

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

GISLAINE GONÇALVES ROCHA

NOVOS COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE BIOLOGICAMENTE ATIVOS
EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS

PATOS DE MINAS – MG
JANEIRO DE 2023

GISLAINE GONÇALVES ROCHA

**NOVOS COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE BIOLOGICAMENTE ATIVOS
EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

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

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS – MG

JANEIRO DE 2023

GISLAINE GONÇALVES ROCHA

**Novos complexos metálicos de cobre biologicamente ativos em células tumorais
mamárias**

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

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Dr. Raoni Pais Siqueira – Instituto de Biotecnologia – UFU
Membro

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

Patos de Minas – MG, 20 de Janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida e por me permitir enfrentar todos os obstáculos encontrados durante esses anos.

À minha família pelo apoio e compreensão da minha ausência em vários momentos. Em especial, aos meus pais que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para que esse momento se tornasse realidade. Amo vocês! Essa conquista é nossa!

À minha orientadora Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo por ter me acolhido com tanto carinho durante esses anos e pelos ensinamentos que foram fundamentais para a minha formação. Meu muito obrigada!

À minha eterna dupla, Laryssa, que foi essencial para que chegássemos juntas até aqui. Os infinitos experimentos no laboratório, as noites viradas, os finais de semana sem descanso e os surtos da graduação não seriam os mesmos sem você! Serei sempre grata por tudo o que vivemos! De 2019 pra vida!

Um agradecimento mais que especial ao meu amigo Douglas, por me ensinar com tanto amor e ser responsável por parte do meu processo de formação mesmo antes da graduação. Levarei você sempre no meu coração!

Agradeço também à querida Paulinha, por ter dedicado parte do seu tempo para dividir seus conhecimentos comigo! Obrigada por todo auxílio!

Ao meu querido companheiro Paulo, que fez toda essa jornada ser mais leve. Agradeço por sempre me apoiar e me motivar nos momentos difíceis. Sua companhia fez toda a diferença!

Aos docentes da UFU, que me ensinaram com tanta maestria e fizeram parte do meu crescimento profissional e acadêmico.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas e ao Dr. Raoni Pais Siqueira pela disponibilidade de fazerem parte da minha banca examinadora e dividirem comigo este momento.

Ao GBio pelo auxílio e colaboração durante esses anos e aos membros do LACCA pela assistência.

Aos técnicos da UFU (Lu, Carla, Renan) e em especial, o Raoni por ter nos socorrido em vários momentos durante a graduação e ter sido um grande suporte para nós!

Ao Prof. Dr. Wendell Guerra, do Instituto de Química da UFU pela parceria.

Ao CNPq, pelo financiamento do meu trabalho.

E a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para que esse sonho se realizasse!

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender”.

Clarice Lispector

RESUMO

O Câncer de Mama (CM) é a segunda neoplasia maligna mais comum entre as mulheres no Brasil, após os tumores de pele não melanoma. A quimioterapia é uma estratégia terapêutica importante e amplamente utilizada, mas o cenário de resistência e de efeitos colaterais debilitantes comprometem sua eficácia. Os compostos metálicos de cobre têm se destacado por sua capacidade de clivar o DNA, gerar espécies reativas de oxigênio e induzir a apoptose de células tumorais, com reduzida toxicidade. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de dez novos compostos metálicos de cobre e de seus ligantes nas linhagens mamárias MCF-10A (não tumorigênica), MCF7 (CM fenótipo luminal) e a MDA-MB-231 (CM fenótipo triplo-negativo). Foi adotado o ensaio de MTT em tratamentos por 24h e 48h com oito concentrações dos complexos. Para as células representativas de CM triplo-negativo observou-se uma redução na sua viabilidade, especialmente após 48 horas. Destacaram-se Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10, com valores de IC_{50} inferiores a 50 μ M após 48 horas e reduzidos pela metade quando comparados com os de 24 horas. Os menores valores de IC_{50} foram observados para Mi05 e Mi09 com índices de seletividade (IS) de 2,40 e 3,78, respectivamente após 48 horas. Os ligantes de Mi05 e Mi09 não apresentaram efeito nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231, após 48 horas. Os complexos não foram ativos à MCF7. Nossos resultados evidenciam o efeito promissor de dois novos complexos metálicos de cobre no CM triplo-negativo e estudos adicionais são necessários para investigar as vias oncogênicas moduladas por esses compostos.

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

ABSTRACT

Breast Cancer (BC) is the second most common malignancy among women in Brazil, after non-melanoma skin tumors. Chemotherapy is an important and widely used therapeutic strategy, but resistance and debilitating side effects compromise its effectiveness. Copper metal compounds have stood out for their ability to cleave DNA, to induce reactive oxygen species and promote tumor cell apoptosis, with reduced toxicity. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity of ten new metallic copper compounds and their ligands in the mammary cell lines MCF-10A (non-tumorigenic), MCF7 (BC luminal phenotype) and MDA-MB-231 (BC triple phenotype-negative). The MTT test was adopted in treatments for 24h and 48h with eight concentrations of the complexes. These were not active in the MCF7 strain. For triple-negative BC cells a reduction in their viability was observed, especially after 48 hours. Mi02, Mi05, Mi09 and Mi10 stood out, with IC_{50} values below 50 μ M after 48 hours and reduced by half when compared to 24 hours. The lowest IC_{50} values were observed for Mi05 and Mi09 with selectivity index (SI) of 2.40 and 3.78, respectively, after 48 hours. Mi05 and Mi09 ligands showed no effect on MCF-10A and MDA-MB-231 lineages after 48 hours. Our results show the promising effect of two new copper metal complexes on triple-negative BC and further studies are needed to investigate the oncogenic pathways modulated by these compounds.

Keywords: Breast Cancer. Cytotoxicity. Inorganic chemistry. Chemotherapy. Treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA1: Breast Cancer 1
BRCA2: Breast Cancer 2
CK: Creatina Quinase
CK8/18: Citoqueratina 8/18
CM: Câncer de mama
CMTN: Câncer de Mama Triplo Negativo
DMEM-F12: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco e adicionado nutrientes de F12
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EGF: Fator de crescimento epidérmico
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
FDA: Do inglês *Food and Drug Administration*
HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IC₅₀: Concentração de Inibitória de 50%
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IS: Índice de Seletividade
K562: Linhagem de Leucemia Mielóide Crônica
L15: Meio Leibowitz
MCF-10A: Célula não tumorigênica
MCF7: Célula tumoral com fenótipo luminal
MDA-MB-231: Célula com fenótipo basal
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
NOS: Carcinoma ductal invasivo
P-450: Citocromo
p53: Gene supressor tumoral
PARP: Polimerase de poli ADP-ribose
PD-1: Proteína de morte celular programada
PD-L1: Ligante de morte celular programada
PIK3CA: Do inglês *Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate3-kinase catalytic subunit*
RE: Receptor de estrógeno
RP: Receptor de progesterona
RPMI: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
TN: Tumores triplo-negativos
TNM: Classificação de tumores malignos
TP53: Gene codificante de p53
WHO: Do inglês *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. As marcas do câncer segundo Hanahan e colaboradores. (A) Características apresentadas e amplamente discutidas pelos autores em 2011. (B) Marcas emergentes e facilitadoras do fenótipo maligno. 12
- Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para o triênio 2023-2025 para o sexo feminino, com exceção do câncer de pele não melanoma. 13
- Figura 3. Seção transversal dos dutos mamários rodeados por uma espessa camada de tecido conjuntivo (estroma) contendo colágeno, fibroblastos e adipócitos. Também são visíveis pequenos alvéolos que preenchem a camada de gordura durante a amamentação. Um capilar é evidente, além de macrófagos e mastócitos, embora estes necessitem de coloração específica para visualização. As células luminais que alinham os ductos mamários e as células mioepiteliais que constituem a camada basal também são evidenciadas. 15
- Figura 4. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi01. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 26
- Figura 5. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi02. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (*** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 27
- Figura 6. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi03. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 28
- Figura 7. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi04. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 29
- Figura 8. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi05. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 30
- Figura 9. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi06. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 31
- Figura 10. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi07. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$;

- ****P<0,0001). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 32
- Figura 11. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi08. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (**P<0,01; ****P<0,0001). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 33
- Figura 12. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi09. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (*P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 34
- Figura 13. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi10. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (*P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 35
- Figura 14. Efeito dos complexos Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10 na viabilidade de células mamárias MCF-10A (não-tumorigênica) e MDA-MB-231 (tumoral triplo-negativa). Os tratamentos ocorreram por 24 e 48 horas com concentração crescente (1,25-160 µM) dos complexos. (A) Mi02. (B) Mi05. (C) Mi09. (D) Mi10. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio com MTT. 37
- Figura 15. Viabilidade celular das linhagens MCF-10A e MDA-MB-231 após tratamento com os ligantes BTACl, Clmp, BTA e Memp. Em (A) tratamento por 48 horas com BTACl e Clmp do complexo Mi05. (B) Tratamento por 48 horas com BTA e Memp do complexo Mi09. O asterisco indica significância estatística (*P<0,05; ** P<0,01; **P<0,001; **** P<0,0001). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle. 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 O Câncer de Mama: aspectos gerais.....	11
1.2 O Câncer de Mama: fatores de risco e diagnóstico	13
1.3 As classificações histológica e molecular do câncer de mama	16
1.4 O tratamento do Câncer de Mama e as limitações da quimioterapia	18
1.5 Compostos metálicos como agentes antineoplásicos promissores.....	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Complexos metálicos de cobre.....	24
3.2 Linhagens celulares	24
3.3 Viabilidade avaliada por MTT	24
3.4 Análises estatísticas	25
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer de Mama: aspectos gerais

A incidência e mortalidade por câncer têm crescido rapidamente em todo o mundo, tornando indispensáveis as discussões acerca do diagnóstico e do tratamento adequados (SIEGEL *et al.*, 2022). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2020, foram registrados, mundialmente, excetuando o câncer de pele não melanoma, mais de 19 milhões de novos casos da doença e cerca de 10 milhões de óbitos, o que torna o câncer a segunda causa de morte na população (WHO, 2020). O termo câncer abrange mais de 200 doenças, que, apesar de histologicamente diferentes, apresentam características comuns no que se refere à desregulação do ciclo celular e evasão à apoptose (ABAZA *et al.*, 2022). Globalmente, de acordo com a mais recente estimativa da WHO, os tumores mais comumente diagnosticados em 2020 foram: mama (2,26 milhões de casos), pulmão (2,20 milhões de casos), colorretal (1,93 milhões de casos), próstata (1,41 milhões) e estômago (1,09 milhões de casos). Para 2025 são previstos 21,9 milhões de novos casos, sendo 2,5 milhões apenas de Câncer de Mama (CM) (WHO, 2020).

Células malignas dividem-se descontroladamente e conseguem invadir tecidos, alcançar a corrente sanguínea e colonizar novos órgãos, fato este conhecido como metástase (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; O’SULLIVAN, 2016). Mutações acumuladas em genes chaves (proto-oncogenes e supressores de tumores) coordenam o processo tumorigênico. Nesse contexto, são definidos três estágios para o surgimento da doença: (i) o de iniciação, em que as alterações moleculares mediadas por carcinógenos (oncoaceleradores) acontecem; (ii) o de promoção, caracterizado por células geneticamente alteradas submetidas a oncopromotores e, portanto, à ação de fatores para que o tumor se estabeleça e, finalmente, o de (iii) progressão com a multiplicação descontrolada das células transformadas (TELLONI, 2017; KOO *et al.*, 2020).

Hanahan e Weinberg (2011) propuseram características comuns que auxiliam na compreensão da heterogeneidade das neoplasias malignas e são fundamentais para o avanço da doença (Figura 1). Segundo os autores, células adquirem diferentes marcas conforme alcançam um estágio maligno metastático (Figura 1A). A sustentação da sinalização proliferativa é a principal, sendo que a homeostase do ciclo celular é interrompida durante a tumorigênese. A persistência de estímulos, a ocorrência de danos no DNA e a escassez de

nutrientes geram um microambiente estressante, ao qual as células transformadas se adaptam. Em células cancerosas, vários genes supressores de tumor são inativados por mutação, deleção e mecanismos epigenéticos, permitindo a evasão à apoptose. O escape imunológico, a reprogramação do metabolismo celular, a instabilidade genômica e a inflamação também contribuem para esse processo. A invasão de células transformadas, com o rompimento da membrana basal, a imortalidade replicativa, com alterações em regiões teloméricas, e a vascularização, garantindo a sustentabilidade dessas lesões, também são marcas importantes à tumorigênese (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Recentemente, Hanahan (2022) apresentou novas características emergentes que possibilitam a formação de tumores malignos (Figura 1B), sendo estas intimamente relacionadas às anteriormente descritas. Os autores citam o desbloqueio da plasticidade fenotípica, através do qual as células se tornam capazes de escapar do estado de diferenciação terminal (YUAN; NORGARD; STANGER, 2019; HANAHAH, 2022). A reprogramação epigenética não mutacional está incorporada nesse processo, uma vez que regula a expressão gênica. Os microbiomas polimórficos também se mostram como uma característica crucial para o câncer, uma vez que a variabilidade na população de microrganismos entre indivíduos afetados pode impactar no fenótipo da doença. Por fim, a senescência é citada, sendo capaz de estimular o desenvolvimento de tumores (HANAHAH, 2022). A aquisição de todas essas características depende de alterações genômicas, sendo que certos genótipos mutantes conferem vantagem seletiva em subclones de células, possibilitando o seu crescimento (PAUL, 2020).

Figura 1. As marcas do câncer segundo Hanahan e colaboradores. (A) Características apresentadas e amplamente discutidas pelos autores em 2011. (B) Marcas emergentes e facilitadoras do fenótipo maligno.



Fonte: Adaptado, Hanahan, 2022.

No Brasil, o CM é o mais comumente identificado no sexo feminino, depois do câncer de pele não melanoma, sendo responsável por cerca de 30,1% de diagnósticos a cada ano (Figura 2). São esperados para cada ano do triênio 2023-2025, 704 mil casos novos de câncer, excluindo os casos de tumores de pele não melanoma (INCA, 2022). Considerando apenas o CM, são estimados 73.610 novos casos anuais no país, representando uma taxa ajustada de 41,89 casos por 100 mil mulheres. Por regiões brasileiras, a incidência do CM, para 100 mil mulheres será de 84,46 na região Sudeste; 71,44 na região Sul; 57,28 na região Centro-Oeste; 52,20 na região Nordeste e de 24,99 na região Norte (INCA, 2022).

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para o triênio 2023-2025 para o sexo feminino, com exceção do câncer de pele não melanoma.



	Localização primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
	Cólon e Reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	14.540	6,0%
	Glândula Tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: Adaptado, INCA, 2022.

1.2 O Câncer de Mama: fatores de risco e diagnóstico

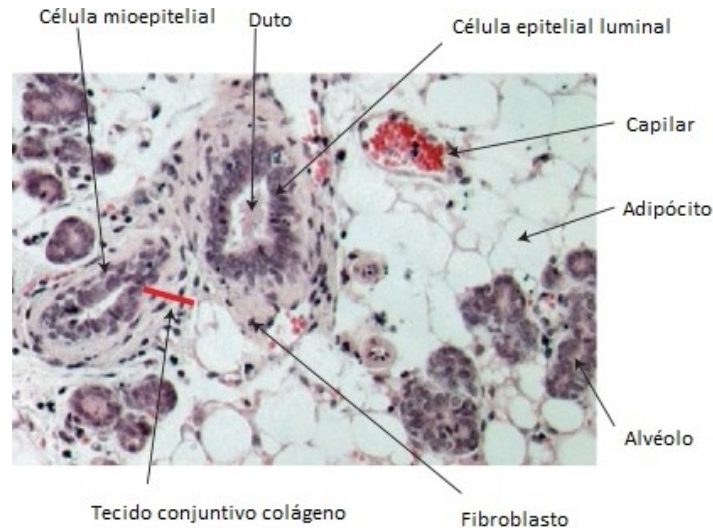
O principal fator de risco é a idade, uma vez que, com o envelhecimento, há o aumento no número de erros durante a replicação e uma ineficácia dos sistemas de reparo, o que compromete o funcionamento molecular (MANOUCHEHRI *et al.*, 2022). Além disso, destacam-se a história familiar e as mutações nos genes *BRCA1* (*Breast Cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (*Breast Cancer 2, early onset*), definidos como supressores tumorais responsáveis por regular a expressão gênica e o controle do ciclo celular. Em 90% dos casos em que há mutações nestes genes, os tumores são mais agressivos e heterogêneos (FOUNTZILAS *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2018). Um estudo realizado no Reino Unido, com uma coorte de mais de 113.000, mulheres demonstrou que aquelas com parentes de

primeiro grau diagnosticados com CM possuem um risco 1,75 vezes maior de desenvolver a doença quando comparadas com mulheres sem casos de CM na família (BREWER *et al.*, 2017). Este também é associado à história reprodutiva e hormonal das mulheres, sendo que, quando menopausadas tardiamente, o risco de desenvolver lesões na mama aumenta em cerca de 3% (BREWER *et al.*, 2017; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). A nuliparidade e menarca precoce são relacionadas a uma maior predisposição à doença (PICON-RUIZ *et al.*, 2017).

Finalmente, a exposição a carcinógenos (químicos, físicos e biológicos) e o comportamento (sedentarismo, obesidade e consumo de bebida alcoólica) também são aspectos importantes no desenvolvimento de tumores mamários (STONE; MCPHERSON; GAIL DARLINGTON, 2018). O consumo de álcool, por exemplo, pode elevar os níveis de hormônios estrogênicos no sangue, favorecendo o processo proliferativo inerente a neoplasias (COLDITZ; PETERSON, 2018; SMITH *et al.*, 2020). Uma análise fundamentada em 53 estudos epidemiológicos revelou que a ingestão de 33-44 gramas de álcool por dia é capaz de aumentar em 32% o risco para o CM (SUN *et al.*, 2017).

Nesse cenário, é de suma importância entender as características histofisiológicas da glândula mamária e como esta se comporta durante o surgimento e progressão do CM. A mama é um órgão composto de pele, tecido mamário e subcutâneo (BISWAS *et al.*, 2022). É dinâmico, uma vez que passa por diferentes mudanças morfogenéticas durante o período da puberdade, gravidez, lactação e regressão (HASSIOTOU; GEDDES, 2013). Sua base se estende anteroposteriormente da segunda à sexta costelas. Seus limites anatômicos compreendem da segunda ou terceira costela até o sulco mamário inferior e, transversalmente, da borda lateral do esterno até a linha axilar média (PANDYA; MOORE, 2011). Seu epitélio é formado por uma bicamada composta por células luminais internas que circundam a cavidade dos ductos, sendo essas rodeadas pelas células basais externas ou mioepiteliais que influenciam profundamente o desenvolvimento e a biologia da glândula (MUSCHLER; STREULI, 2010; ALEX; BHANDARY; MCGUIRE, 2020) (Figura 3). No tecido mamário, os ductos e os lóbulos são delineados por uma camada superficial denominada luminal e outra interna que possui relação com a membrana basal, que separa o epitélio do estroma. Este fornece estrutura física, nutrientes e suprimentos, sendo composto por fibroblastos inter e intralobulares, células endoteliais, adipócitos, linfócitos e macrófagos (BAZIRA; ELLIS; MAHADEVAN, 2022).

Figura 3. Seção transversal dos dutos mamários rodeados por uma espessa camada de tecido conjuntivo (estroma) contendo colágeno, fibroblastos e adipócitos. Também são visíveis pequenos alvéolos que preenchem a camada de gordura durante a amamentação. Um capilar é evidente, além de macrófagos e mastócitos, embora estes necessitem de coloração específica para visualização. As células luminais que alinham os ductos mamários e as células mioepiteliais que constituem a camada basal também são evidenciadas.



Fonte: Adaptado, Muschler; Streuli, 2010.

Os alvéolos mamários, unidades estruturais da glândula mamária, são constituídas por células secretoras rodeadas por tecido mioepitelial e organizados em 7 a 10 lobos (GUPTA; ZHANG; HUANG, 2019). Cada lobo é formado por vários ductos e lóbulos que se unem para constituir os ductos principais. Estes estão separados por septos fibrosos que se estendem da faixa profunda à pele (MASOOD, 2015; EAST *et al.*, 2017). As células epiteliais mamárias formam pequenos ductos que são responsáveis por levar o leite produzido nas glândulas até o mamilo (SOLANKI; VISSCHER, 2020).

Diferentes patologias podem acometer as estruturas da mama, podendo ser benignas ou malignas (EAST *et al.*, 2017). Os distúrbios benignos incluem mastalgia, cistos, doença fibrocística, fibroadenomas e mastites. A mastalgia é caracterizada como uma dor com origem na mama, podendo ser dividida em uni ou bilateral, focal ou difusa, constante ou intermitente (MOHAMMED, 2020). Além disso, pode ser cíclica ou acíclica, em que a primeira é relacionada ao ciclo menstrual e a segunda costuma ser focal, constante ou intermitente, associada à cisto simples ou até a um CM (GENÇ *et al.*, 2017; SOLANKI; VISSCHER, 2020). O cisto mamário é um nódulo cheio de líquido que se forma no ducto terminal da unidade lobular mamária, podendo ser simples (benigno) ou complexo, com bordas mais grossas e irregulares (ATHANASIOU *et al.*, 2014). A doença fibrocística é um distúrbio comum entre as mulheres com a presença de dor, cistos e nódulos benignos simultâneos. Algumas dessas alterações estão associadas a um aumento no risco de CM (MALHERBE;

KHAN; FATIMA, 2022). O fibroadenoma é um tumor benigno que geralmente surge em mulheres com menos de 30 anos. São nódulos facilmente mobilizados e possuem bordas nitidamente definidas, que podem ser apalpadas durante o autoexame (GUPTA; ZHANG; HUANG, 2019). Finalmente, as mastites, ou infecções da mama, que podem vir ou não acompanhadas da presença de bactérias. Normalmente, a mastite afeta apenas uma das mamas, causando dor e desconforto na região (PEVZNER; DAHAN, 2020). Ocorrem, geralmente, em mulheres no pós parto e na fase de amamentação, apesar de também acometer aquelas que não estão amamentando (WILSON; WOODD; BENOVA, 2020). Contudo, tumores malignos também podem ser detectados e, quando presentes, necessitam ser rapidamente tratados (MALHERBE; KHAN; FATIMA, 2022).

O CM, quando diagnosticado em suas fases iniciais, em que a lesão se encontra menos avançada, possui elevadas chances de cura (LØBERG *et al.*, 2015). O Ministério da Saúde sugere a mamografia de rastreamento para mulheres de 50 a 69 anos de idade, a cada dois anos. Esta é capaz de reconhecer alterações suspeitas, mas ainda assintomáticas, auxiliando na redução da taxa de mortalidade ao possibilitar o tratamento precoce (GIAMPIETRO *et al.*, 2020). Além disso, a mamografia reduz em 19% a mortalidade por CM (JAFARI *et al.*, 2018). Outro método importante para diagnóstico e monitoramento é a ultrassonografia, a qual possibilita a detecção de tumores mamários em mulheres jovens, grávidas e em fase de amamentação (GUO, 2018). A ressonância magnética é também amplamente empregada e utiliza um campo magnético e pulsos de radiofrequência, com elevada sensibilidade (HOUSSAMI; TURNER; MORROW, 2017). Já a biópsia é essencial para a confirmação da doença, em que um fragmento do nódulo é retirado e avaliado pelo patologista para a definição do diagnóstico (BICK *et al.*, 2020).

1.3 As classificações histológica e molecular do câncer de mama

Tumores mamários são classificados histologicamente e molecularmente. O carcinoma de células epiteliais é o mais comum, destacando-se o *in situ* e invasivo, sendo que o carcinoma ductal invasivo sem outras especificações (NOS) corresponde a 75% dos diagnósticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; BRAY, 2018). Este inicia-se nos ductos lactíferos e rompem seus limites acometendo tecidos próximos. Esses tumores também atingem vasos linfáticos e sanguíneos e, portanto, com potencial metastático (GOH *et al.*, 2019). O carcinoma ductal *in situ* consegue afetar os ductos mamários e se restringe a estes, não invadindo tecidos circundantes (BADVE; GÖKMEN-POLAR, 2019). Representa até

15% dos CMs recém diagnosticados (CUTULI, 2019). O carcinoma lobular *in situ* (2 a 6% dos casos) e invasivo (10% dos casos) apresentam o mesmo comportamento dos anteriores, contudo, acometem os lóbulos mamários (LOGAN *et al.*, 2015). Os menos comuns incluem o carcinoma Inflamatório, a doença de Paget e o tumor Filoide, o qual se desenvolve no tecido conjuntivo da mama (WEN; BROGI, 2018; BRAY, 2018).

Já do ponto de vista molecular são definidos quatro subtipos principais, com diferentes desfechos clínicos e, portanto, cruciais no prognóstico da doença (LARSEN *et al.*, 2018). Essa categorização foi proposta em 2000 e se baseia em dados de expressão de marcadores específicos, sendo estes o Receptor de Estrógeno (RE), o Receptor de Progesterona (RP) e o Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (PERNAS; TOLANEY, 2019). Tumores Luminal A representam cerca de 50-60% do total, sendo o subtipo mais comum (IGNATIADIS; SOTIRIOU, 2013). São positivos para RE e RP e negativos para HER2. São pouco proliferativos e expressam citoqueratinas (CK) luminais CK8/18, com melhor prognóstico e taxa de recidiva de 27,8% (significativamente inferior aos de outros subtipos) (DAI *et al.*, 2015). Os Luminal B correspondem de 10 a 20% de todos os CMs, sendo positivos para RE e/ou RP podendo ou não expressar HER2 (MCCARTHY *et al.*, 2021). Diferem dos anteriores por serem lesões altamente proliferativas e, portanto, a sobrevida das pacientes tende a ser menor que o Luminal A (LI *et al.*, 2016). Frequentemente apresentam aneuploidias e mutações dos genes *TP53* e *PIK3CA*. Uma proporção dos tumores Luminais B apresentam uma superexpressão do oncogene HER2 (ELIYATKIN *et al.*, 2015). Os tumores HER2 enriquecidos comprometem de 15 a 20% das pacientes com CM (AL-THOUBAITY, 2020). Não expressam receptores hormonais e possuem o HER2 amplificado (LAIBLE *et al.*, 2019). Essa proteína é localizada no cromossomo 17 e codifica para uma glicoproteína transmembranar que, quando expressa em baixos níveis, exerce atividade intracelular de tirosina-quinase, atuando no crescimento celular normal (FAHAD ULLAH, 2019). Morfologicamente, esses tumores são altamente proliferativos, sendo que 75% apresentam alto grau histológico e mais de 40% possuem mutações no gene *TP53* (DAI *et al.*, 2015; AL-THOUBAITY, 2020). Apresentam um comportamento clínico agressivo, mas que são suscetíveis à tratamentos com drogas anti-HER2. Finalmente, o CM triplo-negativo (CMTN), diagnosticado em cerca de 10 a 20% das lesões mamárias, é mais prevalente na pré-menopausa, não expressa nenhum dos marcadores, sendo, portanto, bastante heterogêneo (ELIYATKIN *et al.*, 2015). Esses tumores são conhecidos por não responderem à terapia endócrina, com altas taxas de recorrência. Ademais, mais de 75% das mulheres que apresentam mutação no gene *BRCA1* possuem CMTN (MCCARTHY *et al.*, 2021).

As lesões também são estadiadas utilizando-se o sistema TNM que estima o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença de metástases distantes (M) (KALLI *et al.*, 2018). Portanto, o sistema TNM objetiva determinar a extensão da doença no organismo e seu avanço acometendo outros órgãos (GIULIANO *et al.*, 2017). Nesse contexto, o CM pode ser classificado em 5 estágios (0 a 4). Nos estágios 0,1,2 a lesão se limita à mama, com maiores chances de cura (HORTOBAGYI; EDGE; GIULIANO, 2018). No estágio 3 o tumor alcançou os nódulos linfáticos e outros tecidos mamários, mas não outros locais do corpo (KOH; KIM, 2019). Por fim, no estágio 4, a doença é metastática e de pior prognóstico (CSERNI, 2018). No estadiamento também é considerado o grau do tumor sendo: Grau I ou bem diferenciado, quando as células transformadas estão crescendo mais lentamente e se assemelham ao tecido normal; Grau II ou moderadamente diferenciado, quando apresentam características intermediárias e Grau III ou pouco diferenciado, quando as células tendem a disseminar de forma agressiva (GIULIANO *et al.*, 2017; KALLI *et al.*, 2018).

1.4 O tratamento do Câncer de Mama e as limitações da quimioterapia

O tratamento do CM depende das características do tumor (histopatológica e molecular) e das condições em que as pacientes se encontram (JI *et al.*, 2020). Em fase inicial a massa é retirada cirurgicamente, por mastectomia ou quadrantectomia, com possibilidade de restauração (WANGCHINDA; ITHIMAKIN, 2016). Também pode ser adotada a radioterapia e hormonioterapia, sendo que esta depende do *status* dos receptores hormonais (WAKS; WINER, 2019). Na radioterapia são utilizadas radiações ionizantes como raios x ou gama. Apesar de as células sadias também serem passíveis de agressão, estas conseguem se reparar, o que não acontece com as tumorais (HAUSSMANN *et al.*, 2020; JI *et al.*, 2020). No CM a realização da radioterapia após a cirurgia conservadora de mama reduz o risco de recorrência em 10 anos pela metade e diminui em 20% as mortes por CM em 15 anos (OFFERSEN; OVERGAARD, 2020).

A hormonioterapia visa inibir a atividade dos hormônios em células tumorais mamárias que expressam o RE (DRĂGĂNESCU; CARMOCAN, 2017). Pode ser administrada de forma isolada ou em combinação com outras formas de tratamento (POMPEI; FERNANDES, 2020). O tratamento pode ser realizado com a administração de tamoxifeno, um antiestrogênio que bloqueia os RE nas células tumorais. Também são utilizados inibidores de aromatase como o Anastrozol, Exemestano e Letrozol (TREMONT;

LU; COLE, 2017). A aromatase é uma enzima da família do citocromo P-450 que converte a androstenediona e a testosterona em estrona e estradiol, respectivamente (POMPEI; FERNANDES, 2020; SOOD *et al.*, 2021). Já o fulvestranto age se ligando e bloqueando o RE através de sua degradação (DRĂGĂNESCU; CARMOCAN, 2017; MOO *et al.*, 2018). No CM, a terapia endócrina é relacionada à melhora da sobrevida livre da doença e da taxa de mortalidade (MAO *et al.*, 2020). Consiste em um tratamento de longa duração e com efeitos adversos como o aumento do risco de câncer de endométrio e fenômenos tromboembólicos (DIABY *et al.*, 2015). Para os inibidores de aromatase são relatadas perda óssea com consequente osteopenia e osteoporose e para o fulvestranto fogachos, náusea, astenia, cefaleia e dor (SOOD *et al.*, 2021).

A terapia alvo é um tratamento personalizado e direcionado a marcadores específicos, se destacando por sua eficácia e menos efeitos colaterais (NAGINI, 2017). A medicina personalizada é baseada na compreensão da biologia tumoral e busca analisar as especificidades moleculares das pacientes para a escolha de medicamentos precisos (MASOUD; PAGÈS, 2017; MEISEL *et al.*, 2018). São utilizados anticorpos anti-HER2 e o inibidor anti-PARP (polimerases poli (ADP-ribose)). O primeiro é indicado para tumores que superexpressam HER2, para os quais se tem disponível o anticorpo monoclonal trastuzumabe (WYNN; TANG, 2022). Apesar de alguns efeitos, este tem contribuído para o aumento na sobrevida das pacientes (DANIELS *et al.*, 2017). O modo de ação do trastuzumabe envolve o bloqueio do receptor do HER2, o qual se encontra superexpresso e, consequentemente, há o controle da divisão celular (MARTÍNEZ-SÁEZ; PRAT, 2021). Já o inibidor anti-PARP é indicado para pacientes com CMTN com os genes *BRCA1* e *BRCA2* mutados (GONÇALVES; BERTUCCI; BERTUCCI, 2020). As enzimas PARP são responsáveis pelo reparo de danos no DNA, contudo, nessas pacientes, há um acúmulo de danos decorrentes dos genes supressores tumorais mutados e, com a administração de anti-PARP, há um excesso de erros que ativa a apoptose das células tumorais (NAGINI, 2017; CORTESI; RUGO; JACKISCH, 2021). Comercialmente encontram-se disponíveis o olaparibe, rucaparibe, niraparibe, talazoparibe e veliparibe (MEISEL *et al.*, 2018).

Sistematicamente, também é adotada a imunoterapia, na qual são utilizados medicamentos que estimulam o sistema imunológico (EMENS, 2018; HENRIQUES; MENDES; MARTINS, 2021). No início de 2019, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro anticorpo monoclonal humanizado Atezolizumabe em combinação com a quimioterapia para o tratamento de pacientes com CMTN metastático positivo para a proteína ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) (HEIMES; SCHMIDT, 2019). O PD-L1

normalmente está superexpresso nas células tumorais, ligando-se ao seu receptor PD-1 na superfície das células T, inibindo-as (REDDY; CARROLL; NANDA, 2020). O Atezolizumabe bloqueia o PD-L1 permitindo a ativação das células T e, assim, a destruição das células tumorais (LATIF *et al.*, 2022). O principal objetivo da imunoterapia é proporcionar o estímulo da imunidade antitumoral, a qual pode ser obtida de maneira ativa, ao estimular uma resposta imunológica fraca aos tumores, ou passiva, fornecendo agentes imunológicos passivamente (HEIMES; SCHMIDT, 2019; SHARMNI VISHNU *et al.*, 2022).

Como a imunoterapia não é aplicável a todas as pacientes, no cenário atual, a quimioterapia permanece como uma estratégia de tratamento importante ao alvejar células tumorais circulantes. Portanto, visa impedir a ocorrência de metástases, uma vez que estas são as principais causas de morbimortalidade pela doença (MERINO BONILLA; TORRES TABANERA; ROS MENDOZA, 2017). Os quimioterápicos podem ser administrados por via intravenosa e/ou oral, em sistemas isolados ou combinados (poliquimioterapia), ou mesmo associados a outras estratégias terapêuticas, como a radioterapia (CLAESSENS *et al.*, 2020). Essas drogas são agrupadas de acordo com a sua estrutura química e mecanismos de ação (COUGHLIN, 2019).

No CM são utilizados agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, que interagem covalentemente com o DNA promovendo a alquilação de bases em ambos os filamentos (BIERSACK, 2019). Os antimetabólitos conseguem bloquear a síntese do DNA interferindo na produção bioquímica das bases nitrogenadas (ABOTALEB *et al.*, 2018). São exemplos para o CM a gencitabina e a capecitabina (TOI *et al.*, 2021). As antraciclinas fazem parte dos antibióticos antitumorais que atuam nas enzimas envolvidas na replicação do DNA, como os inibidores de topoisomerase (VAN LEEUWEN; RONCKERS, 2016). Destacam-se a doxorrubicina e a epirrubicina (NICOLAZZI *et al.*, 2018). Já os inibidores mitóticos atuam especificamente sobre as células em fase de divisão celular, estabilizando os microtúbulos, sinalizando para a apoptose (HANNA; MAYDEN, 2021). O docetaxel e, principalmente, o paclitaxel são exemplos de taxanos amplamente utilizados no tratamento do CM (ABU SAMAAAN *et al.*, 2019). Finalmente, os corticosteroides são uma classe de medicamentos que possuem ação anti-inflamatória e imunossupressora, também muito utilizados no controle de náuseas e vômitos decorrentes da quimioterapia (FISUSI; AKALA, 2019). A quimioterapia pode ser realizada antes da cirurgia (neoadjuvante) ou após a excisão da lesão (adjuvante) (COUGHLIN, 2019). Quando em estágio avançado, a doença já se encontra metastatizada e os procedimentos clínicos, como a quimioterapia paliativa, visam melhorar a qualidade de vida das pacientes, aumentando sua sobrevida (HANNA; MAYDEN, 2021).

Contudo, a especificidade da quimioterapia é reduzida, matando células normais. Neste cenário são observados diversos efeitos colaterais, por vezes debilitantes, como queda de cabelo, náuseas, perda de apetite, mal-estar e supressão do sistema imunológico (MUTEBI *et al.*, 2020). Além disso, células tumorais evadem ao tratamento e desenvolvem mecanismos de resistência comprometendo a eficácia dos compostos e a sobrevivência das pacientes (MERINO BONILLA; TORRES TABANERA; ROS MENDOZA, 2017). Portanto, torna-se necessária a busca por novas drogas antineoplásicas, destacando-se os compostos metálicos, especialmente os de cobre.

1.5 Compostos metálicos como agentes antineoplásicos promissores

As diversas aplicações biológicas de complexos metálicos têm estimulado estudos aprofundados de íons como agentes terapêuticos (MOLINARO *et al.*, 2020). O uso desses compostos, principalmente daqueles contendo metais de transição, se iniciou em 1965, com a demonstração da atividade antitumoral da Cisplatina $[PtCl_2(NH_3)_2]$ por Barnet Rosenberg e colaboradores (HECHT *et al.*, 2016). Ainda que esta droga tenha apresentado eficácia terapêutica, os efeitos colaterais se mostraram severos, associados a quadros de resistência (KHAN *et al.*, 2020). Nesse contexto, mudanças estruturais foram propostas com a utilização de análogos menos tóxicos, introduzindo ligantes quelatos em suas estruturas, o que culminou com a obtenção da carboplatina e oxalapatina, considerados quimioterápicos de segunda geração (GHOSH, 2019; WANG *et al.*, 2021). Esses complexos de metais de transição em seu estado de oxidação reduzida conseguem promover a formação de radicais livres por meio de reações de Haber-Weiss ou Fenton, as quais possuem potencial de oxidar diferentes biomoléculas (MOLINARO *et al.*, 2020; NORTHCOTE-SMITH *et al.*, 2021). A bleomicina, por exemplo, consegue gerar radicais que clivam o DNA, separando um hidrogênio da porção do açúcar da molécula (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011; MULWARE, 2013). Atualmente, diferentes protótipos vêm sendo testados e desenvolvidos incluindo diferentes metais como o rutênio, bismuto, paládio e principalmente, o cobre (KHAN *et al.*, 2020).

A forma pela qual os compostos metálicos têm sido empregados na terapia oncológica se dá sobretudo pela ligação do metal aos heteroátomos de bases nucleosídicas, proporcionando uma ligação mais estável e impedindo o processo de replicação de DNA (ZHANG *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2020). Uma vantagem de se utilizar esses compostos é a sua capacidade de formar bases de Schiff, uma estrutura que doa elétrons, sendo, portanto, de grande importância por serem estáveis e apresentarem alta afinidade por sítios ativos (GILL;

VALLIS, 2019; MASURI *et al.*, 2022). Os complexos metálicos também são capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de reagirem com moléculas celulares (HECHT *et al.*, 2016; VALENTE *et al.*, 2021). Em níveis elevados, as EROs induzem a apoptose, o que vem sendo explorado no tratamento oncológico (SANDHAUS *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2021). Além disso, os compostos contendo metais são vantajosos pela sua capacidade de coordenar ligantes em uma configuração tridimensional, permitindo a funcionalização de grupos que podem ser adaptados a alvos moleculares definidos (HUSSAIN *et al.*, 2019; QUILES *et al.*, 2020). Assim, o estado de oxidação destes complexos é uma consideração importante, uma vez que permite a participação no processo de redox, desempenhando um papel fundamental na dose ideal e na biodisponibilidade do mesmo (RAMOS-INZA; PLANO; SANMARTÍN, 2022).

O cobre está presente em todos os organismos vivos, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento humano (MENDO *et al.*, 2015). Por ser um elemento vital, sugere-se seu uso como agente antitumoral menos tóxico do que metais não essenciais como a platina (LELIÈVRE *et al.*, 2020). As propriedades dos compostos metálicos são definidas pela natureza dos quelatos, os quais podem apresentar atividade antiproliferativa. Nesse contexto, sua aplicação está ligada à sua capacidade de coordenação (BLOCKHUYS; WITTUNG-STAFSHEDE, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2019). Assim, os ligantes presentes nas moléculas conseguem neutralizar a carga dos íons de cobre, facilitando o transporte através da membrana celular e a maior interação com ácidos nucleicos e proteínas (RAMCHANDANI *et al.*, 2021). O cobre também desempenha papéis centrais em vários processos celulares, sendo um micronutriente essencial e um importante cofator para várias metaloenzimas envolvidas no metabolismo mitocondrial (citocromo c oxidase) (XIA *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2021). Além disso, são passíveis de serem combinados a outros medicamentos, em um regime quimioterápico mais efetivo no controle do câncer (MACHADO *et al.*, 2021). No caso de células tumorais, os transportadores de cobre são muito expressos, o que leva à uma maior absorção. Além disso, essas células se mantêm em alta taxa de divisão celular, fazendo com que haja maior exposição do seu material genético (DENOYER; CLATWORTHY; CATER, 2018; RUIZ *et al.*, 2022).

As atividades antitumorais das drogas à base de cobre dependem das propriedades interativas do cobre e do ligante (LELIÈVRE *et al.*, 2020). Além da toxicidade do cobre resultar de sua capacidade redox e de clivagem do DNA, também é capaz de deslocar outros íons dos sítios de ligação enzimáticos (TAN *et al.*, 2021; VALENTE *et al.*, 2021). Em alguns casos, o cobre modifica a estrutura do ligante complexado e confere melhor afinidade,

especificidade e estabilidade ao DNA (BABAK; AHN, 2021). Ullah e colaboradores conseguiram demonstrar que o cobre, quando ligado a outros compostos, como por exemplo a genisteína, induz EROs e a morte das células do CM MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (ULLAH *et al.*, 2011). Balsa e colaboradores também demonstraram a atividade antitumoral do complexo de cobre (II) com tropolone [Cu (trp)₂] em células de CM, se mostrando mais efetivo que a cisplatina pelo método MTT. Além disso, esse complexo inibiu a migração celular e induziu a apoptose (BALSA *et al.*, 2020). Em estudo prévio de Tuluze e coautores foi verificado o efeito antiproliferativo do complexo Cu (II) sintetizado com o composto 3-(3-(4-fluorophenyl)triaz-1-en-1-yl) benzene-sulfonamide, em diferentes linhagens celulares tumorais, incluindo as mamárias MCF7 e MDA-MB-231 (TULUCE *et al.*, 2018). Portanto, é notável o efeito inibitório de complexos de cobre em linhagens tumorais, evidenciando a importância de testá-los e, sobretudo, validá-los como novos agentes quimioterápicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade de novos compostos metálicos de cobre em linhagens tumorais de CM.

2.2 Objetivos específicos

- Definir as concentrações dos compostos capazes de inibir seletivamente células tumorais mamárias;
- Avaliar o comportamento dos compostos nos diferentes subtipos moleculares de CM;
- Avaliar a citotoxicidade de seus ligantes; e
- Determinar o(s) composto(s) promissor(es) para estudos detalhados de seu(s) mecanismo(s) de ação em tumores mamários.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Complexos metálicos de cobre

Os compostos metálicos Mi01, Mi02, Mi03, Mi04, Mi05, Mi06, Mi07, Mi08, Mi09 e Mi10 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Wendell Guerra do Instituto de Química da UFU em uma parceria intrainstitucional.

3.2 Linhagens celulares

Para os experimentos foram utilizadas três linhagens celulares: (i) MCF-10A (não tumorigênica epitelial mamária) (ii) MCF7 (fenótipo luminal) e (iii) MDA-MB-231 (fenótipo basal). A linhagem MCF-10A foi cultivada em meio DMEM-F12 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 0,1% de gentamicina (Cultilab®), 0,005% de EGF (Gibco®), 0,025% de Hidrocortisona (Sigma®) e 0,1% de insulina (Gibco®). As células MCF7 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de gentamicina. Já a MDA-MB-231 foi cultivada em meio L15 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de gentamicina. Todas foram mantidas em cultura a 37°C e, para a MCF-10A e MCF7, foi estabelecida uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 Viabilidade avaliada por MTT

Os efeitos dos compostos metálicos foram avaliados pelo ensaio de citotoxicidade utilizando MTT. O *screening* inicial foi realizado apenas nas linhagens tumorais e, quando ativos, ou seja, capazes de reduzir em 50% a viabilidade, foi posteriormente avaliada sua seletividade. As células foram cultivadas e, quando atingiram confluência de 80-90%, foram lavadas com Tampão fosfato-salino (PBS) 1X e desagregadas enzimaticamente. Após centrifugação por 5 min a 1.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura para plaqueamento. Foram semeadas 1×10^4 das três linhagens celulares em placas de 96 poços, com um volume de 150 µL de meio de cultura completo. Os compostos de cobre foram ressuspensos em DMSO 0,5% (Êxodo Científica®) e diluídos em série em meio de cultivo nas seguintes concentrações finais: 1,25

μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM ; 80 μM e 160 μM , adicionados após a aderência das células. Poços contendo apenas células e meio foram incluídos como controle negativo. O controle de tratamento (diluyente) foi determinado com células tratadas com DMSO, sendo as concentrações correspondentes às diluições dos compostos metálicos. Os tratamentos foram realizados por 24h e 48h e, após esse período, o reagente MTT (5 mg/mL em PBS) foi incluído juntamente com o meio de cultura completo a 10% v/v (15 μL de solução de MTT e 135 μL de meio) com 4 h de incubação a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 200 μL de DMSO foram acrescentados em todos os poços para a diluição dos cristais de Formazan. As absorbâncias foram lidas a 570 nm em leitora Multiskan FC, Thermo Scientific. Foram conduzidos três ensaios independentes em triplicata.

A viabilidade, expressa em percentagem, foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\%viabilidade\ celular = \frac{AA - ABSC}{ADMSO - ABSC} \times 100 \quad (F1)$$

Sendo:

AA = Absorbância da Amostra

ABSC = Absorbância do controle negativo (células não tratadas)

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (DMSO)

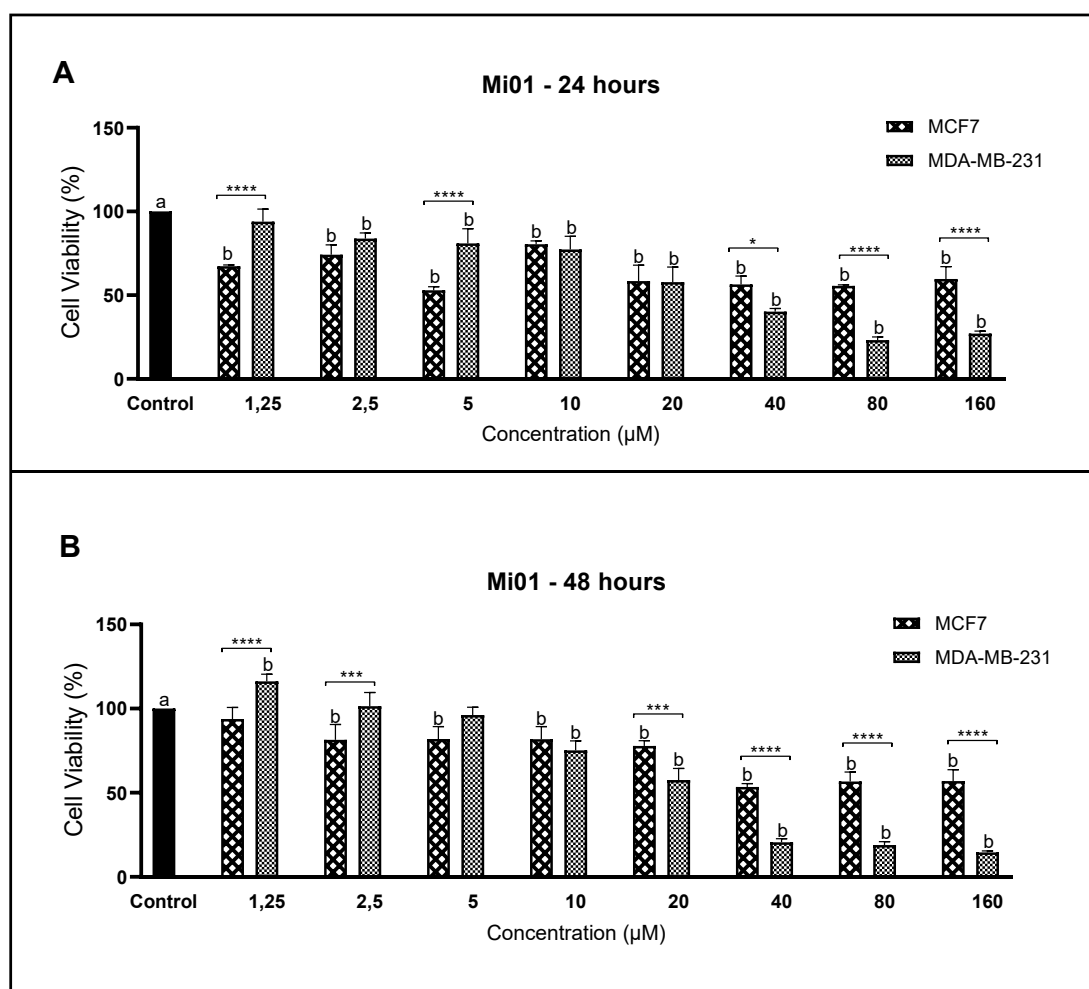
3.4 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prism 8.0 e, após confirmada a distribuição normal dos dados, foi utilizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram apresentados como média ($\pm\text{DP}$) e o IC_{50} calculado por regressão não linear. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O Índice de Seletividade (IS) foi calculado a partir da razão do IC_{50} da linhagem não tumorigênica pelo IC_{50} das células tumorais, sendo considerado significativo quando $\text{IS} > 2,0$ (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

4 RESULTADOS

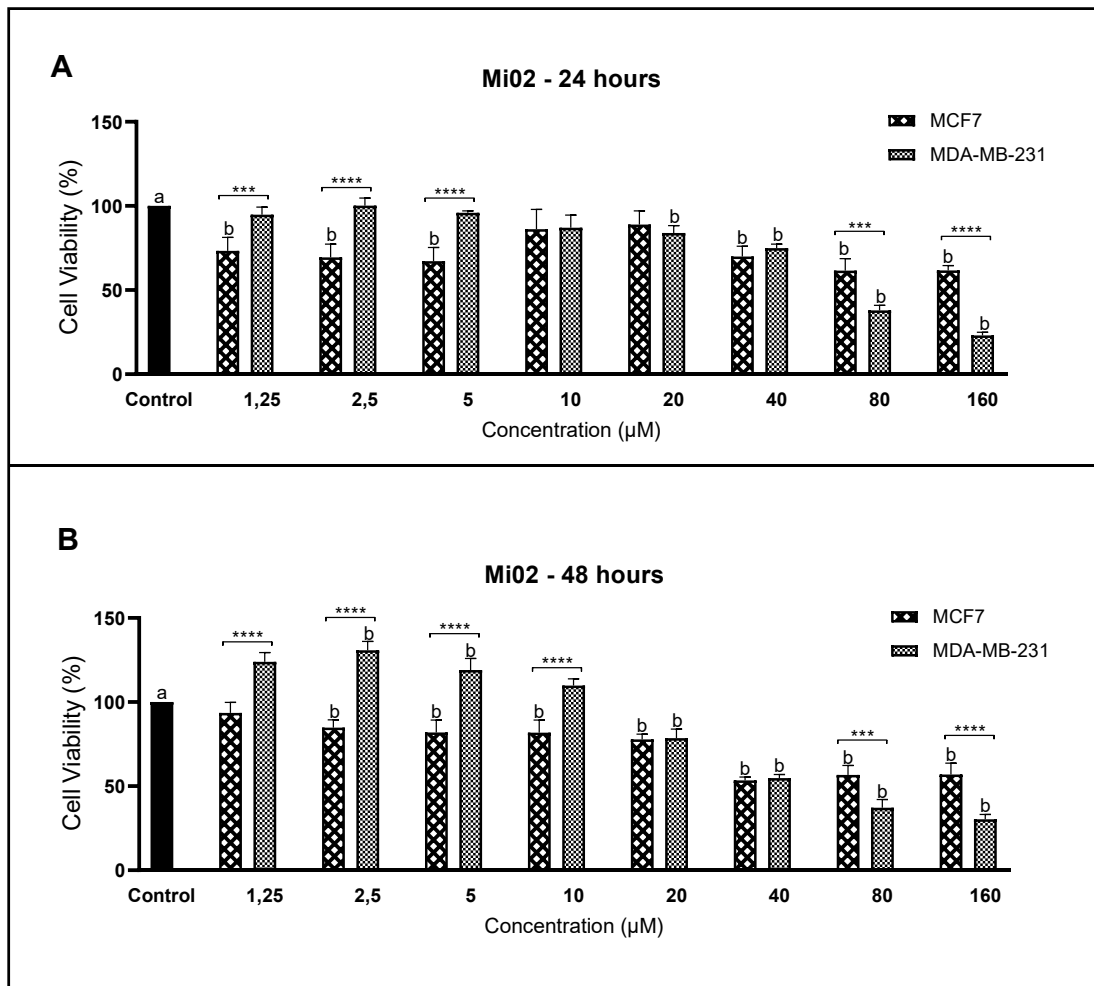
A citotoxicidade do composto Mi01 sobre as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 foi avaliada por MTT em tratamentos de 24 e 48 horas (Figura 4). Após 24 horas (Figura 4A) as concentrações de 1,25 μ M e 5 μ M foram mais citotóxicas à linhagem MCF7 em relação à MDA-MB-231. Já a partir de 40 μ M, o complexo foi mais efetivo para a linhagem representativa de CMTN. Após 48 horas (Figura 4B), as células MCF7 recuperaram sua viabilidade, contudo, a linhagem TN foi mais sensível já a partir do tratamento com 20 μ M de Mi01.

Figura 4. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi01. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



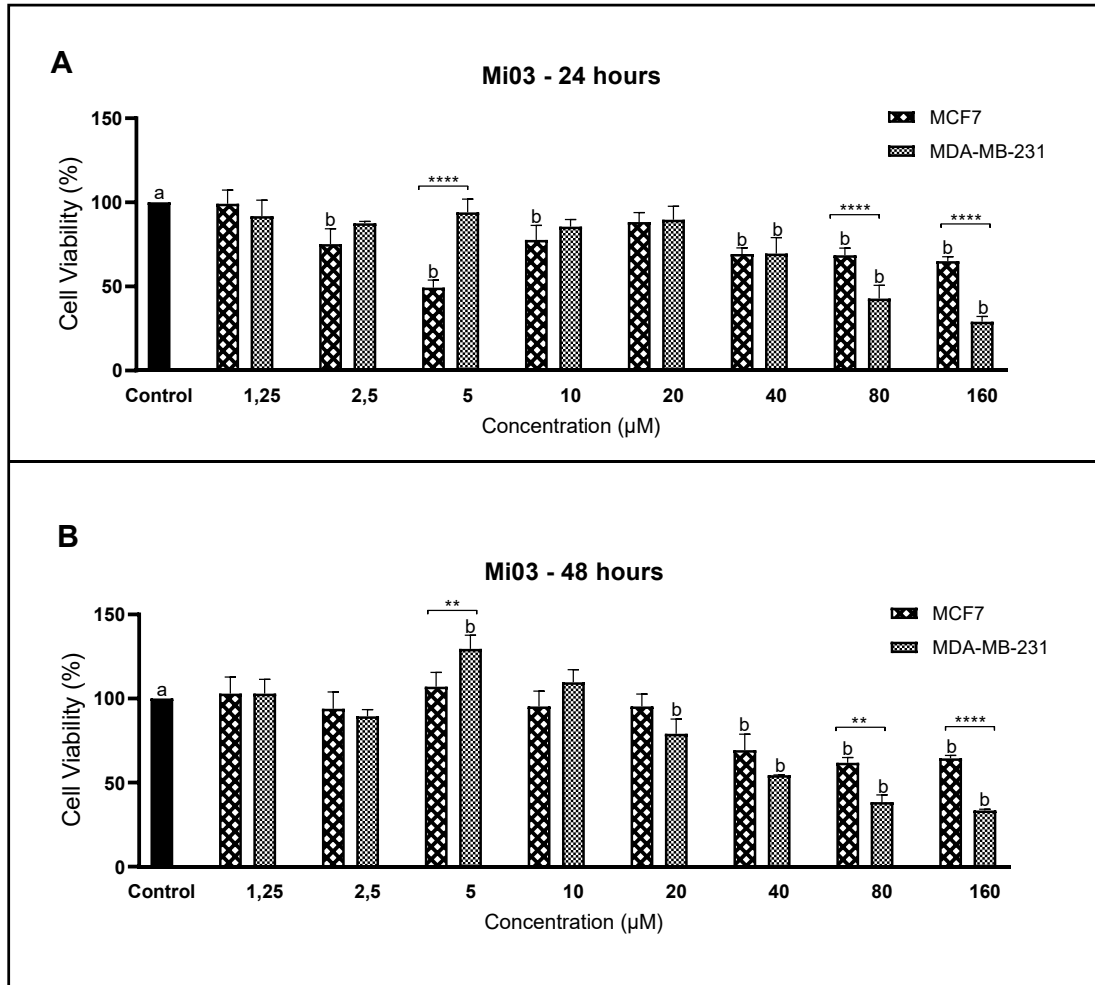
Para o composto Mi02 (Figura 5), novamente nas concentrações de 1,25 μM ; 2,5 μM e 5 μM as células tumorais luminais foram mais sensíveis ao tratamento por 24 horas (Figura 5A). Quando o complexo foi adicionado a 80 μM e 160 μM é possível observar que o efeito foi mais proeminente nas células TN. Esse perfil também foi identificado após 48 horas (Figura 5B). Além disso, nas menores concentrações (até 10 μM), as células MDA-MB-231 apresentaram um perfil proliferativo, com viabilidade superior a 100%.

Figura 5. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi02. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



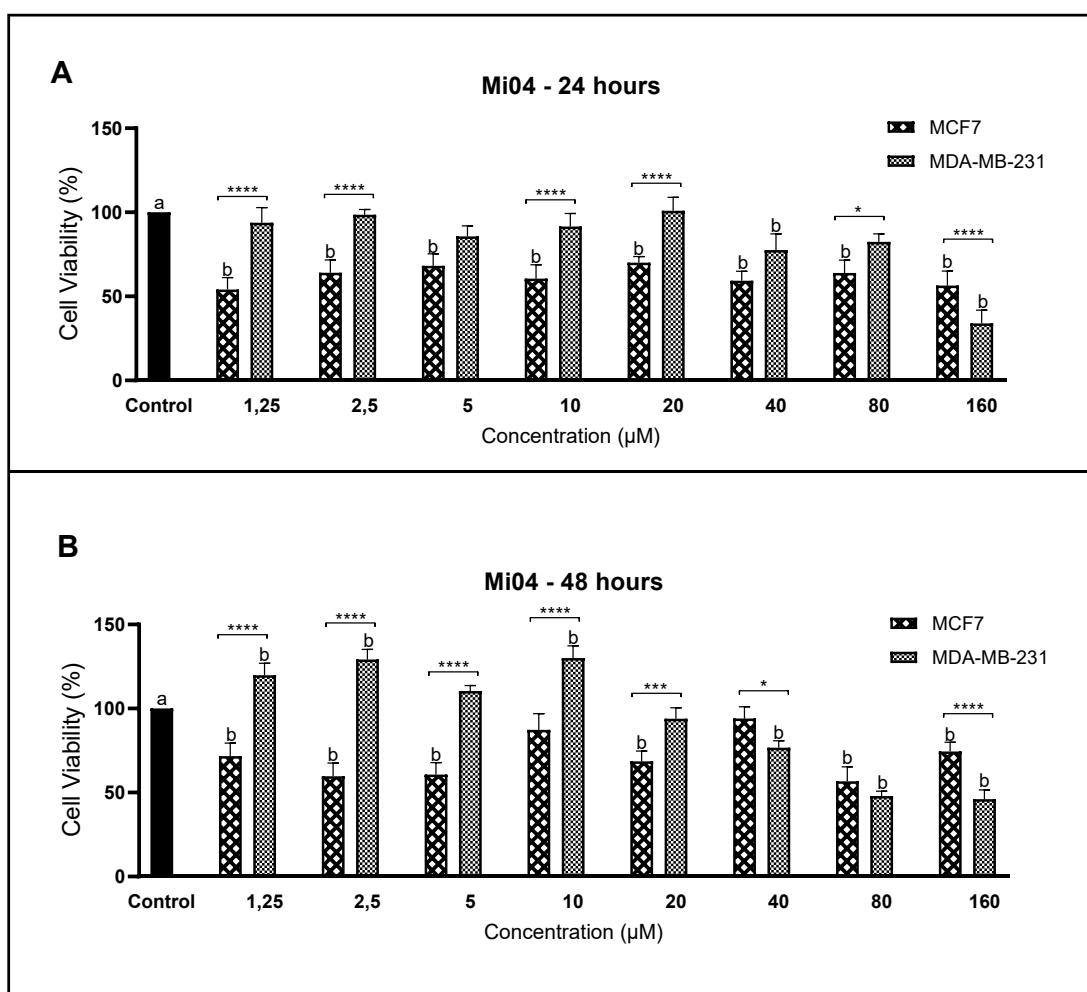
O composto metálico Mi03 (Figura 6), após 24 horas (Figura 6A), apresentou efeito citotóxico à MCF7 na concentração de 5 μM e, a partir de 80 μM , para a linhagem TN. Sua atividade foi semelhante após 48 horas (Figura 6B) de tratamento.

Figura 6. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi03. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



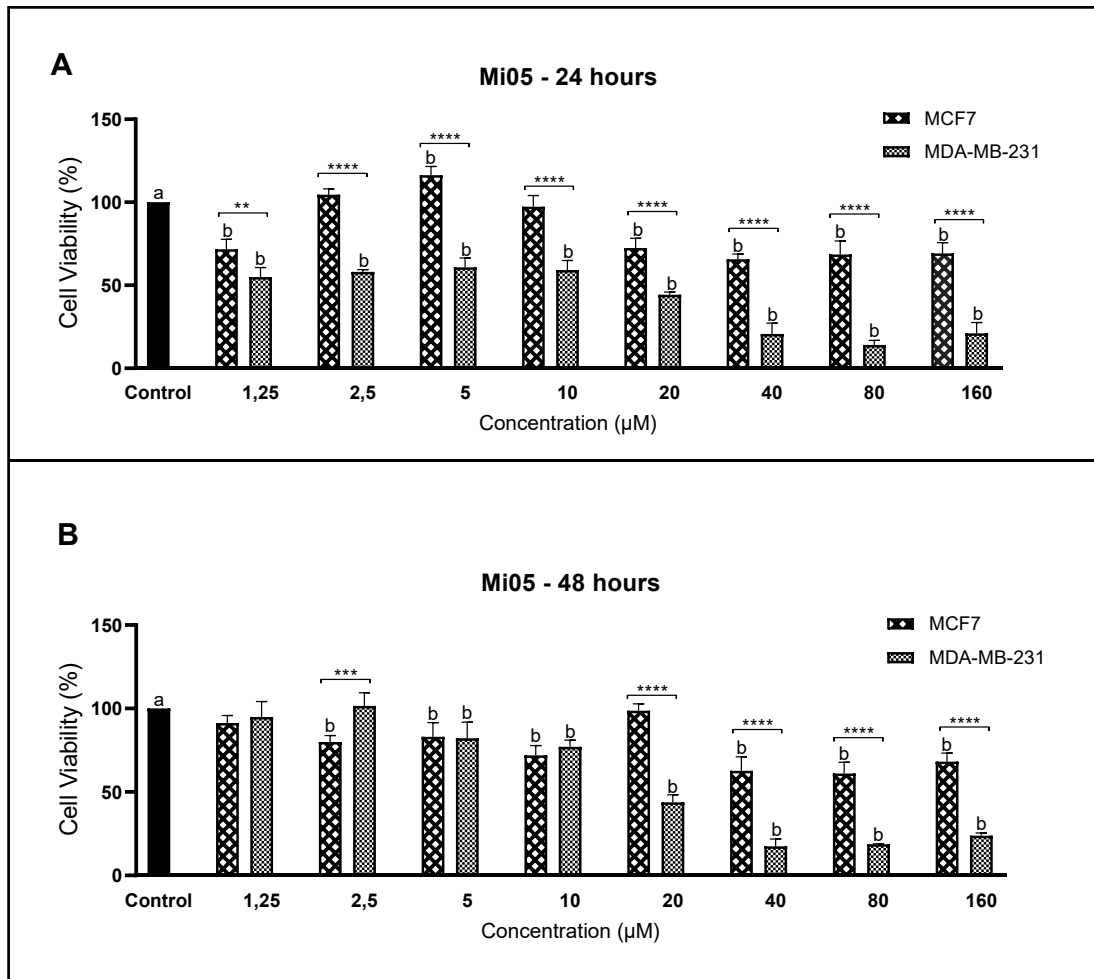
O composto Mi04 (Figura 7), após 24 horas (Figura 7A), nas concentrações 1,25 μ M; 2,5 μ M; 10 μ M; 20 μ M e 80 μ M foi mais citotóxico para as células tumorais luminais em relação a MDA-MB-231. Após 48 horas (Figura 7B), o efeito foi revertido quando Mi04 foi utilizado a 40 μ M e 160 μ M, sendo que nestas condições a viabilidade da linhagem TN foi significativamente menor quando comparada à MCF7. Também se observou a proliferação destas células nas menores concentrações testadas.

Figura 7. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi04. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



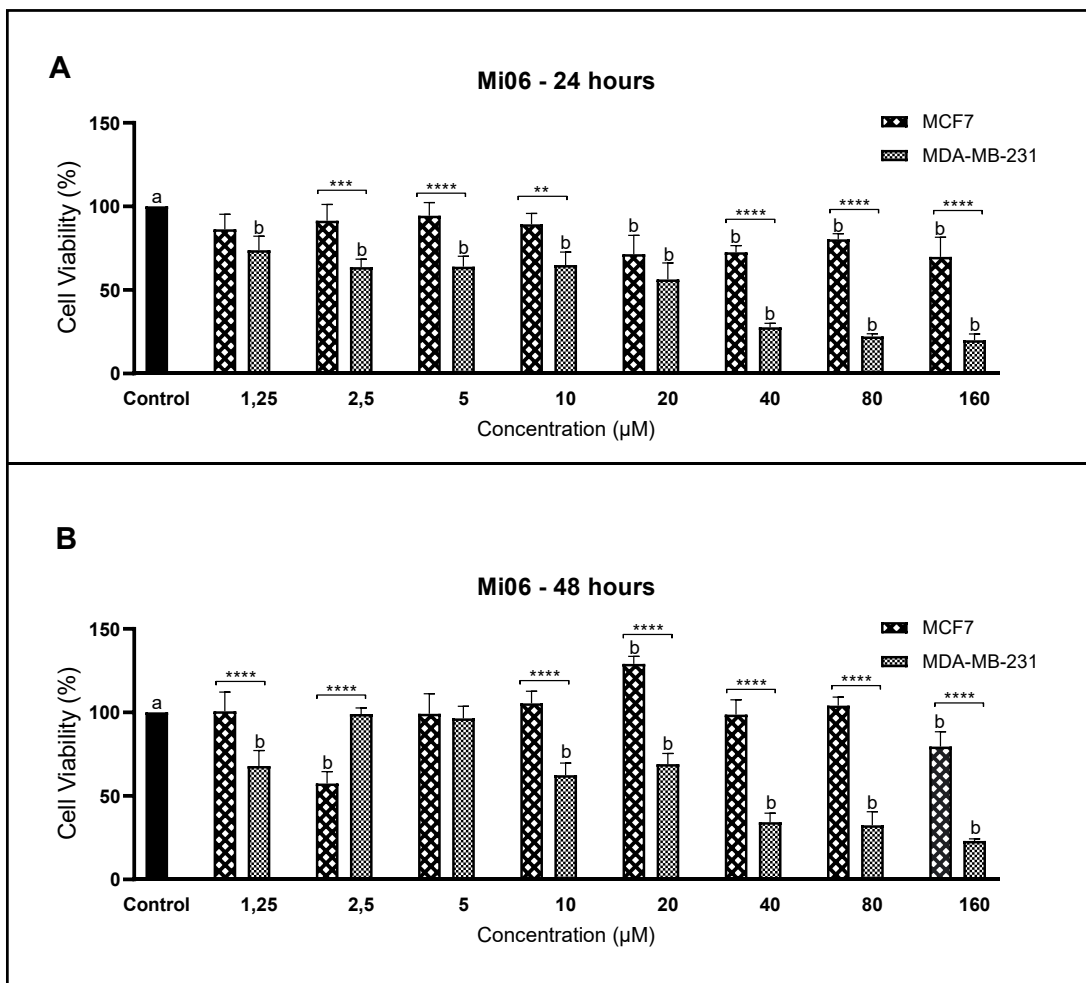
O composto metálico Mi05 (Figura 8), após 24 horas (Figura 8A), apresentou efeito citotóxico na célula TN em todas as concentrações testadas. Após 48 horas (Figura 8B) de tratamento, sua atividade foi significativa para a MDA-MB-231 apenas a partir de 20 μ M. A viabilidade da MCF7 não foi inferior a 50% nas condições experimentais.

Figura 8. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi05. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



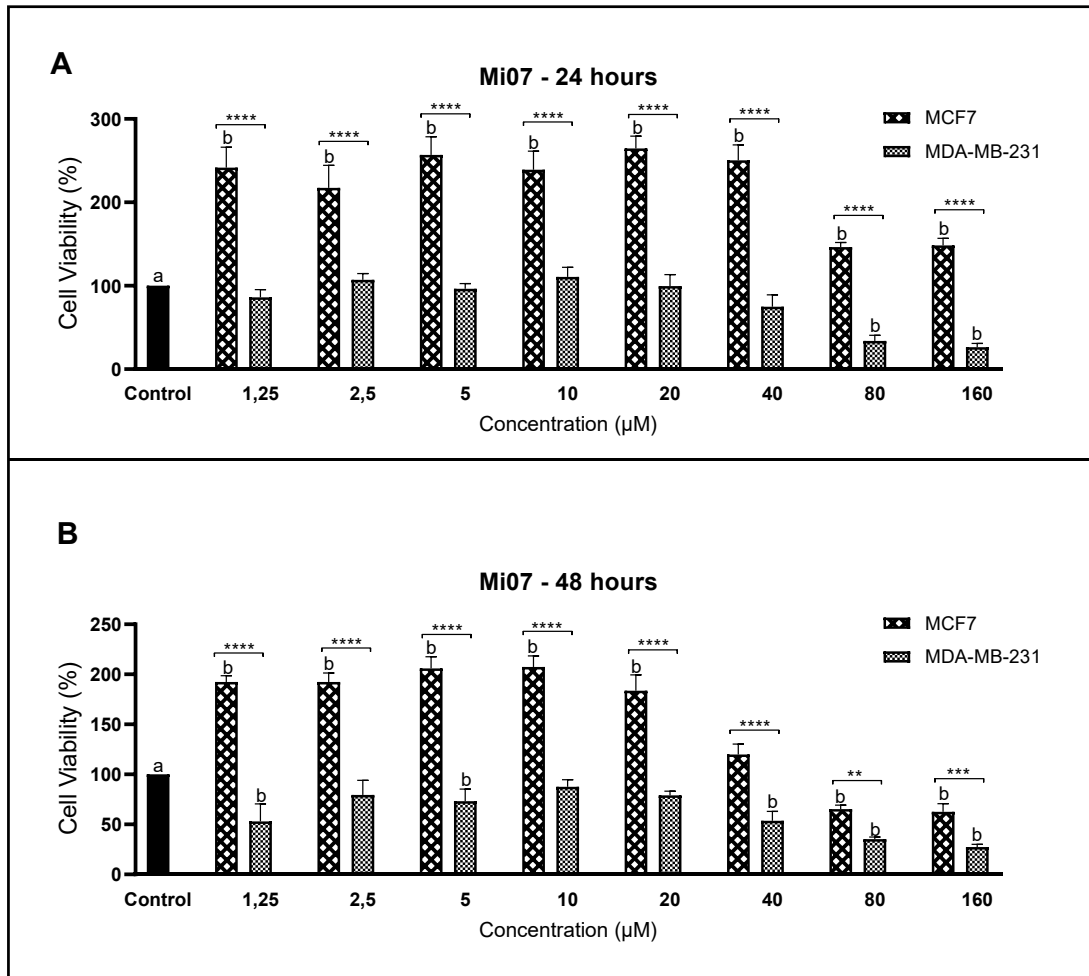
Para o composto Mi06 (Figura 9), nas concentrações a partir de 40 μM , foi possível observar uma citotoxicidade expressiva para a linhagem representativa de CMTN após 24 horas de tratamento (Figura 9A), quando comparado à MCF7. Após 48 horas (Figura 9B), o perfil para a linhagem TN se manteve, e para a MCF7, foi verificada uma ação proliferativa em praticamente todas as concentrações.

Figura 9. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi06. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



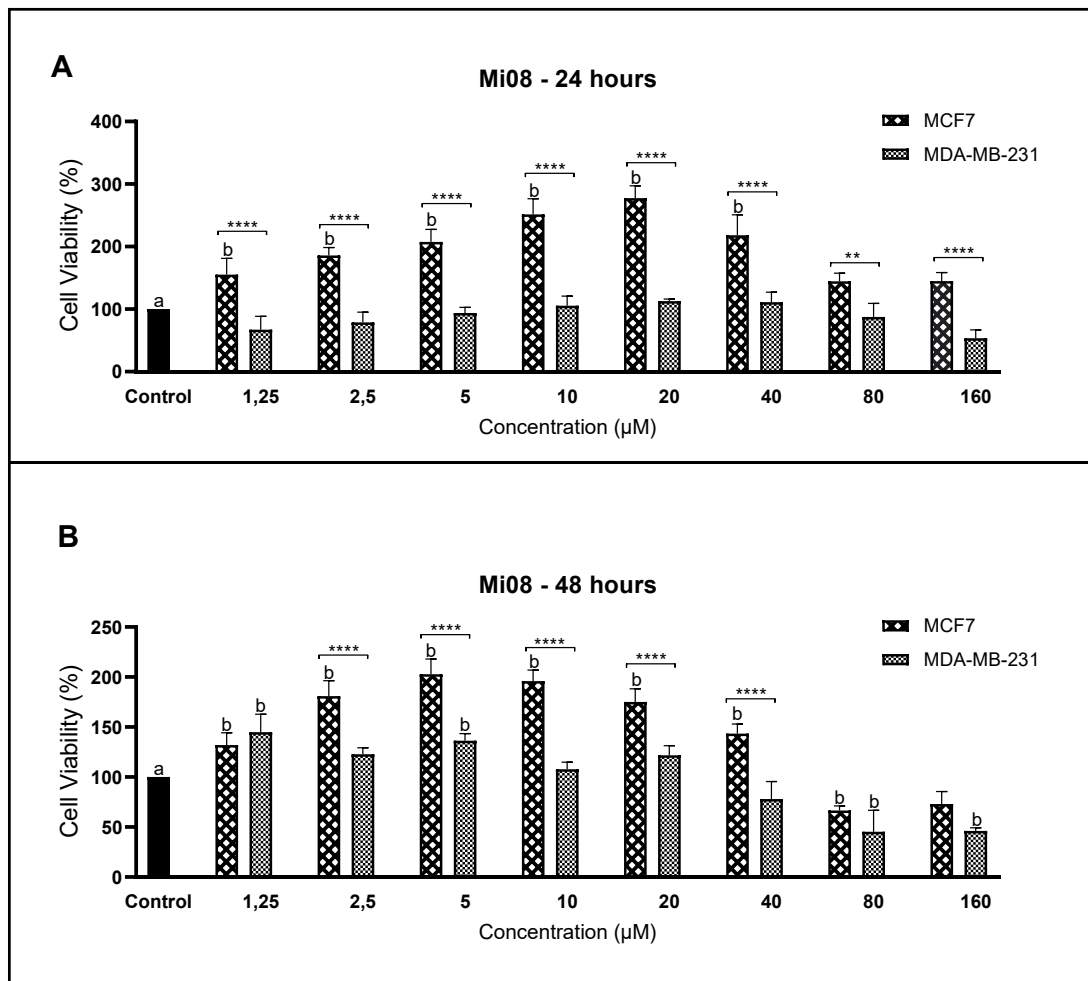
O composto Mi07 (Figura 10) induziu a proliferação da linhagem MCF7 após 24 (Figura 10A) e 48 horas (Figura 10B) de tratamentos. Para a TN, seu efeito foi mais proeminente após 48 horas, especialmente a partir de 40 μM .

Figura 10. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi07. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



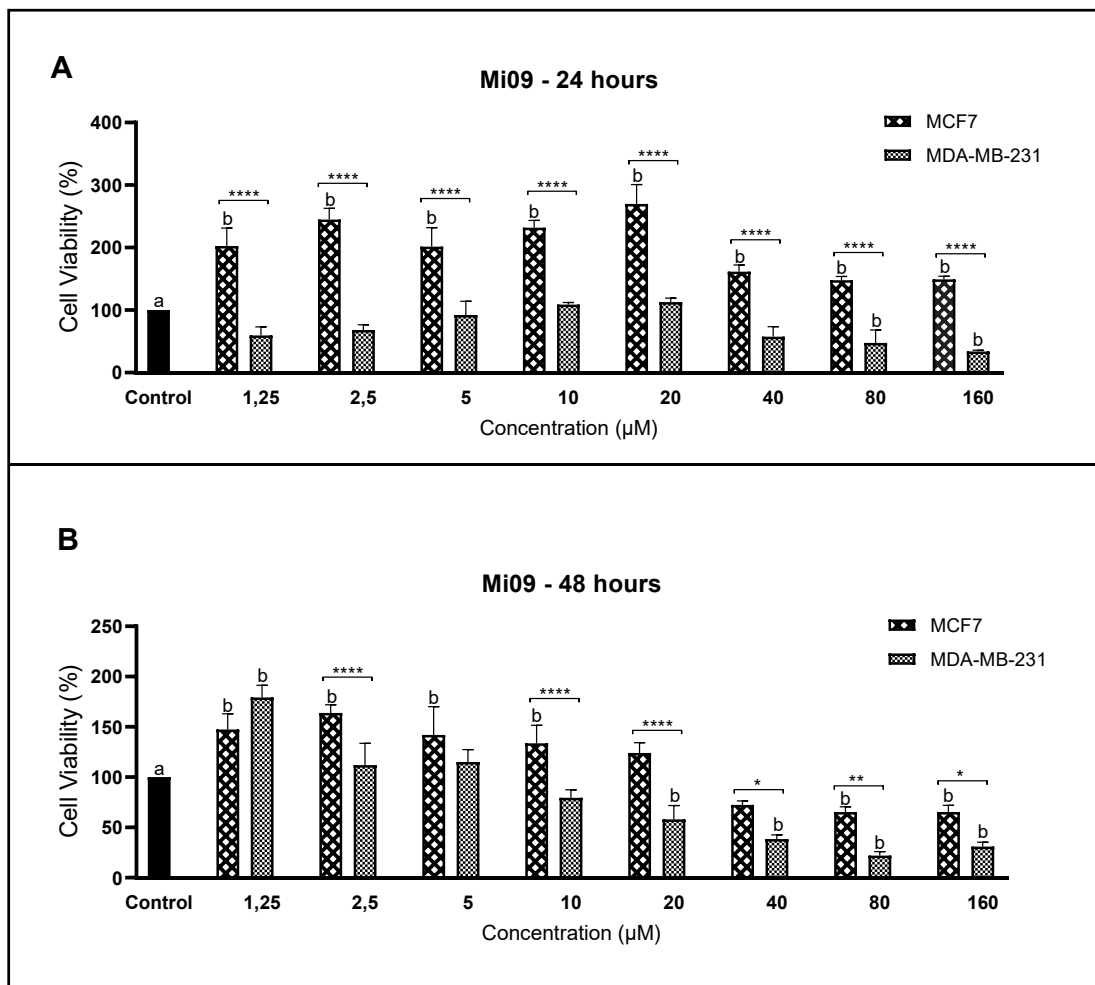
O composto Mi08 (Figura 11), em 24 horas (Figura 11A), não alterou a viabilidade das células em mais de 50% em nenhuma concentração utilizada. Destaca-se um efeito proliferativo sobre as células testadas. Após 48 horas (Figura 11B), a linhagem TN foi mais sensível a partir do tratamento com 40 μM .

Figura 11. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi08. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



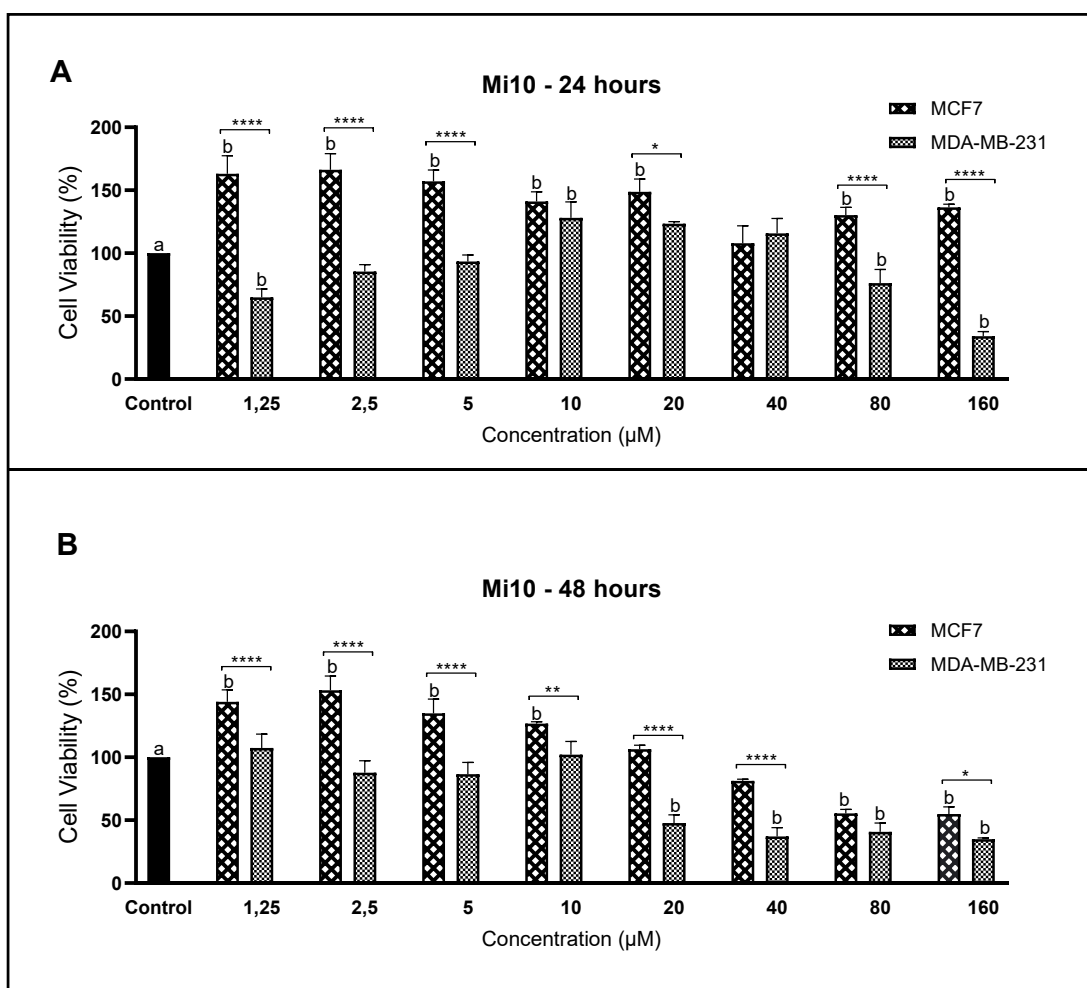
Para o composto Mi09 (Figura 12), após 24 horas (Figura 12A) e em todas as concentrações, o composto foi mais citotóxico para a célula TN em relação à MCF7. Após 48 horas (Figura 12B), as células MDA-MB-231 recuperaram sua viabilidade nas menores concentrações do complexo, mas este continuou se mostrando citotóxico quando foi utilizado a partir de 10 μ M.

Figura 12. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi09. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



O composto Mi10 (Figura 13), após 24 horas (Figura 13A), induziu a proliferação das células de CM luminal MCF7. Na TN não diminuiu a viabilidade em mais de 50% em nenhuma das concentrações testadas. Já após 48 horas (Figura 13B), o composto foi efetivo nas células MDA-MB-231 a partir da concentração de 20 μ M e, na MCF7, a partir de 40 μ M.

Figura 13. Viabilidade celular das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com o composto metálico de cobre Mi10. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



Para todos os tratamentos realizados os valores de IC_{50} foram calculados e estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que os compostos não foram capazes de reduzir a viabilidade da linhagem MCF7 em mais de 50% após 24 horas e, após 48 horas, foi ativo apenas quando utilizados em concentrações superiores a 50 μ M. Destacam-se Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10, com valores de IC_{50} inferiores a 50 μ M após 48 horas e reduzidos pela metade quando comparados com os de 24 horas na linhagem MDA-MB-231. Os menores valores de IC_{50} foram observados para Mi05 e Mi09. Esse comportamento evidencia a seletividade dos complexos à linhagem de CMTN utilizada nesse estudo.

Tabela 1: Valores de IC_{50} para os complexos metálicos de cobre sobre células tumorais mamárias nos tempos de 24 e 48 horas.

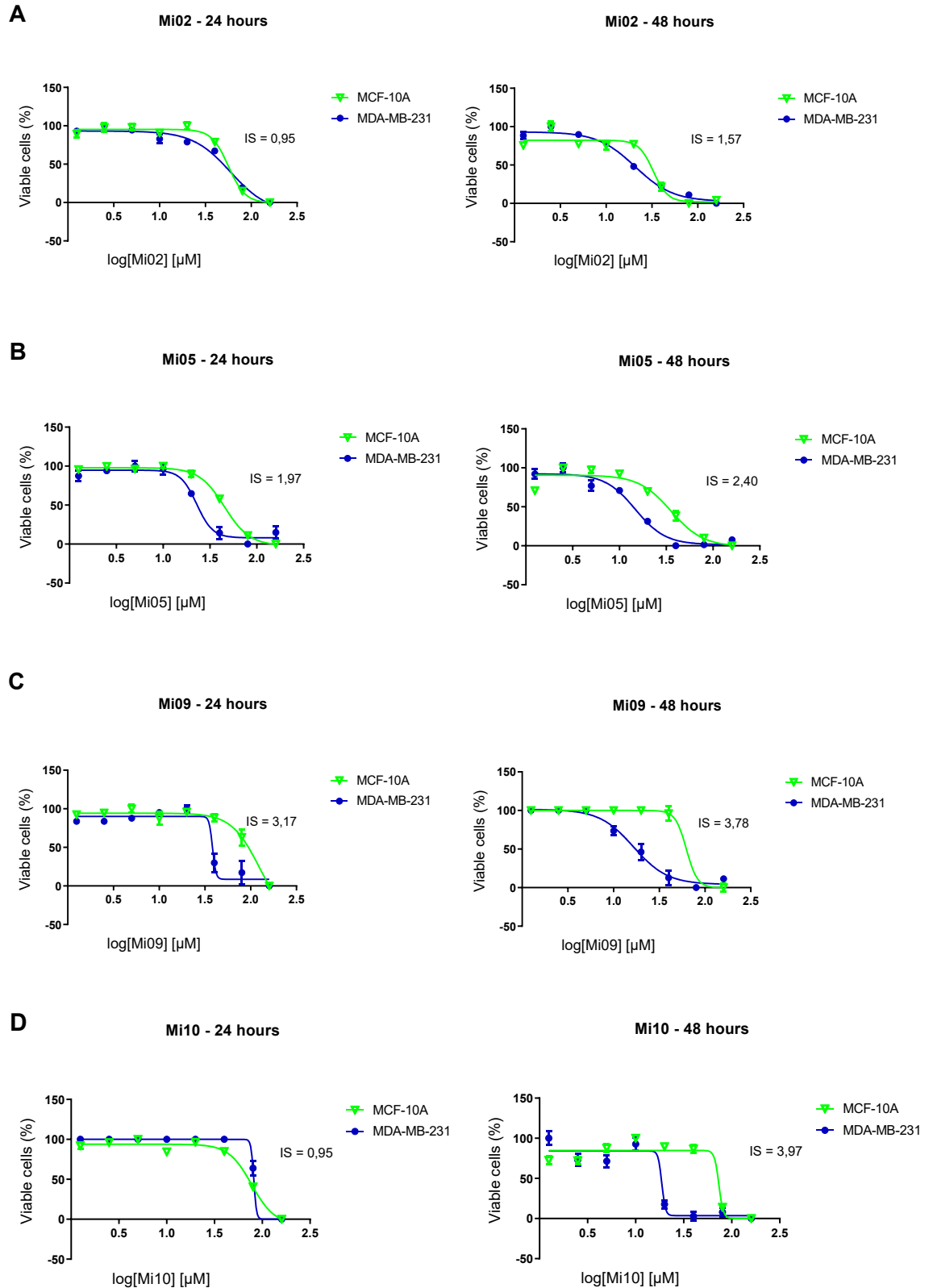
Compostos	IC_{50} (μM)			
	24h		48h	
	MCF7	MDA-MD-231	MCF7	MDA-MB-231
Mi01	ND	34,52	ND	35,33
Mi02	ND	59,31	ND	20,75
Mi03	ND	84,45	ND	59,30
Mi04	ND	135,40	ND	74,10
Mi05	ND	22,78	ND	14,75
Mi06	ND	39,92	ND	73,4
Mi07	ND	68,83	ND	51,85
Mi08	ND	ND	136,1	51,97
Mi09	ND	39,25	ND	16,50
Mi10	ND	81,25	62,87	19,00

ND: $IC_{50} > 160 \mu M$

Na Figura 14 estão apresentados os gráficos de regressão não linear comparando os valores de IC_{50} da MCF-10A e MDA-MB-231, a fim de demonstrar a seletividade de Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10. Em 24 horas, para o composto Mi02 o valor de IC_{50} foi maior para a linhagem tumoral ($IC_{50} = 59,31$) quando comparado com a linhagem não tumorigênica ($IC_{50} = 56,36$). Em 48 horas, a linhagem MCF-10A apresentou IC_{50} de 32,67, enquanto a TN $IC_{50} = 20,75$, com $IS = 1,57$. Para o complexo Mi05, em 24 horas, é observado $IC_{50} = 45,10$ para a MCF-10A e, para a MDA-MB-231, $IC_{50} = 22,78$, com $IS = 1,97$. Interessantemente, após 48 horas, os valores de IC_{50} reduziram comparados com o tempo anterior, sendo $IC_{50} = 35,45$ para a linhagem não tumorigênica e $IC_{50} = 14,75$ para a linhagem do CMTN, sendo possível observar uma maior seletividade desse composto para a linhagem TN ($IS = 2,40$).

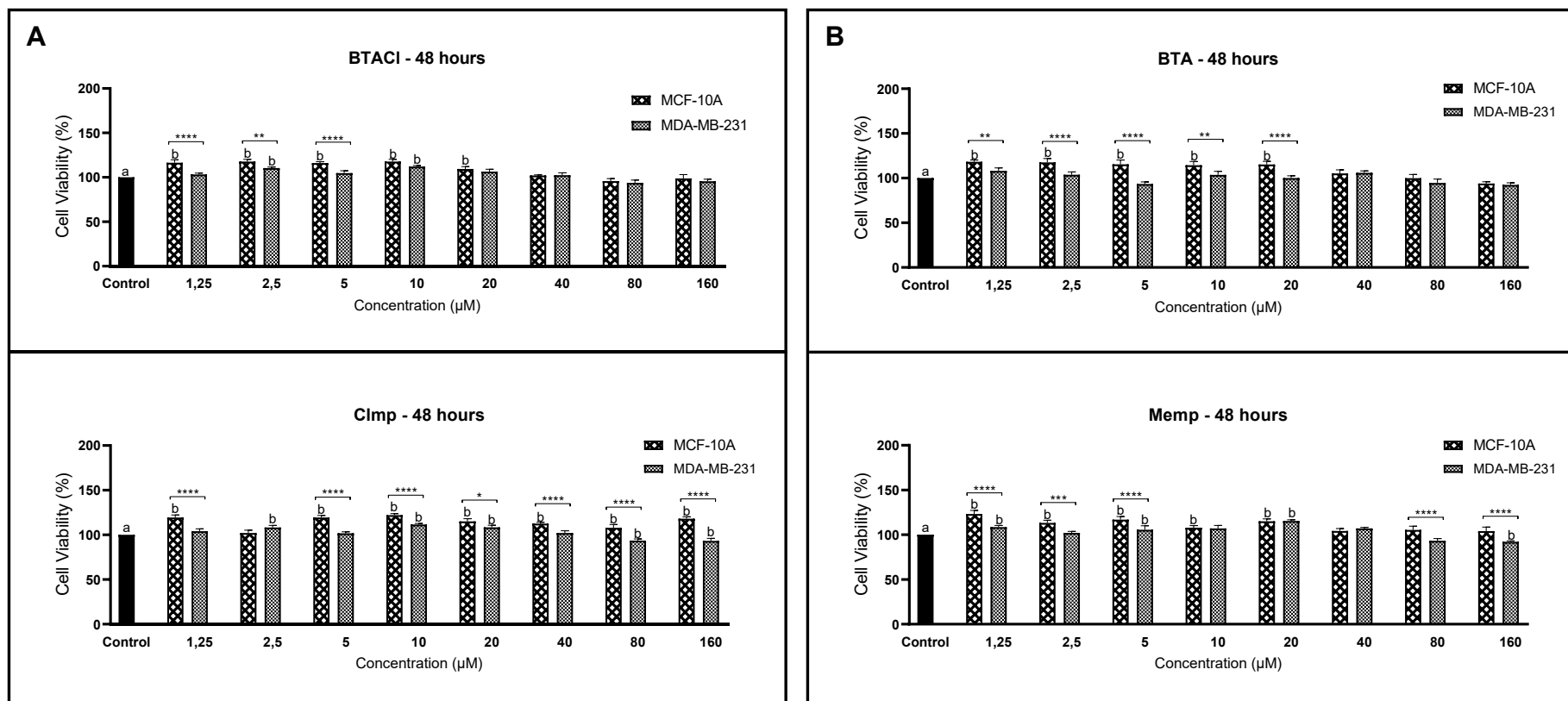
O composto Mi09 apresentou IC_{50} de 124,6 para a MCF-10A e IC_{50} de 39,25 para a MDA-MB-231 após 24 horas, com $IS = 3,17$. Esses valores foram reduzidos pela metade após 48 horas, com IC_{50} de 62,50 e 16,50 para a linhagem não tumoral e a TN, respectivamente, com $IS = 3,78$. Por fim, em 24 horas para complexo Mi10 foi observado IC_{50} para a MCF-10A de 77,28 e para a MDA-MB-231 de 81,40. Após 48 horas, o IC_{50} da triplo-negativa reduziu significativamente ($IC_{50} = 19,00$) quando comparada com a linhagem não tumoral ($IC_{50} = 75,56$), apresentando $IS = 3,97$.

Figura 14. Efeito dos complexos Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10 na viabilidade de células mamárias MCF-10A (não-tumorigênica) e MDA-MB-231 (tumoral triplo-negativa). Os tratamentos ocorreram por 24 e 48 horas com concentração crescente (1,25-160 μ M) dos complexos. (A) Mi02. (B) Mi05. (C) Mi09. (D) Mi10. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio com MTT.



Portanto, foram selecionados como promissores os compostos Mi05 e Mi09, seletivos à linhagem de CMTN e com valores de IC_{50} , nessas células, inferiores a 20 μM após 48 horas. Nesse contexto, a citotoxicidade dos ligantes BTACl, Clmp (Mi05), BTA e Memp (Mi09) sobre as linhagens MCF-10A e MDA-MB-231 também foi avaliada em tratamentos de 48 horas (Figura 15). Nenhum ligante se mostrou ativo, sugerindo que os efeitos observados decorrem dos complexos de cobre produzidos.

Figura 15. Viabilidade celular das linhagens MCF-10A e MDA-MB-231 após tratamento com os ligantes BTACl, Clmp, BTA e Memp. Em (A) tratamento por 48 horas com BTACl e Clmp do complexo Mi05. (B) Tratamento por 48 horas com BTA e Memp do complexo Mi09. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



5 DISCUSSÃO

Mundialmente, o CM é o mais prevalente entre o sexo feminino, afetando 2,1 milhões de mulheres a cada ano, com expressivo número de mortes (GIAQUINTO *et al.*, 2022). No Brasil, os valores também são ascendentes em diagnósticos e óbitos (SILVA *et al.*, 2021). Modificar esses dados epidemiológicos requer novas alternativas de detecção precoce e de novos recursos terapêuticos (ZAGAMI; CAREY, 2022). A descoberta e caracterização de quimioterápicos pode auxiliar nesse cenário, ao fornecer compostos que poderão ser administrados isolados ou combinados ao já utilizados, aliando eficácia e seletividade (BURGUIN; DIORIO; DUROCHER, 2021). Rotineiramente, os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de tumores alvejam células de rápido crescimento, incluindo as saudáveis altamente replicativas, sendo, portanto, debilitantes (CORTES *et al.*, 2022). Além disso, a resistência medicamentosa e, consequentemente, a ineficácia terapêutica, podem comprometer a cura (GIAQUINTO *et al.*, 2022; VAN EIJK *et al.*, 2022). Essa é uma realidade no tratamento do CM, uma vez que células tumorais podem alterar seu metabolismo ou diminuir a captação da droga administrada (DAS *et al.*, 2022). Os compostos metálicos têm se mostrado promissores, sobretudo os de cobre, devido à sua propriedade redox e capacidade de induzir a apoptose (YANG *et al.*, 2018). Portanto, sugere-se a utilização desses complexos como alternativa para o tratamento sistêmico do CM, sobretudo para pacientes não elegíveis a terapia-alvo (NORTHCOTE-SMITH *et al.*, 2021). Nesse contexto, foi avaliado a citotoxicidade de dez compostos de cobre recentemente sintetizados e ainda não testados quanto à sua atividade no CM. De fato, na caracterização de novos alvos terapêuticos, o *screening* inicial é importante na identificação e avaliação do comportamento dos compostos isolados e seus ligantes no tratamento oncológico, para o direcionamento de ensaios futuros (TAN *et al.*, 2021). Para isso, foram cultivadas as linhagens tumorais MCF7, de fenótipo luminal e MDA-MB-231, de fenótipo triplo-negativo, sendo crucial a experimentação e a avaliação em diferentes subtipos moleculares para a validação de novos tratamentos para o câncer.

O método descrito por Mosmann (1983) foi utilizado no presente estudo, o qual avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais presentes nas células metabolicamente viáveis, sendo essas enzimas responsáveis por clivar o anel de tetrazólio, um sal de coloração amarela e solúvel em água, que o transforma em um composto insolúvel de coloração roxa, o formazan [E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan] (GHASEMI *et al.*,

2021). Esta é uma técnica amplamente utilizada para estimar a citotoxicidade de diferentes compostos, inclusive os de cobre. Silva e colaboradores, em 2013, produziram dois novos complexos de cobre (II), 1,10-fenantrolina (Phen) e doxíciclina ou tetraciclina, sintetizados e caracterizados por análise elementar, medições de condutividade e espectroscopias de IV e UV-vis. Esses demonstraram atividade citotóxica contra a linhagem K562 (SILVA *et al.*, 2013). Teles, 2019, avaliou o efeito do complexo de cobre $[Cu(sdmx-)_2(phen)] \cdot H_2O$ em modelos celulares mamários, o qual se mostrou mais eficaz no controle do CMTN, em comparação com a linhagem não tumoral MCF-10A (TELES *et al.*, 2019). Mendo e colaboradores, em 2015, comprovaram o potencial antiproliferativo e seletivo do composto de cobre $[Cu(H_2O)\{OS(CH_3)_2\}L](NO_3)_2$ contendo o ligante 4'-fenil-terpiridina em linhagens celulares tumorais da mama, fígado e cólon (MENDO *et al.*, 2015). Recentemente, Machado e colaboradores em 2021, relataram *in vitro* os efeitos antitumorais de dois complexos de Cu II denominados $[Cu(4-fh)(phen)(ClO_4)_2]$ (complexo 1) e $[Cu(4-nh)(phen)(ClO_4)_2] \cdot H_2O$ (complexo 2), em que 4-fh = hidrazida do ácido 4-fluorofenoxiacético; 4-nh = hidrazida 4-nitrobenzóica e fen = 1,10-fenantrolina. Eles demonstraram que ambos os compostos foram efetivos quanto às suas atividades citotóxicas em células tumorais mamárias, sendo que o complexo 1 apresentou alta seletividade, tornando-o um candidato potencial a drogas antitumorais (MACHADO *et al.*, 2021). Todos os estudos supracitados utilizaram o método de MTT.

Para os complexos aqui apresentados, não foi observado efeito significativo à linhagem luminal, principalmente após 48 horas de tratamento, em que foi possível observar uma retomada da viabilidade pelas células MCF7, sugerindo a ativação de mecanismos de reparo. De fato, mecanismos de resistência, intrínsecos ou adquiridos, comprometem a eficácia de diferentes drogas (HILL *et al.*, 2019). No primeiro caso, os fatores que medeiam a resistência já se encontram presentes (SCHMID *et al.*, 2020). Já no cenário de resistência adquirida é proposto que durante o tratamento possam ocorrer mutações em algumas células tumorais, ativando vias de sinalização compensatórias (WAKS; WINER, 2019; LEE *et al.*, 2019). Sugerimos, portanto, que nas células MCF7, esses mecanismos foram adquiridos, o que comprometeu a eficácia dos complexos nesse subtipo molecular. A quimiorresistência é uma questão crucial no tratamento do CM. Compreender os seus mecanismos é um desafio e tratamentos eficazes adicionais são urgentemente necessários para abordar a resistência aos medicamentos e evitar a ação proliferativa que esses fármacos possam causar nas células tumorais (MANSOORI *et al.*, 2017). Muitas drogas anticancerígenas requerem ativação metabólica e, portanto, podem desenvolver resistência por meio da diminuição de sua

ativação (LAINETTI *et al.*, 2020; SAHA; LUKONG, 2022). Exemplos importantes incluem o sistema citocromo P-450, a superfamília glutationa-S-transferase e a superfamília uridina difosfo-glucuronosiltransferase (NUSSINOV; TSAI; JANG, 2017; CHONG *et al.*, 2022). Além disso, o efeito proliferativo observado neste estudo pode decorrer dos níveis de expressão enzimática modificados. A resistência às drogas também pode ser alcançada por alteração no processo de transdução de sinal que medeia sua ativação (HOUSMAN *et al.*, 2014; TUFAIL; CUI; WU, 2022). No caso do presente estudo, as células luminais MCF7 podem ter adquirido resistência por algum desses mecanismos e ter recuperado a sua viabilidade celular, principalmente após 48 horas de tratamento.

Já para as células representativas de CMTN o efeito foi o oposto, com maior atividade após 48 horas, destacando-se Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10, com valores de IC₅₀ menores no maior tempo de tratamento. Como observado com os resultados apresentados, os efeitos dos complexos diferiram entre os tempos de tratamento, o que demonstra o papel do metabolismo no processo. Os compostos metálicos de cobre possuem uma característica interessante, que é sua alta capacidade de reagir com biomoléculas e gerar metabólitos ativos (LEE *et al.*, 2022). Ganeshpandian e colaboradores, em 2014, avaliaram a citotoxicidade de complexos de cobre (II) [Cu(L)(2,9-dmp)](ClO₄)₂ e cisplatina em células MCF7. Foi relatado que todas as drogas eram citotóxicas e o efeito foi potencializado após a metabolização (GANESHPANDIAN *et al.*, 2014). Os compostos metálicos de cobre conseguem se ligar ao oxigênio molecular e ao peróxido de hidrogênio para gerar EROs e levar ao dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídeos (ALVAREZ *et al.*, 2020). Dessa forma, é possível indicar que o maior tempo de exposição das células aos complexos metálicos, demonstra um dano oxidativo mais grave, conduzindo-as à apoptose (PERIASAMY *et al.*, 2020). Além disso, os valores de IC₅₀ em 24 e 48 horas revelam um efeito citotóxico destes complexos dependente da concentração e do tempo, sendo a linhagem triplo-negativa mais sensível ao tratamento por mecanismos seletivos. Sugere-se que a característica estrutural coordenada destes complexos determine essa seletividade (CANAKCI *et al.*, 2019). Além disso, estudos já relataram que os metabólitos dos agentes tumorais podem modificar a eficácia terapêutica da droga, o que demonstra uma possível hipótese para o efeito dos complexos nas células tumorais (LI *et al.*, 2019; BALSÀ *et al.*, 2021). Portanto, é imprescindível os estudos adicionais para a compreensão destes eventos moleculares e dos mecanismos envolvidos.

Mi05, Mi09 e Mi10 se mostraram seletivos à linhagem de CMTN. O cobre é um oligoelemento importante para o funcionamento de diversas enzimas envolvidas no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA na célula, portanto, mais bem tolerado

em desenhos terapêuticos (LI *et al.*, 2022). Além disso, desempenha um papel central na angiogênese, um processo crítico para o crescimento, invasão e metástase tumoral (LIU *et al.*, 2021). Portanto, a seletividade observada pode decorrer do maior influxo de cobre pelas células tumorais. Nestas, pode atuar sobre as moléculas de DNA, como já demonstrado na literatura científica, induzindo a morte celular (BRISSOS; CAUBET; GAMEZ, 2015; MOLINARO *et al.*, 2020). Contudo, o valor de IC₅₀ de Mi10 foi próximo de 20 µM, sendo Mi05 e Mi09 definidos como promissores.

Os ligantes de Mi05 e Mi09 também foram avaliados e não apresentaram efeito significativo nas células após 48 horas de tratamento, evidenciando a importância do complexo para a citotoxicidade desejada. Polloni e colaboradores, em 2019, relataram a avaliação biológica de um complexo de cobre em células de sarcoma, formados pelos ligantes BTA e fen. O BTA também está presente em nossos compostos e, assim como o estudo de Polloni, não reduziu significativamente a viabilidade das células testadas (POLLONI *et al.*, 2019). Almeida e colaboradores (2015) avaliaram a atividade citotóxica de dois complexos de cobre na linhagem K562, juntamente com seus ligantes. Os resultados demonstraram que a citotoxicidade dos compostos [Cu(BTA)(Phen)NO₃] e [Cu(BTACl)(Phen)NO₃] foi maior do que a dos ligantes livres correspondentes (BTA e BTACl) (ALMEIDA *et al.*, 2015), sendo esses resultados consoantes com os do presente estudo.

Este comportamento pode estar de acordo com a coordenação do metal através de grupos polares dos ligantes que podem aumentar a lipofilicidade e afetar a permeação das células (ALVAREZ *et al.*, 2020). É notável que os complexos contendo o ligante TTA (Mi03, Mi04, Mi06 e Mi08) foram os menos ativos após o tempo de 48 horas. O uso dos ligantes BTA ou BTACl não afeta a atividade, pois ambos estão presentes nos complexos ativos (Mi05 e Mi09). Os grupos substituintes (cloro, metil ou etil) presentes nos ligantes imínicos influenciaram pouco na atividade antitumoral, embora possam ser importantes na interação com o alvo biológico. Assim, estudos adicionais, como docagem molecular podem ser realizados para estabelecer relações entre as estruturas e suas atividades biológicas.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito citotóxico dos compostos de cobre (II) Mi01, Mi02, Mi03 e Mi04, Mi05, Mi06, Mi07, Mi08, Mi09 e Mi10 frente às células tumorais

mamárias MCF7 e MDA-MB-231 no tempo de 24 e 48 horas. Os compostos metálicos não foram ativos à linhagem MCF7. Para as células representativas de CMTN observou-se uma redução na sua viabilidade, especialmente após 48 horas de tratamento. Destacaram-se Mi02, Mi05, Mi09 e Mi10, com valores de IC_{50} inferiores a 50 μ M após 48 horas e reduzidos pela metade quando comparados com os de 24 horas. Os menores valores de IC_{50} foram observados para Mi05 e Mi09, sendo seletivos à linhagem MDA-MB-231, representativa de CMTN.

O estudo se encontra em consonância com os objetivos pautados pelo sistema de saúde, ao propor novas possíveis drogas para o tratamento oncológico, na busca por reverter os dados epidemiológicos alarmantes, sobretudo os associados ao CM. Atende aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 03 e 10 ao desenvolver novas estratégias para o tratamento de uma doença crônica grave que seja acessível a toda a população. A seletividade dos compostos à linhagem TN abre novos caminhos no desenvolvimento de um novo regime terapêutico. Esses achados permitem mais análises e ensaios para explorar os mecanismos intrínsecos do potencial antineoplásico destes dois compostos nas células tumorigênicas de mama humana.

REFERÊNCIAS

ABAZA, A. et al. A Systematic Review of Apoptosis in Correlation With Cancer: Should Apoptosis Be the Ultimate Target for Cancer Treatment? **Cureus**, v. 14, n. 8, p. e28496, 2022. DOI: 10.7759/cureus.28496.

ABOTALEB, M. et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 458–477, 1 maio 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.108.

ABU SAMAAN, T. M. et al. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. E789, 2019. DOI: 10.3390/biom9120789.

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

ALMEIDA, J. DO C. et al. Copper(II) complexes with β -diketones and N-donor heterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron**, v. 89, p. 1–8, 29 mar. 2015. DOI: 10.1016/j.poly.2014.12.026.

AL-THOUBAITY, F. K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 49, p. 44–48, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-41596-9_1.

ALVAREZ, N. et al. New BI and TRI-Thiazole copper (II) complexes in the search of new cytotoxic drugs against breast cancer cells. **Inorganica Chimica Acta**, v. 508, p. 119622, 1 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.ica.2020.119622.

ATHANASIOU, A. et al. Complex cystic breast masses in ultrasound examination. **Diagnostic and Interventional Imaging**, Radio-histological correlations in breast imaging. v. 95, n. 2, p. 169–179, 1 fev. 2014. DOI: 10.1016/j.diii.2013.12.008.

BABAK, M. V.; AHN, D. Modulation of Intracellular Copper Levels as the Mechanism of Action of Anticancer Copper Complexes: Clinical Relevance. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 852, ago. 2021. DOI: 10.3390/biomedicines9080852.

BADVE, S.; GÖKMEN-POLAR, Y. Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019. **Pathology**, v. 51, n. 6, p. 563–569, out. 2019. DOI: 10.1016/j.pathol.2019.07.005.

BALSA, L. M. et al. Anticancer activity of a new copper(II) complex with a hydrazone ligand. Structural and spectroscopic characterization, computational simulations and cell mechanistic studies on 2D and 3D breast cancer cell models. **Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)**, v. 50, n. 28, p. 9812–9826, 21 jul. 2021. DOI: 10.1039/d1dt00869b.

BALSA, L. M. et al. 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. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110975.

BAZIRA, P. J.; ELLIS, H.; MAHADEVAN, V. Anatomy and physiology of the breast. **Surgery (Oxford)**, v. 40, n. 2, p. 79–83, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.015>.

BICK, U. et al. Image-guided breast biopsy and localisation: recommendations for information to women and referring physicians by the European Society of Breast Imaging. **Insights into Imaging**, v. 11, p. 12, 5 fev. 2020. DOI: 10.1186/s13244-019-0803-x.

BIERSACK, B. Alkylating anticancer agents and their relations to microRNAs. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 19 mar. 2019. DOI: 10.20517/cdr.2019.09.

BISWAS, S. K. et al. The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3883, 31 mar. 2022. DOI: 10.3390/ijms23073883.

BLOCKHUYS, S.; WITTUNG-STAFSHEDE, P. Roles of Copper-Binding Proteins in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 871, abr. 2017. DOI: 10.3390/ijms18040871.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

BREWER, H. R. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n. 1, p. 193–200, ago. 2017. DOI: 10.1007/s10549-017-4325-2.

BRIERLEY, J.; GOSPODAROWICZ, M.; O'SULLIVAN, B. The principles of cancer staging. **ecancermedicalsecience**, v. 10, p. ed61, 24 nov. 2016. DOI: 10.3332/ecancer.2016.ed61.

BRISSOS, R. F.; CAUBET, A.; GAMEZ, P. Possible DNA-Interacting Pathways for Metal-Based Compounds Exemplified with Copper Coordination Compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 16, p. 2633–2645, 2015. DOI: 10.1002/ejic.201500175.

BURGUIN, A.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 8, p. 808, ago. 2021. DOI: 10.3390/jpm11080808.

CANAKCI, D. et al. Synthesis and cytotoxic activities of novel copper and silver complexes of 1,3-diaryltriazene-substituted sulfonamides. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 110–116, dez. 2019. DOI: 10.1080/14756366.2018.1530994.

Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

CHONG, K.-H. et al. Breast Cancer with Increased Drug Resistance, Invasion Ability, and Cancer Stem Cell Properties through Metabolism Reprogramming. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12875, jan. 2022. DOI: 10.3390/ijms232112875.

CLAESSENS, A. K. M. et al. The role of chemotherapy in treatment of advanced breast cancer: an overview for clinical practice. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 153, p. 102988, 1 set. 2020. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102988.

COELHO, A. et al. Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, 1 jan. 2018. DOI: 10.21877/2448-3877.201800615.

COLDITZ, G. A.; PETERSON, L. L. Obesity and Cancer: Evidence, Impact, and Future Directions. **Clinical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 154–162, 1 jan. 2018. DOI: 10.1373/clinchem.2017.277376.

CORTES, J. et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 3, p. 217–226, 21 jul. 2022. DOI: 10.1056/NEJMoa2202809.

CORTESI, L.; RUGO, H. S.; JACKISCH, C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. **Targeted Oncology**, v. 16, n. 3, p. 255–282, 2021. DOI: 10.1007/s11523-021-00796-4.

COSTA, M. S. et al. Ruthenium (II) complex cis-[RuII(η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆-hmx₂bato induces ROS-mediated apoptosis in lung tumor cells producing selective cytotoxicity. *Scientific Reports*, v. 10, p. 15410, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-72420-w.

COUGHLIN, S. S. Social determinants of breast cancer risk, stage, and survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 177, n. 3, p. 537–548, 2019. DOI: 10.1007/s10549-019-05340-7.

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

CUTULI, B. Les carcinomes canauxiaux in situ en 2019: diagnostic, traitement, pronostic. **La Presse Médicale**, v. 48, n. 10, p. 1112–1122, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.08.018>.

DA SILVA, D. A. et al. Copper in tumors and the use of copper-based compounds in cancer treatment. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 226, p. 111634, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111634.

Dados e Números sobre Câncer de Mama - Relatório Anual 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-de-mama-relatorio-anual-2022>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015. PMID: 26693050.

DANIELS, B. et al. Use and outcomes of targeted therapies in early and metastatic HER2-positive breast cancer in Australia: protocol detailing observations in a whole of population cohort. *BMJ Open*, v. 7, n. 1, p. e014439, 1 jan. 2017. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-014439.

DAS, T. et al. 12 - An update on paclitaxel treatment in breast cancer. Em: SWAMY, M. K.; PULLAIAH, T.; CHEN, Z.-S. (Eds.). **Paclitaxel**. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 287–308. DOI: 10.1016/B978-0-323-90951-8.00013-8.

DENOYER, D.; CLATWORTHY, S. A. S.; CATER, M. A. Copper Complexes in Cancer Therapy. **Metal Ions in Life Sciences**, v. 18, p. /books/9783110470734/9783110470734-022/9783110470734-022.xml, 5 fev. 2018. DOI: 10.1515/9783110470734-022.

DIABY, V. et al. A review of systematic reviews of the cost-effectiveness of hormone therapy, chemotherapy, and targeted therapy for breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 151, n. 1, p. 27–40, maio 2015. DOI: 10.1007/s10549-015-3383-6.

DRĂGĂNESCU, M.; CARMOCAN, C. Hormone Therapy in Breast Cancer. **Chirurgia (Bucharest, Romania: 1990)**, v. 112, n. 4, p. 413–417, 2017. DOI: 10.21614/chirurgia.112.4.413.

EAST, E. G. et al. Characteristics of a Breast Pathology Consultation Practice. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 4, p. 578–584, 2017. DOI: 10.5858/arpa.2016-0371-OA.

ELIYATKIN, N. et al. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. **The Journal of Breast Health**, v. 11, n. 2, p. 59–66, 2015. DOI: 10.5152/tjbh.2015.1669.

EMENS, L. A. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 24, n. 3, p. 511–520, 2018. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3001.

FAHAD ULLAH, M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1152, p. 51–64, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-20301-6_4.

FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 3–23, 2019. DOI: 10.2174/2211738507666190122111224.

FLOREA, A.-M.; BÜSSELBERG, D. Metals and Breast Cancer: Risk Factors or Healing Agents? **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. 159619, 2011. DOI: 10.1155/2011/159619.

FOUNTZILAS, E. et al. Pathology of BRCA1- and BRCA2-associated Breast Cancers: Known and Less Known Connections. **Clinical Breast Cancer**, v. 20, n. 2, p. 152–159, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.clbc.2019.08.003.

GANESHPANDIAN, M. et al. Mixed ligand copper(II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 202–212, nov. 2014. DOI: 10.1080/14756366.2018.1530994.

GENÇ, A. et al. The effects of exercise on mastalgia. **The Physician and Sportsmedicine**, v. 45, n. 1, p. 17–21, 2 jan. 2017. DOI: 10.1080/00913847.2017.1252702.

GHASEMI, M. et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021. DOI: 10.3390/ijms222312827.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.

GIAMPIETRO, R. R. et al. Accuracy and Effectiveness of Mammography versus Mammography and Tomosynthesis for Population-Based Breast Cancer Screening: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7991, 14 maio 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-64802-x.

GIAQUINTO, A. N. et al. Breast Cancer Statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 6, p. 524–541, nov. 2022. DOI: 10.3322/caac.21754.

GILL, M. R.; VALLIS, K. A. Transition metal compounds as cancer radiosensitizers. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 540–557, 2019. DOI: 10.1039/C8CS00641E.

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

GOH, C. W. et al. Invasive ductal carcinoma with coexisting ductal carcinoma in situ (IDC/DCIS) versus pure invasive ductal carcinoma (IDC): a comparison of clinicopathological characteristics, molecular subtypes, and clinical outcomes. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 7, p. 1877–1886, 2019. DOI: 10.1007/s00432-019-02930-2.

GONÇALVES, A.; BERTUCCI, A.; BERTUCCI, F. PARP Inhibitors in the Treatment of Early Breast Cancer: The Step Beyond? **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1378, 27 maio 2020. DOI: 10.3390/cancers12061378.

GUO, R. et al. Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection and Management: A Review. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 44, n. 1, p. 37–70, 2018. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.09.012.

GUPTA, A.; ZHANG, H.; HUANG, J. The Recent Research and Care of Benign Breast Fibroadenoma: Review Article. **Yangtze Medicine**, v. 3, n. 2, p. 135–141, 22 mar. 2019. DOI: 10.4236/ym.2019.32013.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HANNA, K.; MAYDEN, K. Chemotherapy Treatment Considerations in Metastatic Breast Cancer. **Journal of the Advanced Practitioner in Oncology**, v. 12, n. Suppl 2, p. 6–12, mar. 2021. DOI: 10.6004/jadpro.2021.12.2.11.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy (New York, N.Y.)**, v. 26, n. 1, p. 29–48, jan. 2013. DOI: 10.1002/ca.22165.

HAUSSMANN, J. et al. Recent advances in radiotherapy of breast cancer. **Radiation Oncology**, v. 15, n. 1, p. 71, 30 mar. 2020. DOI: 10.1186/s13014-020-01501-x.

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

HEIMES, A.-S.; SCHMIDT, M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 28, n. 1, p. 1–5, jan. 2019. DOI: 10.1080/13543784.2019.1552255.

HENRIQUES, B.; MENDES, F.; MARTINS, D. Immunotherapy in Breast Cancer: When, How, and What Challenges? **Biomedicines**, v. 9, n. 11, p. 1687, 14 nov. 2021. DOI: 10.3390/biomedicines9111687.

HILL, D. P. et al. Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: multiple mechanisms of resistance. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1039, 4 nov. 2019. DOI: 10.1186/s12885-019-6278-9.

HORTOBAGYI, G. N.; EDGE, S. B.; GIULIANO, A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 38, p. 457–467, 23 maio 2018. DOI: 10.1200/EDBK_201313.

HOUSMAN, G. et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, set. 2014. DOI: 10.3390/cancers6031769.

HOUSSAMI, N.; TURNER, R. M.; MORROW, M. Meta-analysis of pre-operative magnetic resonance imaging (MRI) and surgical treatment for breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n. 2, p. 273–283, 2017. DOI: 10.1007/s10549-017-4324-3.

HUSSAIN, A. et al. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5237, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-41063-x.

IGNATIADIS, M.; SOTIRIOU, C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 10, n. 9, p. 494–506, set. 2013. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.124.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. Em: AL-MAJED, A. A. (Ed.). Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. [s.l.] Academic Press, 2021. v. 46p. 273–307.

Invasive Breast Cancer (IDC/ILC). Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

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

JL, F. et al. Risk of breast cancer-related death in women with a prior cancer. **Aging**, v. 12, n. 7, p. 5894–5906, 2020. DOI: 10.18632/aging.102984.

KALLI, S. et al. American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: What the Radiologist Needs to Know. **RadioGraphics**, v. 38, n. 7, p. 1921–1933, nov. 2018. DOI: 10.1148/rg.2018180056.

KHAN, R. A. et al. β -Carboline copper complex as a potential mitochondrial-targeted anticancer chemotherapeutic agent: Favorable attenuation of human breast cancer MCF7 cells via apoptosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 27, n. 8, p. 2164–2173, 1 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.05.001.

KOH, J.; KIM, M. J. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean Journal of Radiology*, v. 20, n. 1, p. 69–82, jan. 2019. DOI: 10.3348/kjr.2018.0231.

KOO, M. M. et al. Presenting symptoms of cancer and stage at diagnosis: evidence from a cross-sectional, population-based study. *The Lancet. Oncology*, v. 21, n. 1, p. 73–79, jan. 2020. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30595-9.

LAIBLE, M. et al. Impact of molecular subtypes on the prediction of distant recurrence in estrogen receptor (ER) positive, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) negative breast cancer upon five years of endocrine therapy. *BMC cancer*, v. 19, n. 1, p. 694, 15 jul. 2019. DOI: 10.1186/s12885-019-5890-z.

LAINETTI, P. DE F. et al. Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Breast Cancer and Possible Targets in Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 12, p. 1193, 9 dez. 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121193.

LARSEN, M. J. et al. RNA profiling reveals familial aggregation of molecular subtypes in non-BRCA1/2 breast cancer families. *BMC Medical Genomics*, v. 7, p. 9, 2014. DOI: 10.1186/1755-8794-7-9.

LATIF, F. et al. Atezolizumab and pembrolizumab in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 22, n. 2, p. 229–235, fev. 2022. DOI: 10.1080/14737140.2022.2023011.

LEE, J. O. et al. Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast Cancer Research*, v. 21, n. 1, p. 115, 22 out. 2019. DOI: 10.1186/s13058-019-1204-2.

LEE, Z. Y. et al. Induction of Apoptosis and Autophagy by Ternary Copper Complex Towards Breast Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 6, p. 1159–1170, 2022. DOI: 10.2174/1871520621666210726132543.

LELIÈVRE, P. et al. The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy. *Cancers*, v. 12, n. 12, p. 3594, 1 dez. 2020. DOI: 10.3390/cancers12123594.

LI, C. et al. Copper depletion combined with photothermal therapy suppresses breast cancer. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 6, n. 18, p. 2735–2740, 12 set. 2022. DOI: 10.1039/D2QM00445C.

LI, D.-D. et al. 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, 12 set. 2019. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.9b00284.

LI, Z. et al. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65024–65033, 17 ago. 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.11344.

LIU, Y. L. et al. Tetrathiomolybdate (TM)-associated copper depletion influences collagen remodeling and immune response in the pre-metastatic niche of breast cancer. **npj Breast Cancer**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 23 ago. 2021. DOI: 10.1038/s41523-021-00313-w.

LØBERG, M. et al. Benefits and harms of mammography screening. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 63, 1 maio 2015. DOI: 10.1186/s13058-015-0525-z.

LOGAN, G. J. et al. Molecular drivers of lobular carcinoma in situ. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 76, 4 jun. 2015. DOI: 10.1186/s13058-015-0580-5.

MACHADO, P. H. A. et al. 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. 24450, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-03909-1.

MALHERBE, K.; KHAN, M.; FATIMA, S. Fibrocystic Breast Disease. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. PMID: 31869073.

MANOUCHEHRI, E. et al. Understanding breast cancer risk factors: is there any mismatch between laywomen perceptions and expert opinions. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 309, 23 mar. 2022. DOI: 10.1186/s12885-022-09372-z.

MANSOORI, B. et al. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339–348, set. 2017. DOI: 10.15171/apb.2017.041.

MAO, D. et al. Treatment interruption and discontinuation of hormonal therapy in hormone receptor-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 184, n. 3, p. 665–674, dez. 2020. DOI: 10.1007/s10549-020-05892-z.

MARTÍNEZ-SÁEZ, O.; PRAT, A. Current and Future Management of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. **JCO Oncology Practice**, v. 17, n. 10, p. 594–604, out. 2021. DOI: 10.1200/OP.21.00172.

MASOOD, S. Minimizing Errors in Breast Pathology: A Call for Action. **The Breast Journal**, v. 21, n. 4, p. 333–336, 2015. DOI: 10.1111/tbj.12440.

MASOUD, V.; PAGÈS, G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 2, p. 120–134, 10 abr. 2017. DOI: 10.5306/wjco.v8.i2.120.

MASURI, S. et al. Copper(II) Phenanthroline-Based Complexes as Potential AntiCancer Drugs: A Walkthrough on the Mechanisms of Action. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 49, jan. 2022. DOI: 10.3390/molecules27010049.

MCCARTHY, A. M. et al. Relationship of established risk factors with breast cancer subtypes. **Cancer Medicine**, v. 10, n. 18, p. 6456–6467, 2021. DOI: 10.1002/cam4.4158.

MEISEL, J. et al. Evolution of Targeted Therapy in Breast Cancer: Where Precision Medicine Began. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 38, p. 78–86, 23 maio 2018. DOI: 10.1200/EDBK_201037.

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

MERINO BONILLA, J. A.; TORRES TABANERA, M.; ROS MENDOZA, L. H. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. **Radiologia**, v. 59, n. 5, p. 368–379, 2017. DOI: 10.1016/j.rx.2017.06.003.

MOHAMMED, A. A. Evaluation of mastalgia in patients presented to the breast clinic in Duhok city, Iraq: Cross sectional study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 52, p. 31–35, 1 abr. 2020. DOI: 10.1016/j.amsu.2020.02.012.

MOLINARO, C. et al. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2863, 5 out. 2020. DOI: 10.3390/cancers12102863.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. <p>Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world</p>. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 151–164, 10 abr. 2019. DOI: 10.2147/BCTT.S176070.

MOO, T.-A. et al. Overview of Breast Cancer Therapy. **PET clinics**, v. 13, n. 3, p. 339–354, 2018. DOI: 10.1016/j.cpet.2018.02.006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MUSCHLER, J.; STREULI, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. a003202, 2010. DOI: 10.1101/cshperspect.a003202.

MUTEBI, M. et al. Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. **Cancer**, v. 126, n. S10, p. 2365–2378, 2020. DOI: 10.1002/cncr.32910.

NAGINI, S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 152–163, 2017. DOI: 10.2174/1871520616666160502122724.

NICOLAZZI, M. A. et al. Anthracycline and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 7, p. 2175–2185, 2018. DOI: 10.26355/eurev_201804_14752.

NORTHCOTE-SMITH, J. et al. Breast Cancer Stem Cell Active Copper(II) Complexes with Naphthol Schiff Base and Polypyridyl Ligands. **Inorganics**, v. 9, n. 1, p. 5, jan. 2021. DOI: 10.3390/inorganics9010005.

NUSSINOV, R.; TSAI, C.-J.; JANG, H. A New View of Pathway-Driven Drug Resistance in Tumor Proliferation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 5, p. 427–437, maio 2017. DOI: 10.1016/j.tips.2017.02.001.

OFFERSEN, B. V.; OVERGAARD, J. Breast cancer radiation therapy. **The Lancet**, v. 396, n. 10262, p. 1558, 14 nov. 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32322-9.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast development and anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 54, n. 1, p. 91–95, mar. 2011. DOI: 10.1097/GRF.0b013e318207ffe9.

PAUL, D. The systemic hallmarks of cancer. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 6, p. 29, 28 ago. 2020. DOI: 10.20517/2394-4722.2020.63.

PERIASAMY, V. S. et al. Induction of Redox-Mediated Cell Death in ER-Positive and ER-Negative Breast Cancer Cells by a Copper(II)-Phenolate Complex: An In Vitro and In Silico Study. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4504, jan. 2020. DOI: 10.3390/molecules25194504.

PERNAS, S.; TOLANEY, S. M. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 11, p. 1758835919833519, 19 mar. 2019. DOI: 10.1177/1758835919833519.

PEVZNER, M.; DAHAN, A. Mastitis While Breastfeeding: Prevention, the Importance of Proper Treatment, and Potential Complications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 2328, 22 jul. 2020. DOI: 10.3390/jcm9082328.

PICON-RUIZ, M. et al. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 5, p. 378–397, 2017. DOI: 10.3322/caac.21405.

POLLONI, L. et al. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine &**

Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie, v. 112, p. 108586, abr. 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.047.

POMPEI, L. DE M.; FERNANDES, C. E. Hormone Therapy, Breast Cancer Risk and the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Article. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 42, p. 233–234, 22 jun. 2020. DOI: 10.1055/s-0040-1712941.

QUILES, J. L. et al. Reductive Stress, Bioactive Compounds, Redox-Active Metals, and Dormant Tumor Cell Biology to Develop Redox-Based Tools for the Treatment of Cancer. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 33, n. 12, p. 860–881, 20 out. 2020. DOI: 10.1089/ars.2020.8051.

RAMCHANDANI, D. et al. Copper depletion modulates mitochondrial oxidative phosphorylation to impair triple negative breast cancer metastasis. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 7311, 15 dez. 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-27559-z.

RAMOS-INZA, S.; PLANO, D.; SANMARTÍN, C. Metal-based compounds containing selenium: An appealing approach towards novel therapeutic drugs with anticancer and antimicrobial effects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 244, p. 114834, 15 dez. 2022. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114834.

REDDY, S. M.; CARROLL, E.; NANDA, R. Atezolizumab for the treatment of breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 20, n. 3, p. 151–158, mar. 2020. DOI: 10.1080/14737140.2020.1732211.

RUIZ, M. C. et al. Antiproliferative activity of two copper (II) complexes on colorectal cancer cell models: Impact on ROS production, apoptosis induction and NF- κ B inhibition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 169, p. 106092, 1 fev. 2022. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106092.

SAHA, T.; LUKONG, K. E. Breast Cancer Stem-Like Cells in Drug Resistance: A Review of Mechanisms and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 856974, 21 mar. 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.856974.

SANDHAUS, S. et al. 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, fev. 2016. DOI: 10.1016/j.inoche.2015.12.013.

SCHMID, P. et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 9, p. 810–821, 27 fev. 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa1910549.

SHARMNI VISHNU, K. et al. Combined atezolizumab and nab-paclitaxel in the treatment of triple negative breast cancer: a meta-analysis on their efficacy and safety. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1139, 5 nov. 2022. DOI: 10.1186/s12885-022-10225-y.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022. DOI: 10.3322/caac.21708.

SILVA, J. D. D. E. et al. Breast Cancer Mortality in Young Women in Brazil. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 569933, 25 jan. 2021. DOI: 10.3389/fonc.2020.569933.

SILVA, PRISCILA et al. **Síntese, caracterização físico-química e estudo da atividade antitumoral de complexos ternários de Cu(II) com um antibiótico e uma α,α -diamina e de Ru(II) com α,α -diaminas.** 2013. Belo Horizonte: Universidade Federal De Minas Gerais, 2013.

SMITH, M. T. et al. The Key Characteristics of Carcinogens: Relationship to the Hallmarks of Cancer, Relevant Biomarkers, and Assays to Measure Them. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1887–1903, out. 2020. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-19-1346.

SOLANKI, M.; VISSCHER, D. Pathology of breast cancer in the last half century. **Human Pathology**, v. 95, p. 137–148, 2020. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.09.007.

SOOD, A. et al. Relevance of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1319–1336, 2021. DOI: 10.2174/1568026621666210701143445. PMID: 29230126.

STONE, T. W.; MCPHERSON, M.; GAIL DARLINGTON, L. Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. **EBioMedicine**, v. 30, p. 14–28, 27 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.02.022.

SUN, Y.-S. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017. DOI: 10.7150/ijbs.21635.

TAN, C.-P. et al. Phosphorescent metal complexes as theranostic anticancer agents: combining imaging and therapy in a single molecule. **Chemical Science**, v. 12, n. 7, p. 2357–2367, 25 fev. 2021. DOI: 10.1039/D0SC06885C.

TELES, RAMON et al. **Efeitos de complexos metálicos de cobre no câncer de mama triplo negativo.** 2019. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2019.

TELLONI, S. M. Tumor Staging and Grading: A Primer. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1606, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-6990-6_1.

TOI, M. et al. Adjuvant S-1 plus endocrine therapy for oestrogen receptor-positive, HER2-negative, primary breast cancer: a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. **The Lancet. Oncology**, v. 22, n. 1, p. 74–84, 2021. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30534-9.

TREMONT, A.; LU, J.; COLE, J. T. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. **The Ochsner Journal**, v. 17, n. 4, p. 405–411, 2017. PMID: 29230126.

TUFAIL, M.; CUI, J.; WU, C. Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches. **American Journal of Cancer Research**, v. 12, n. 7, p. 2920–2949, 15 jul. 2022. PMID: 35968356.

TULUCE, Y. et al. Antiproliferative and Apoptotic Role of Novel Synthesized Cu(II) Complex with 3-(3-(4-fluorophenyl)Triaz-1-en-1-yl) Benzenesulfonamide in Common Cancer Models. **Anticancer Research**, v. 38, n. 9, p. 5115–5120, 2018. DOI: 10.21873/anticancer.12832.

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

VALENTE, A. et al. Metal- and metalloid-based compounds to target and reverse cancer multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 58, p. 100778, 2021. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100778.

VAN EIJK, M. et al. The influence of docetaxel schedule on treatment tolerability and efficacy in patients with metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 104, 25 jan. 2022. DOI: 10.1186/s12885-022-09196-x.

VAN LEEUWEN, F. E.; RONCKERS, C. M. Anthracyclines and Alkylating Agents: New Risk Factors for Breast Cancer in Childhood Cancer Survivors? **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 9, p. 891–894, 20 mar. 2016. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.0465.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 22 jan. 2019. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.

WANG, H. et al. Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel. **Theranostics**, v. 11, n. 5, p. 2442–2459, 1 jan. 2021. DOI: 10.7150/thno.46460.

WANGCHINDA, P.; ITHIMAKIN, S. Factors that predict recurrence later than 5 years after initial treatment in operable breast cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 223, 24 ago. 2016. DOI: 10.1186/s12957-016-0988-0.

WEN, H. Y.; BROGI, E. Lobular Carcinoma In Situ. **Surgical Pathology Clinics**, v. 11, n. 1, p. 123–145, 2018. DOI: 10.1016/j.path.2017.09.009.

WILSON, E.; WOODD, S. L.; BENOVA, L. Incidence of and Risk Factors for Lactational Mastitis: A Systematic Review. **Journal of Human Lactation**, v. 36, n. 4, p. 673–686, 1 nov. 2020. DOI: 10.1177/08903344209078.

WYNN, C. S.; TANG, S.-C. Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 41, n. 1, p. 193–209, 2022. DOI: 10.1007/s10555-022-10021-x.

XIA, Y. et al. A new Schiff base coordinated copper(II) compound induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 81, 3 abr. 2019. DOI: 10.1186/s12935-019-0801-6.

YANG, Q.-Y. et al. Syntheses, Crystal Structures, and Antitumor Activities of Copper(II) and Nickel(II) Complexes with 2-((2-(Pyridin-2-yl)hydrazono)methyl)quinolin-8-ol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1874, 26 jun. 2018. DOI: 10.3390/ijms19071874.

YUAN, S.; NORGARD, R. J.; STANGER, B. Z. Cellular Plasticity in Cancer. **Cancer discovery**, v. 9, n. 7, p. 837–851, jul. 2019. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0015.

ZAGAMI, P.; CAREY, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **npj Breast Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 20 ago. 2022. DOI: 10.1038/s41523-022-00468-0.

ZHANG, Z. et al. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 1, p. 3–11, 1 jan. 2017. DOI: 10.3892/mmr.2016.6022.