endócrino induzindo vias de sinalização do fator de crescimento (SANTEN, 2002; JESELSON et al., 2015). Assim, na linhagem MCF7, a diminuição de *ESR1* indica uma ação antitumoral interessante e corrobora a capacidade de seus ligantes em modular a expressão de RE (RAHIM; O'REGAN, 2017; GIOVANNELLI et al., 2018). Na ausência de *ESR1*, o aumento da expressão de *ESR2* inibe a proliferação hormônio-dependente (HEVIR et al., 2011; HALDOSÉN et al., 2014; GHALI et al., 2018) de modo que a modulação da expressão desses genes pelo Complexo III favorece o controle dessas células mamárias transformadas.

Quanto a expressão do *AR*, sua ação no CM ainda é controversa. Hickey e colaboradores (2021) observaram em seu estudo que o receptor atua como supressor tumoral em CM RE α -positivo. Em contrapartida, Giovannelli e sua equipe (2018) observaram que embora a expressão de *AR* esteja frequentemente associada a um prognóstico favorável em CM ER α +, muitos achados sugerem que altos níveis de *AR* podem conferir resistência terapêutica. Essas ações opostas podem depender da multiplicidade de proteínas que interagem com o *AR*. Aparentemente, em células de CM ER-negativas o *AR* atua de forma mais homogênea em comparação com células as ER-positivas. Nesses tumores, o receptor demonstrou tendência ao aumento da proliferação celular (PIETRI et al., 2016).

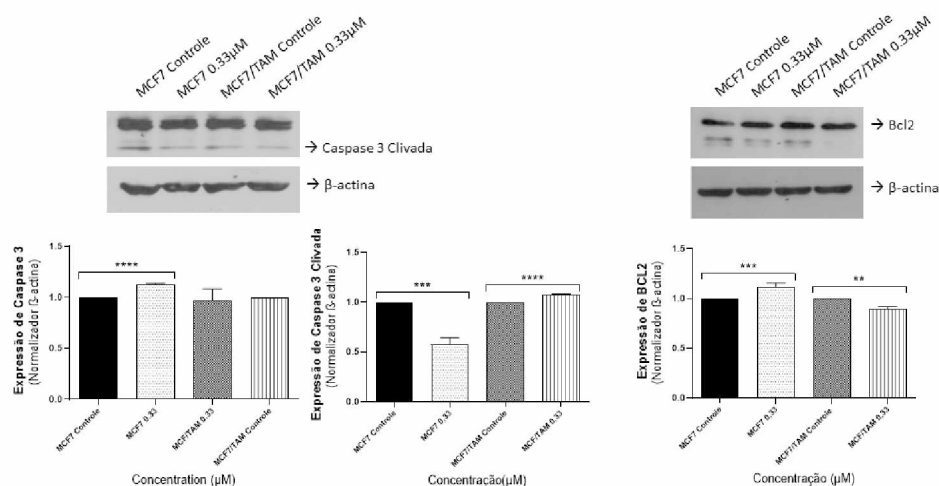
Na linhagem resistente, não foi observada expressiva alteração dos transcritos o que sugere a ação do Complexo III por meio de outras vias de sinalização celular. Portanto, investigamos seus efeitos na indução da apoptose.

3.6 Expressão de *Bcl2* e Caspase 3

Para avaliação de proteínas relacionadas à apoptose, foram realizados ensaios de Western Blotting (Figura 5). Nas células MCF7 houve uma diminuição na expressão de Caspase 3 clivada e um aumento de *Bcl2*. Na linhagem MCF7/TAM o resultado foi inverso, com aumento de Caspase 3 e diminuição de *Bcl2*. Portanto, se mostra evidente a modulação hormonal do Complexo III nas células MCF7 e uma indução da apoptose na linhagem resistente, independente da expressão dos receptores.

Alguns complexos de Cu (II) já demonstram atuar sobre caspases iniciadoras (8 e 9) e executoras (3 e 6), diminuindo, assim, o crescimento tumoral (SINGH et al., 2020). *Bcl2*, por sua vez, possui ação antiapoptótica (JIN et al., 2006; LUCANTONI et al., 2021). Salimi (2015) e seu grupo de pesquisa avaliaram a correlação entre os genes *Bax/Bcl2* e perceberam que a menor expressão do *Bcl2* associada ao aumento de *Bax* mediadas pelo composto $[Cu(tpz)_2](NO_3)_2$ induziu a apoptose de células MCF7. Contraditoriamente, o Composto III avaliado em nosso trabalho aumentou a expressão de *Bcl2*. Do mesmo modo, outros alvos devem ser avaliados a fim de elucidar quais mecanismos podem estar atuando sobre a inibição e seletividade sob as células tumorais. Assim, sugerimos o Complexo III como tratamento auxiliar ao Tamoxifeno para células responsivas e, quando resistentes, esse mesmo complexo poderia ser utilizado para induzir à apoptose das células tumorais.

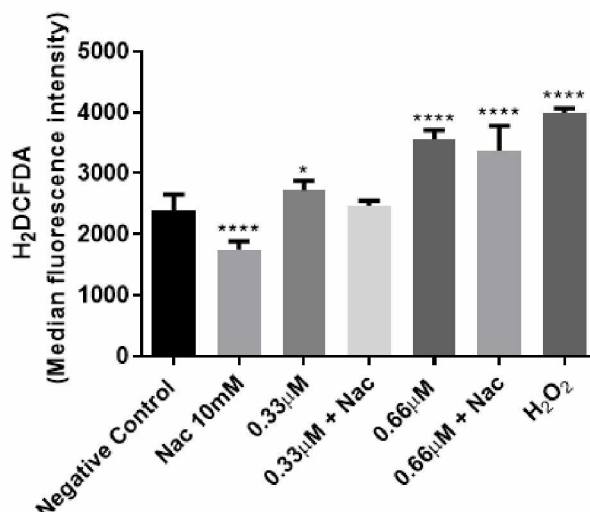
Figura 5. Níveis de expressão das proteínas Caspase 3 e *Bcl2* em células MCF7 e MCF7/TAM após o tratamento com Complexo III por 48 horas. B-actina foi utilizada como controle. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$. A significância (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) foi calculada pelo teste t.



3.7 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Diante dos resultados promissores sobre as células MCF7/TAM, foi realizado o ensaio de citometria para avaliar a produção de EROs após 48 horas de tratamento (Figura 6). Observa-se um aumento de EROs nas células tratadas, com efeito dose-dependente, o que sugere a capacidade pró-apoptótica do Complexo III nas células MCF7/TAM relacionada ao seu potencial redox. Percebe-se também que o Nac 10mM isolado não foi capaz de induzir EROs e, quando associado ao Complexo III, há uma redução desses radicais livres. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizado como controle positivo, induziu expressivamente a produção de EROs.

Figura 6. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) avaliada pela quantificação da intensidade mediana de fluorescência de H₂DCFDA por citometria de fluxo. As células MCF7/TAM foram tratadas com Complexo III e Nac 10 mM. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. *p < 0,05 e ****p < 0,0001. A comparação com o controle negativo foi realizada por ANOVA one-way seguida de pós-teste de Dunnett.



Foo e colaboradores (2019) propõe que a citotoxicidade observada para complexo de Cu(SBCM)₂ esteja relacionado à produção de EROs intracelulares, pois outros compostos de cobre também induziram a morte celular por alto estresse oxidativo. Também sugerimos que potencial redox demonstrado pelo Complexo III decorra da redução do Cu(II) a Cu(I). Vale lembrar que o Cu(I) participa de reações do tipo Fenton que geram EROs e podem causar danos a biomoléculas funcionais, como proteínas, lipídios, DNA e RNA (JANSSON et al., 2010; MACHADO et al., 2021).

4 CONCLUSÃO

Todos os complexos apresentaram afinidade e possibilidade de interação ao sulco menor do DNA nos estudos de *docking* molecular e o Complexo III se mostrou mais seletivo à linhagem de CM luminal. Quando utilizada linhagem resistente a Tamoxifeno (MCF7/TAM) o Complexo III se mostrou ainda mais ativos, com menores valores de IC₅₀.

Quanto aos mecanismos moleculares, o composto metálico regulou os níveis transcricionais de *ESR1*, *ESR2* e *AR* na linhagem MCF7, corroborando a capacidade do ligante Tpy, presente em sua estrutura em modular RE. Já na linhagem MCF7/TAM houve ativação da via apoptótica, com a diminuição da expressão de *Bcl2* e aumento de Caspase 3 clivada, sugerindo a ação independente de hormônio do Complexo III. Por fim, houve aumento de EROs nas células resistentes.

Sendo assim, o candidato a fármaco eleito em nosso trabalho apresenta grande potencial para tratamento complementar de tumores mamários RE-positivos e potencialmente ativo no CM resistente a Tamoxifeno. Entretanto, estudos adicionais são necessários, especialmente *in vivo*, para esclarecer os efeitos sistêmicos e anti-tumorais desse complexo de cobre.

REFERÊNCIAS

- ABDI, K; HADADZADEH, H; WEIL, M; SALIMI, M. Mononuclear copper (II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu (tpy)(dppz)]²⁺: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. **Polyhedron**, v. 31, n. 1, p. 638-648, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.10.028>
- ABDOLMALEKI, A; SHIRI, F; GHASEMI, J. B. Use of Molecular Docking as a Decision-Making Tool in Drug Discovery. In: Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design. **Academic Press**, p. 229-243. 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822312-3.00010-2>
- AL-FARTUSIE, F. S; MOHSSAN, S. N. Essential trace elements and their vital roles in human body. **Indian J Adv Chem Sci**, v. 5, n. 3, p. 127-136, 2017. <https://doi.org/10.22607/IJACS.2017.503003>
- ALI, A; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 16, p. 4506-4521, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.030>
- ALMEIDA, J. C; PAIXÃO, D. A; MARZANO, I. M; ELLENA, J; PIVATTO, M; LOPES, N. P; FERREIRA, A. M. D. C; MAIA, E. C. P; GUILARDI, S; GUERRA, W. Copper (II) complexes with β -diketones and N-donor heterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron**, v. 89, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.12.026>
- ANJOMSHOA, M; TORKZADEH-MAHANI, M; SAHIHI, M; RIZZOLI, C; ANSARI, M; JANCZAK, J; ESFAHANI, SHEILA SHERAFAT; ATAIEI, F; DEHKHODAEI, M; AMIRHEIDARI, B. Tris-chelated complexes of nickel(II) with bipyridine derivatives: DNA binding and cleavage, BSA binding, molecular docking, and cytotoxicity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 15, p. 3887-3904, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1534700>
- BALSA, L. M; RUIZ, M. C; DE LA PARRA, L. S. M; BARAN, E. J; LEÓN, I. E. Anticancer and antimetastatic activity of copper (II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 204, p. 110975, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191295>
- BARONE, G; TERENCEI, A; LAURIA, A; ALMERICO, A. M; LEAL, J. M; BUSTO, N; GARCIA, B. DNA-binding of nickel (II), copper (II) and zinc (II) complexes: Structure-affinity relationships. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 19-20, p. 2848-2862, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.023>
- BARRA, C. V; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>

BOROS, E; DYSON, P. J; GASSER, G. Classification of metal-based drugs according to their mechanisms of action. **Chem**, v. 6, n. 1, p. 41-60, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.10.013>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRANDÃO, D. C. LIMA, P. M; MARTINS, I. C; CORDEIRO, C. S; CORDEIRO, A. O; VECCHI, L; GUERRA, J. F. C; ORSOLIN, P. C; GAZOLLA, M. C; COSTA, D. S; FILHO, A. A. S; ARAÚJO, T. G. Arrabidaea chica chloroform extract modulates estrogen and androgen receptors on luminal breast cancer cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03506-3>

CAO, W; CHEN, H. D; YU, Y. W; LI, N; CHEN, W. Q. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. **Chinese Medical Journal**, v. 134, n. 07, p. 783-791, 2021. <https://doi.org/10.1097/CM9.000000000000147>

DESBOUIS, D; TROITSKY, I. P; BELOUSOFF, M. J; SPICCIA, L; GRAHAM, B. Copper (II), zinc (II) and nickel (II) complexes as nuclease mimetics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 11-12, p. 897-937, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.005>

DHAHAGANI, K; KESAVAN, M. P; VINOTH, K. G. G; RAVI, L; RAJAGOPAL, G; RAJESH, J. Crystal structure, optical properties, DFT analysis of new morpholine based Schiff base ligands and their copper (II) complexes: DNA, protein docking analyses, antibacterial study and anticancer evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 90, p. 119-130, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.032>

EDWARDSON, D. W; NARENDRULA, R; CHEWCHUK, S; MISPEL-BEYER, K; MAPLETOFT, J. P. J; PARISENTI, A. M. Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines. **Current drug metabolism**, v. 16, n. 6, p. 412-426, 2015. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>

FERLAY, J; COLOMBET, M; SOERJOMATARAM, I; PARKIN, D. M; PIÑEROS, M; ZNAOR, A; BRAY, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, 2021. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

FOO, J. B; NG, L. S; LIM, J. H; TAN, P. X; LOR, Y. Z; LOO, J. S; LOWC, M. L; CHAND, L. C; BEHE, C. Y; LEONGD, S. W; YAZANGH, L. S; TOR, Y. S; HOW, C. W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by copper complex Cu (SBCM) 2 towards oestrogen-receptor positive MCF-7 breast cancer cells. **RSC advances**, v. 9, n. 32, p. 18359-18370, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9RA03130H>

FREITAS, R. F; SCHAPIRA, M. A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB. **MedChemComm**, v. 8, n. 10, p. 1970-1981, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7md00381a>

GHALI, R. M; AL-MUTAWA, M. A; AL-ANSARI, A. K; ZAIED, S; BHIRI, H; MAHJOUB, T; ALMAWI, W. Y. Differential association of ESR1 and ESR2 gene variants with the risk of breast cancer and associated features: A case-control study. **Gene**, v. 651, p. 194-199, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.011>

GIOVANNELLI, P; DI DONATO, M; GALASSO, G; DI ZAZZO, E; BILANCIO, A; MIGLIACCIO, A. The androgen receptor in breast cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 492, 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00492>

HALDOSEN, L; ZHAO, C; DAHLMAN-WRIGHT, K. Estrogen receptor beta in breast cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 665-672, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.005>

HALEEL, A; ARTHI, P; REDDY, N. D; VEENAC, V; SAKTHIVELC, N; ARUND, Y; PERUMALD, P. T; RAHIMAN, A. K. DNA binding, molecular docking and apoptotic inducing activity of nickel (II), copper (II) and zinc (II) complexes of pyridine-based tetrazolo [1, 5-a] pyrimidine ligands. **RSC advances**, v. 4, n. 105, p. 60816-60830, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4RA11197D>

HAQUE, M. M; DESAI, K.V. Pathways to endocrine therapy resistance in breast cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 573, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00573>

HAZEKAWA, M; NISHINAKAGAWA, T; KAWAKUBO-YASUKOCHI, T; NAKASHIMA, M. Evaluation of IC50 levels immediately after treatment with anticancer reagents using a real-time cell monitoring device. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 4, p. 3197-3205, 2019. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7876>

HEVIR, N; TROŠT, N; DEBELJAK, N; RIŽNER, T. L. Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. **Chemico-biological interactions**, v. 191, n. 1-3, p. 206-216, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.013>

HICKEY, T. E; SELTH, L. A; CHIA, K. M; LAVEN-LAW, G; MILIOLI, H. H; RODEN, D; HUI, S. J; FINLAY-SCHULTZ, J; EBRAHIMIE, E; BIRRELL, S. N; STELLOO, S; IGO, R; ALEXANDROU, S; CALDON, C. E; ABDEL-FATAH, T. M; ELLIS, I. O; BLACK, W; PALMIERI, C; SARTORIUS, C. A; SWARBRICK, A; LIM, E; CARROLL, J. S; TILLEY, W. D. The androgen receptor is a tumor suppressor in estrogen receptor-positive breast cancer. **Nature medicine**, v. 27, n. 2, p. 310-320, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01168-7>

HU, W; ZHAO, J; HUA, W; GOU, S. A study on platinum (IV) species containing an estrogen receptor modulator to reverse tamoxifen resistance of breast cancer. **Metallomics**, v. 10, n. 2, p. 346-359, 2018. <https://doi.org/10.1039/c7mt00289k>

HUNT, P. A; ASHWORTH, C. R.; MATTHEWS, R. P. Hydrogen bonding in ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 5, p. 1257-1288, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4CS00278D>

JANSSON, P. J; SHARPE, P. C; BERNHARDT, P. V; RICHARDSON, D. R. Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5759-5769, 2010. <https://doi.org/10.1021/jm100561b>

JESELSON, R; BUCHWALTER, G., ANGELIS, C; BROWN, M; SCHIFF, R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 12, n. 10, p. 573-583, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.117>

JIN, Z; MAY, W. S; GAO, F; FLAGG, T; DENG, X. Bcl2 suppresses DNA repair by enhancing c-Myc transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14446-14456, 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511914200>

KARGES, J; XIONG, K; BLACQUE, O; CHAO, H; GASSER, G. Highly cytotoxic copper (II) terpyridine complexes as anticancer drug candidates. **Inorganica Chimica Acta**, v. 516, p. 120137, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120137>

KERI, R. S; CHAND, K; BUDAGUMPI, S; SOMAPPA, S. B; PATIL, S. A; NAGARAJA, B. M. An overview of benzo [b] thiophene-based medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 138, p. 1002-1033, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.038>

KITAMURA, K; TAMURA, Y; UEKI, T; OGATA, K; NODA, S; HIMENO, R; CHUMAN, H. Binding free-energy calculation is a powerful tool for drug optimization: Calculation and measurement of binding free energy for 7-azaindole derivatives to glycogen synthase kinase-3 β . **Journal of Chemical Inf. and Modeling.**, v. 54(6), p. 1653–1660. 2014. <https://doi.org/10.1021/ci400719v>

KLEIN, A; SANDLEBEN, A; VOGT, N. Synthesis, Structure and Reactivity of Cyclometalated Nickel (II) Complexes: A Review and Perspective. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences**, v. 86, n. 4, p. 533-549, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40010-016-0289-6>

KUHN, M; FALK, F. C; PARADIES, J. Palladium-catalyzed C–S coupling: access to thioethers, benzo [b] thiophenes, and thieno [3, 2-b] thiophenes. **Organic Letters**, v. 13, n. 15, p. 4100-4103, 2011. <https://doi.org/10.1021/ol2016093>

LI, D. D; YAGÜE, E; WANG, L. Y; DAI, L. L; YANG, Z. B; ZHI, S; ZHANG, N; ZHAO, X. M; HU, Y. H. Novel copper complexes that inhibit the proteasome and trigger apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 10, n. 9, p. 1328-1335, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00284>

LI, Y; CHENG, M; HAO, J; WANG, C; JIA, G; LI, C. Terpyridine–Cu (II) targeting human telomeric DNA to produce highly stereospecific G-quadruplex DNA metalloenzyme. **Chemical science**, v. 6, n. 10, p. 5578-5585, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5SC01381J>

LISTON, D. R; DAVIS, M. Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: a guide for nonclinical studies. **Clinical cancer research**, v. 23, n. 14, p. 3489-3498, 2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>

LOPES, J. C; GUIMARÃES, L. M. M; NEPOMUCENO, J. C; MORELLI, S; OLIVEIRA JÚNIOR, R. J. Recombinogenic Effect of the Ternary Complex of Copper (II) with Doxycycline and 1, 10-Phenanthroline on Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 531-540, 2018. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2018.05.014>

LUCANTONI, F; SALVUCCI, M; DUSSMANN, H; PREHN, J. H. BCL (X) L and BCL2 increase mitochondrial dynamics in breast cancer cell: Evidence from functional and genetic studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 10, p. 119095, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119095>

MACHADO, P. H. A; PAIXÃO, D. A; LINO, R. C; SOUZA, T. R; SOUZA BONTEMPO, N. J; SOUSA, L. M; AZEVEDO, F. V. P. V; ORSOLIN, P. C; LIMA, P. M. A. P; MARTINS, I. C; GUERRA, J. F. C; TEIXEIRA, S. C; ARAÚJO, T. G; GOULART, L. R; MORELLI, S; GUERRA, W; OLIVEIRA JÚNIOR, R. J. A selective CuII complex with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phenanthroline displays DNA-cleaving and pro-apoptotic properties in cancer cells. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03909-1>

MALEKSHAH, R. ESHAGHI; SALEHI, M. K. M; KHALEGHIAN, A. Biological studies and computational modeling of two new copper complexes derived from β -diketones and their nano-complexes. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 72, n. 10, p. 1697-1714, 2019. <https://doi.org/10.1080/00958972.2019.1606422>

MENG, X. Y; ZHANG, H. X; MEZEI, M; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

MORRIS, G. M; HUEY, R; OLSON, A. J. Using auto dock for ligand-receptor docking. **Curr. Protoc. Bioinf.**, v. 8, n.14, p. 1–8.14, 2008. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24>

MROUEH, M; DAHER, C; HARIRI, E; DEMIRDJIAN, S; ISBER, S; CHOI, E. S; MIRTAMIZDOUST, B; HAMMUD, H. H. Magnetic property, DFT calculation, and biological activity of bis [(μ -2-chloro) chloro (1,10-phenanthroline) copper (II)] complex. **Chemico-biological interactions**, v. 231, p. 53-60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.023>

NDAGI, U; MHLONGO, N; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 599, 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

NUSSBAUMER, S; BONNABRY, P; VEUTHEY, J. L; FLEURY-SOUVERAIN, S. Analysis of anticancer drugs: a review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265-2289, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>

OLSON, O. C; KIM, H; QUAIL, D. F; FOLEY, E. A; JOYCE, J. A. Tumor-associated macrophages suppress the cytotoxic activity of antimitotic agents. **Cell Reports**, v. 19, n. 1, p. 101-113, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.038>

PAGES, B. J; ANG, D. L; WRIGHT, E. P; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4DT02700K>

PANTSAR, T; POSO, A. Binding affinity via docking: fact and fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1899, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23081899>

PATIL, R; DAS, S; STANLEY, A; YADAV, L; SUDHAKAR, A; VARMA, A. K. Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12029, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>

PIETRI, E; CONTEDECA, V; ANDREIS, D; MASSA, I; MELEGARI, E; SARTI, S; CECCONETTO, L; SCHIRONE, A; BRAVACCINI, S; SERRA, P; FEDELI, A; MALTONI, R; AMADORI, D; GIORGI, U; ROCCA, A. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. **Endocr Relat Cancer**, v. 23, n. 10, p. R485-R498, 2016. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0190>

PIZZINO, G; IRRERA, N; CUCINOTTA, M; PALLIO, G; MANNINO, F; ARCORACI, V; SQUADRITO, F; ALTAVILLA, D; BITT, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

POLLONI, L; SILVA, A. C. de S; TEIXEIRA, S. C; AZEVEDO, F. V. P. DE VASCONCELOS; ZÓIA, M. A. P; SILVA, M. S. da; LIMA, P. M. A. P; COREIA, L. I. V; ALMEIDA, J. do C; SILVA, C. V. da S; ÁVILA, V. de M. R; GOULART, L. R. F; MORELLI, S; GUERRA, W; JÚNIOR, R. J. de O. Action of copper (II) complex with β -diketone and 1, 10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108586, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D; ARCINIEGA, M; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular docking: current advances and challenges. **TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 21, 2018. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>

PUIGVERT, J. C; SANJIV, K; HELLEDAY, T. Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 2, p. 232-245, 2016. <https://doi.org/10.1111/febs.13574>

RAHIM, B; O'REGAN, R. AR signaling in breast cancer. **Cancers**, v. 9, n. 3, p. 21, 2017. <https://doi.org/10.3390/cancers9030021>

RAJALAKSHMI, S; WEYHERMÜLLER, T; DINESH, M; NAIR, B. U. Copper (II) complexes of terpyridine derivatives: a footstep towards development of

antiproliferative agent for breast cancer. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 117, p. 48-59, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.08.010>

REDZA-DUTORDOIR, M; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

SALIMI, M; ABDI, K; KANDELOUS, H. M; HADADZADEH, H; AZADMANESH, K; AMANZADEH, A; SANATI, H. Antiproliferative effects of copper (II)–polypyridyl complexes in breast cancer cells through inducing apoptosis. **BioMetals**, v. 28, n. 2, p. 267-278, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10534-015-9820-5>

SALO-AHEN, O. M. H; ALANKO, I; BHADANE, R; BONVIN, A. M; HONORATO, R. V; HOSSAIN, S; JUFFER, A. H; KABEDEV, A; LAHTELA-KAKKONEN, M; LARSEN, A. S; LESCRIER, E; MARIMUTHU, P; MIRZA, M. U; MUSTAFA, G; ALVES, A. N; PANTSAR, T; SAADABADI, A; SINGARAVELU, K; VANMEERT, M. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 71, 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9010071>

SANDHAUS, S; TAYLOR, R; EDWARDS, T; HUDDLESTON, A; WOOTEN, Y; VENKATRAMAN, R; WEBER, R. T; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A; MARTIN, P. M; CAGLE, P; TSE-DINH, Y. C; BEEBE, S. J; SEERAM, N; HOLDER, A. A. A novel copper (II) complex identified as a potent drug against colorectal and breast cancer cells and as a poison inhibitor for human topoisomerase II α . **Inorganic chemistry communications**, v. 64, p. 45-49, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2015.12.013>

SANTEN, R. J. To block estrogen's synthesis or action: that is the question. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3007-3012, 2002. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.7.8589>

SASTRY, G. M; ADZHIGIREY, M; DAY, T; ANNABHIMOJU, R; SHERMAN, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 27, n. 3, p. 221-234, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>

SHAHABADI, N; HAKIMI, M; MOROVATI, T; FATAHI, N. DNA binding affinity of a macrocyclic copper (II) complex: Spectroscopic and molecular docking studies. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 36, n. 8, p. 497-510, 2017. <https://doi.org/10.1080/15257770.2017.1332370>

SINGH, N. K; KUMBHAR, A. A; POKHAREL, Y. R; YADAV, P. N. Anticancer potency of copper (II) complexes of thiosemicarbazones. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 210, p. 111134, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111134>

SLATOR, C; MOLPHY, Z., MCKEE, V; LONG, C; BROWN, T; KELLETT, A. Di-copper metallodrugs promote NCI-60 chemotherapy via singlet oxygen and superoxide production with tandem TA/TA and AT/AT oligonucleotide discrimination.

Nucleic acids research, v. 46, n. 6, p. 2733-2750, 2018.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky105>

SOUSA, L. M; SOUZA, W. A; PAIXAO, D. A; FAZZI, R. B; TEZUKA, D. Y; LOPES, C. D; CARNEIRO, Z. A; MOREIRA, M. B; PIVATTO, M; NETTO, A. V.G; ALBUQUERQUE, S; FERREIRA, F. B; OLIVEIRA, R. J; RESENDE, J. A. L. C; LINO, R. C; OLIVEIRA JÚNIOR, R. J; FERREIRA, A. M. C; GUERRA, W. DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 511, p. 119824, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, (ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. London: Academic Press, p. 71-133. 1990.

TABREZ, S; KHAN, A. U; MIRZA, A. A; SUHAIL, M; JABIR, N. R; ZUGHAIPI, T. A; ALAM, M. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles and its therapeutic efficacy against colon cancer. **Nanotechnology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 1322-1331, 2022.

<https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0081>

TESTA, U; CASTELLI, G; PELOSI, E. Breast cancer: a molecularly heterogenous disease needing subtype-specific treatments. **Medical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 18, 2020. <https://doi.org/10.3390/medsci8010018>

THOMAS, C; GUSTAFSSON, J. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 597-608, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nrc3093>

TROTT, O; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

VARDEVANYAN, P. O; PARSADANYAN, M. A; ANTONYAN, A. P; SAHAKYAN, V. G. Spectroscopic Study of the Binding of Netropsin and Hoechst 33258 to Nucleic Acids. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 85, n. 2, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s10812-018-0653-1>

WANG, Y; WANG, H; LI, H; SUN, H. Metallomic and metalloproteomic strategies in elucidating the molecular mechanisms of metallodrugs. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 2, p. 437-447, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4DT02814G>

YILMAZ, V. T; ICSEL, C; SUYUNOVA, F; AYGUN, M; AZTOPAL, N; ULUKAYA, E. Ni (ii)/Cu (ii)/Zn (ii) 5, 5-diethylbarbiturate complexes with 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 25, p. 10466-10479, 2016.

<https://doi.org/10.1039/C6DT01726F>

ZEHRA, S; KHAN, M. S; AHMAD, I; ARJMAND, F. New tailored substituted benzothiazole Schiff base Cu (II)/Zn (II) antitumor drug entities: effect of substituents on DNA binding profile, antimicrobial and cytotoxic activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 7, p. 1863-1879, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1467794>

ZUGHAIPI, T. A; MIRZA, A. A; SUHAIL, M; JABIR, N. R; ZAIDI, S. K; WASI, S; AYAT ZAWAWI; TABREZ, S. Evaluation of Anticancer Potential of Biogenic Copper Oxide Nanoparticles (CuO NPs) against Breast Cancer. **Journal of Nanomaterials**, v. 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5326355>