



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**NOVOS MECANISMOS MEDIADOS POR COMPLEXOS METÁLICOS
DE COBRE EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

Aluna: Helen Soares Valença Ferreira

Orientadora: Professora Dr.^a Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientador: Dr. Raoni Pais Siqueira

UBERLÂNDIA - MG

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**NOVOS MECANISMOS MEDIADOS POR COMPLEXOS METÁLICOS
DE COBRE EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

Aluna: Helen Soares Valença Ferreira

Orientadora: Professora Dr.^a Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientador: Dr. Raoni Pais Siqueira

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2023

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

F383 Ferreira, Helen Soares Valença, 1993-
2023 NOVOS MECANISMOS MEDIADOS POR COMPLEXOS METÁLICOS DE
COBRE EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS [recurso eletrônico]
/ Helen Soares Valença Ferreira. - 2023.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.
Coorientadora: Raoni Pais Siqueira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.198>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-,
(Orient.). II. Siqueira, Raoni Pais, 1988-, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta de março de dois mil e vinte e três.	Hora de início:	15:20h	Hora de encerramento:	15:40h
Matrícula do Discente:	12022GBI006				
Nome do Discente:	Helen Soares Valença Ferreira				
Título do Trabalho:	Novos mecanismos mediados por complexos metálicos de cobre em células tumorais mamárias.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Prospecção de produtos bioativos para o tratamento dos cânceres de próstata e mama.				

Aos trinta dias do mês de março de dois mil e vinte e três, às 15:20 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Thaise Gonçalves de Araújo (Orientadora), Cristina Ribas Fürstenau e Samuel Cota Teixeira. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Thaise Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 10:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Cota Teixeira, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Ribas Fürstenau, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4336646** e o código CRC **68C849D6**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**NOVOS MECANISMOS MEDIADOS POR COMPLEXOS METÁLICOS
DE COBRE EM CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS.**

ALUNO: Helen Soares Valença Ferreira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Thaise Gonçalves de Araújo (Orientador)

Examinadores:

Professora Dr^a Cristina Ribas Fürstenau (Universidade Federal do ABC)

Professor Dr. Samuel Cota Teixeira (Universidade Federal de Uberlândia)

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Thaise Gonçalves de Araújo

*“Só me sinto digna de minhas asas, se
eu as utilizar para fazer outros voarem!”*

O vendedor de sonhos -Augusto Cury

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos os pacientes acometidos por câncer, para que eles saibam que não estão lutando sozinhos e que assim como os amigos e familiares e os profissionais das mais diversas áreas, nós pesquisadores também estamos lutando com vocês! O diagnóstico do câncer traz consigo o medo, a angústia e muitas vezes, devido à dor física e emocional produzida ao longo do processo, a vontade de desistir, todavia é a luta de vocês que inspira a nossa e saber que não estamos sozinhos ao longo da trincheira, nos permite tirar forças de lugares que desconhecemos para prosseguir na batalha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Cristo pelo seu exemplo de amor com a humanidade, por não ter desistido de nós e por ter nos incentivado, de maneiras inacreditáveis, a amar e a cuidar do próximo.

Agradeço a todos os meus professores, àqueles que ainda estão e àqueles que já passaram. Sem vocês eu não teria aprendido a ler, a escrever, a interpretar e a passar por todas as etapas que hoje culminam na conclusão desse trabalho. Obrigado por tudo e nos perdoem por muitas vezes não os termos valorizados! Obrigado por não desistirem de nós! Obrigada por continuarem acreditando no poder transformador da educação! A educação transforma e ela me transformou e se mantém continuamente me transformando em um ser humano melhor e em uma profissional mais capacitada e responsável! Obrigada a todos vocês, os fomentadores dessa transformação!

Agradeço à minha orientadora, professora Dr^a Thaise Gonçalves de Araújo por toda orientação e dedicação! Sem você Thaise, não teríamos um laboratório tão bem equipado para a realização dos nossos experimentos e eu sei o quanto você lutou e continua lutando para que não só o meu trabalho, mas o de todos os seus orientandos, co-orientados e parceiros de pesquisas, possa seguir em frente. Obrigada por tudo, pelos conselhos, tanto na esfera acadêmica quanto na vida pessoal, pelas broncas, nem sempre fáceis de se ouvir, mas necessárias ao nosso crescimento enquanto profissional e por ser essa pessoa persistente em tudo aquilo que acredita e, por isso, obrigada por acreditar em mim! Quando eu “crescer” quero ser uma profissional como você!

Agradeço ao meu co-orientador, Dr. Raoni Pais Siqueira pelo companheirismo e por todo aprendizado! Obrigado Raoni por ter me socorrido em momentos de desespero, por sanar dúvidas que pareciam não ter respostas e por ser um dos pesquisadores mais otimistas que eu já conheci, você é show!

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia (GBIO), pela parceria e pelos momentos vividos, alguns de lágrimas e desespero, quando os experimentos não davam certo e outros de risadas e resenhas, ao debocharmos das nossas próprias adversidades. Vocês são demais!

Agradeço à minha *partnerlab*, a mestre Fernanda Cardoso, por toda ajuda durante os experimentos! Espero humildemente também ter contribuído com o seu trabalho, pois sua ajuda foi essencial à conclusão do meu. Obrigada Fer! E precisando, estou aqui para te ajudar!

Agradeço à banca examinadora pela contribuição no aprimoramento do presente trabalho!

Agradeço ao meu amor, Pablo Neander por todo apoio e carinho ao longo de todos esses anos, especialmente nesses últimos dois anos e meio. Foi muito difícil chegar até aqui e sem você “bebê” eu não teria conseguido! Obrigada por estar sempre ao meu lado, tanto nos dias ensolarados, quanto nos dias chuvosos! Amo você e espero que possamos juntos superar todos os obstáculos dessa vida, bem como apreciar todos os bons momentos que ela tem a nos oferecer!

Agradeço ao meu sogro e à minha sogra por todo carinho e apoio! Peço a Deus que abençoe continuamente a vida de vocês!

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia por ter me dado a oportunidade de ser uma profissional melhor, mais qualificada e mais humana!

E por último, agradeço ao CNPq por financiar não só o meu trabalho, mas o de tantos outros pesquisadores e por permitir que o desenvolvimento da ciência, ainda que com tantas dificuldades, se perpetue e possa transformar a vida de milhões de pessoas.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
Capítulo I	5
1. ANATOMIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	6
2. CÂNCER DE MAMA.....	8
2.1 HALLMARKS	8
2.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA	12
2.3 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E MOLECULARES.....	16
2.3.1 Luminais A e B.....	19
2.3.2 HER2E.....	20
2.3.3 <i>Basal-like</i>	20
2.3.4 <i>Claudin-low</i>	21
2.4 A COMPLEXIDADE DE TUMORES DE MAMA TRIPLO- NEGATIVOS.....	21
2.4.1 Prognóstico do CMTN	23
2.4.2 Tratamento do CMTN	24
3. COMPLEXOS DE COBRE NO TRATAMENTO DO CM.....	27
4. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	35
4.1 SINALIZADORES PURINÉRGICOS	38
4.2 RECEPTORES PURINÉRGICOS	39
4.3 ECTONUCLEOTIDASES	41
4.4 IMPLICAÇÕES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO CM	44
REFERÊNCIAS	47
.....	76
Capítulo II	76
RESUMO	77
1. Introduction.....	80

2. Results and Discussion.....	82
3. Concluding remarks	96
4. Materials and Methods	96
References	102
Supplementary figure.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes estruturais e funcionais do tecido mamário.	6
Figura 2. Composição celular do alvéolo mamário.	7
Figura 3. Mecanismos regulatórios da absorção, distribuição e excreção do cobre.	29
Figura 4. Composição do sistema purinérgico.	37
 Figure 1. Effect of Complex 2 on MDA-MB-231 cell migration and clonogenicity in vitro.	Erro! Indicador não definido.
Figure 2. Hydrolysis of ATP, ADP and AMP on the surface of the MDA-MB-231 cell line.	92
Figure 3. Relative mRNA levels target genes.	95
Figure 4. Structure of copper complexes.	97

LISTA DE TABELAS

Table 1. Half-maximal inhibitory concentration or IC ₅₀ values (μ M) of Complexes 1-3 over breast cancer cell lines. Half-maximal inhibitory concentration or IC ₅₀ values (μ M) of Complexes 1-3 over breast cancer cell lines.	81
Table 2. Selectivity index (SI) of Complexes 1-3 Selectivity index (SI) of Complexes 1-3	Erro! Indicador não definido. 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADO	Adenosina
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AKT	Protein kinase B
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
AMPc	AMP cíclico
APs	Alkaline phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATOX1	Antioxidant 1 Copper Chaperone
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATP7A	ATPase A
Atp7B	ATPase B
BAK	Bcl-2 antagonist killer
BAX	Bcl-2 Associated X-protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-2-L2	Bcl-2-like protein 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BRAC1	Breast Cancer Type 1
BRAC2	Breast Cancer Type 2
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CAL 51	Centre Antoine Lacassagne-51

CD31	Cluster of differentiation 31
CD54	Cluster of differentiation
CD73	Cluster of Differentiation 73
CDH1	Cadherin 1
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
CHK2	Checkpoint kinase 2
CKs	Citoqueratinas
CM	Câncer de mama
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
c-MYC	Cellular Myelocytomatosis
CO2	Dióxido de carbono
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
CTR1	High affinity copper uptake protein 1
Cu ⁺	Íon Cobre I
Cu ²⁺	Íon Cobre II
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DAG	Diacylglicerol
DECH	Decanohydrazide
DMEM F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DODH	Dodecanohydrazide
DOX	Doxorubicin

DTX	Docetaxel
E2F1	Transcription factor E2 Type 1
E2F3	Transcription factor E2 Type 2
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ENTPD1	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1
ENTPD2	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2
ENTPD3	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-3
ENTPD5	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-5
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase 1
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Fetal bovine sérum
G1	Gap 1
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSH	Glutathione
h	Horas
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
HER2E	HER2-enriquecido
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
IC50	Half-maximal inhibitory concentration
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1	Interleucina 1

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
Ki-67	Marcador de proliferação Ki-67
L-15	Leibovitz's medium
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LOX	Lisil Oxidase
MACs	Canais maxi-ânion
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCF10A	Michigan Cancer Foundation-10 Attached
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7
MCL-1	Myeloid cell leukemia-1
MDA-MB-157	MD Anderson-Metastatic Breast 157
MDA-MB-231	MD Anderson-Metastatic Breast 231
MDA-MB-453	MD Anderson-Metastatic Breast 453
MEC	Matriz extracelular
MEMO1	Mediator Of Cell Motility 1
Mg ²⁺	Íon magnésio
mM	millimolar
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9

MRI	Magnetic resonance imaging
Na ⁺	Íon sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCN	The National Comprehensive Cancer Network
NF-Kb	Nuclear factor kappa b
NT5E	ecto-5'-nucleotidase
OCTH	Octanohydrazide
OH	Hidroxila
P1	Purinoreceptores do tipo 1
P2	Purinoreceptores do tipo 2
P2X	Purinoreceptor P2X
P2Y	Purinorecepter P2Y
p53	phosphoprotein 53
PANX1	Panexina 1
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
pCR	Complete pathologic response
PD-1	Programmed death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PET	Positron emission tomography
pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	Phenantroline
Pi	Fosfato inorgânico
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases

PLC	Phospholypase C
PPi	Pirofosfato inorgânico
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
qPCR	Real Time Quantitative PCR
QT	Quimioterapia
RAD51	DNA repair protein RAD51 homolog 1
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat Sarcoma vírus
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
SI	Selectivity index
SOD1	Superóxido dismutase 1
SPECT	Single photon emission computed tomography
TC	Computed tomography
TCA	Trichloroacetic acid
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TM	Tetramolibdato
TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNF- α	Tumour Necrosis Factor alpha
TNs	Triplo-negativos
TP53	Tumor protein 53
TRAILR	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor

UDP	Uridina-5'-difosfato
ULK1	Unc-51-like kinase 1
ULK2	Unc-51-like kinase 2
UTP	Uridina-5'-trifosfato
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor receptor-1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor-3
VRACs	Canais iônicos regulados por volume
WCRF	World Cancer Research Fund
Zn ²⁺	Íon zinco
β ₂ M	β-2-microglobulin
μM	Micromolar
^{99m} Tc	Technetium-99m

RESUMO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna que mais acomete as mulheres em todo o mundo. É uma doença cuja etiologia é de natureza multifatorial, com variadas manifestações clínicas e morfológicas, assinaturas moleculares distintas e perfis de respostas à terapia diferenciados. Atualmente, o CM é a principal causa de morte associada ao câncer e estima-se que entre os anos de 2020 a 2040, cerca de 3 milhões de novos diagnósticos. Diante de sua complexidade molecular, os tumores mamários são classificados em diferentes subtipos. Dentre estes, o CM triplo negativo (CMTN) corresponde a cerca de 15% dos casos, com pior prognóstico e menores sobrevida livre e global. O manejo clínico do CMTN é restrito. São tumores que não expressam receptores de estrógeno, progesterona e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico. Assim, são tratados majoritariamente, de forma sistêmica, por quimioterapia. De fato, os benefícios da quimioterapia para o CMTN têm sido relatados. Dados de diferentes estudos têm demonstrado sua eficácia nos cenários neoadjuvante, adjuvante e metastático. Todavia, os efeitos colaterais causados pelas drogas, devido à sua inespecificidade pelas células tumorais e citotoxicidade em células normais, somados a elevada agressividade e ao elevado potencial de disseminação e recidiva dos tumores mamários TN exigem novas abordagens. A inclusão dos complexos metálicos no tratamento do câncer teve início com a descoberta das propriedades antineoplásicas da cisplatina. Não obstante, devido a efeitos colaterais graves, como hepatotoxicidade, e eficácia terapêutica limitada, a síntese de novos complexos metálicos com propriedades antitumorais fez-se necessária. Nesse contexto, a síntese de complexos à base de cobre tem se destacado. O cobre é um micronutriente essencial ao organismo atuando como cofator catalítico e componente estrutural de diferentes enzimas. Sua estrutura eletrônica singular e sua natureza endógena, o tornam um metal promissor à síntese química de medicamentos à base de metais potencialmente menos tóxicos e mais seletivos. Os benefícios da administração de complexos de cobre no tratamento do CM têm sido descritos, contudo o mecanismo antiproliferativo associado a esses compostos, restringe-se, em sua maioria, à apoptose e geração de espécies reativas de oxigênio. Interessantemente, o cenário descrito impulsiona o desenvolvimento

de novos complexos à base de cobre com potencial antitumoral no tratamento do CMNT, bem como a investigação de vias de sinalização inéditas que possam ser moduladas por esses compostos. No presente estudo avaliamos o potencial antiproliferativo de novos complexos de cobre em diferentes linhagens de tumores mamários. Visto que os complexos demonstraram citotoxicidade significativa contra as células tumorais e notável seletividade, selecionamos aquele que exibiu os melhores resultados e realizamos ensaios adicionais buscando identificar seu mecanismo de ação. Levantamos a hipótese de que o complexo avaliado também exerce sua ação via modulação da sinalização purinérgica. Nosso estudo, portanto, ilumina alvos inéditos modulados por complexos metálicos de cobre e abre novos caminhos na determinação de regimes terapêuticos para o CMNT.

Palavras-chave: Câncer de mama; Complexos de cobre (II); Hidrazidas alifáticas

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the malignant neoplasm that most affects women worldwide. It is a disease whose etiology is multifactorial in nature, with varied clinical and morphological manifestations, distinct molecular signatures and different response profiles to therapy. Currently, BC is the leading cause of death associated with cancer and it is estimated that between the years 2020 to 2040, about 3 million new diagnoses will occur. Due to their molecular complexity, breast tumors are classified into different subtypes. Among these, triple negative CM (TNCM) corresponds to about 15% of cases, with worse prognosis and lower free and overall survival. The clinical management of CMTN is restricted. These are tumors that do not express estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor type 2 receptors. Thus, they are mostly treated systemically by chemotherapy. Indeed, the benefits of chemotherapy for CMTN have been reported. Data from different studies have demonstrated its efficacy in neoadjuvant, adjuvant and metastatic scenarios. However, the side effects caused by drugs, due to their non-specificity for tumor cells and cytotoxicity in normal cells, added to the high aggressiveness and high potential for dissemination and recurrence of TN breast tumors, require new approaches. The inclusion of metal complexes in cancer treatment began with the discovery of the antineoplastic properties of cisplatin. However, due to serious side effects, such as hepatotoxicity, and limited therapeutic efficacy, the synthesis of new metal complexes with antitumor properties has become necessary. In this context, the synthesis of copper-based complexes has stood out. Copper is an essential micronutrient for the body acting as a catalytic cofactor and structural component of different enzymes. Its unique electronic structure and its endogenous nature make it a promising metal for the chemical synthesis of drugs based on potentially less toxic and more selective metals. The benefits of administering copper complexes in the treatment of BC have been described, however the antiproliferative mechanism associated with these compounds is mostly restricted to the 2 apoptosis and generation of reactive oxygen species. Interestingly, the scenario described drives the development of new copper-

based complexes with antitumor potential in the treatment of CMNT, as well as the investigation of novel signaling pathways that can be modulated by these compounds. In the present study, we evaluated the antiproliferative potential of new copper complexes in different breast tumor cell lines. Since the complexes showed significant cytotoxicity against tumor cells and remarkable selectivity, we selected the one that exhibited the best results and performed additional assays seeking to identify its mechanism of action. We raised the hypothesis that the assessed complex also exerts its action via modulation of purinergic signaling. Our study, therefore, sheds light on novel targets modulated by copper metal complexes and opens new avenues in determining therapeutic regimens for CMTN.

Keywords: Breast cancer; copper(II) complexes; aliphatic hydrazides

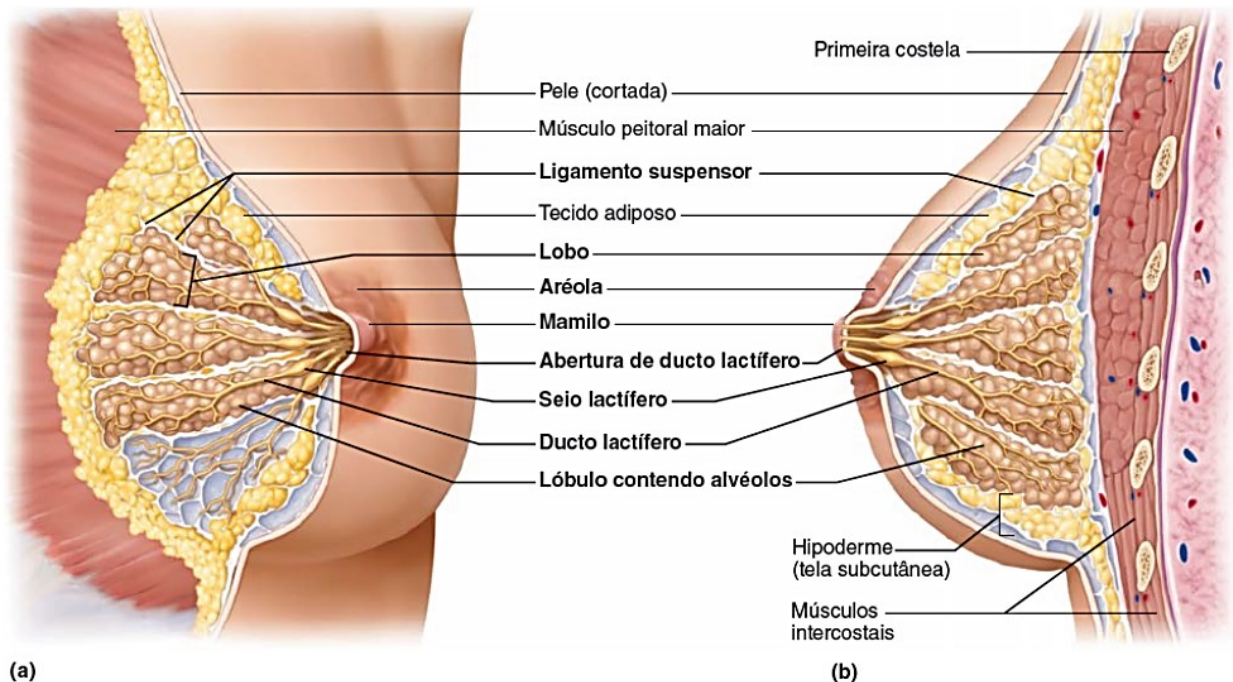
Capítulo I

Fundamentação teórica

1. ANATOMIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Localizada na parede torácica anterior e distribuída bilateralmente, a mama humana adulta (**Figura 1**) é uma área de pele e tecido conjuntivo subjacente, cuja base se estende verticalmente da segunda à sexta costela e horizontalmente do esterno à linha axilar. Cada mama apresenta, em sua estrutura, um grupo de 15 a 20 lobos, que, em conjunto, compõem a glândula mamária (JOHNSON, 2010). Em sua porção central, a mama possui uma região pigmentada, a aréola, no meio da qual emerge uma elevação, o mamilo. Descrita como uma estrutura exclusiva aos mamíferos, a glândula mamária é um órgão altamente especializado com função primária de sintetizar, secretar e fornecer leite durante o período de amamentação da progênie (HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

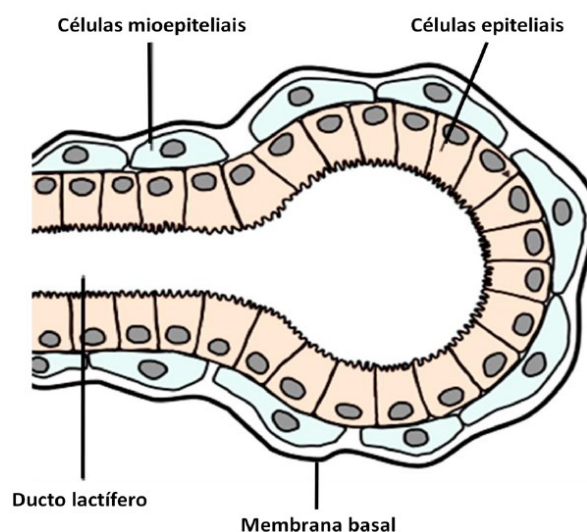
Figura 1. Componentes estruturais e funcionais do tecido mamário. Em **a)** vista anterior de uma mama parcialmente dissecada. Em **b)** corte sagital de uma mama.



Adaptado (MARIEB, 2014).

Histologicamente, a mama humana adulta é formada por três tecidos principais: o glandular, correspondente ao parênquima mamário, o conjuntivo fibroso estrutural e o tecido adiposo (FU; NOLAN; LINDEMAN; VISVADER, 2020). O componente glandular é constituído por lobos que se subdividem em lóbulos que, por sua vez, são formados por um conjunto de alvéolos ou ácinos. Estes convergem para um ducto lactífero cuja função é conduzir o leite até um ducto maior, que se abre na superfície do mamilo (**Figura 1**) (SRIVASTAVA; HUYCKE; PHONG; GARTNER, 2020). Cada alvéolo é revestido por duas camadas de células epiteliais. A primeira, interna e circundando o lúmen ductal, é formada por células luminais cuboidais capazes de se diferenciarem em células secretoras de leite, os lactócitos. A segunda camada, externa, é constituída por células mioepiteliais contráteis que envolvem firmemente a camada luminal e são responsáveis pela ejeção do leite durante a amamentação. A camada mioepitelial é revestida por uma membrana basal, a qual confere sustentação às células mioepiteliais (**Figura 2**) (VISVADER, 2009). Estas apresentam propriedades de células musculares lisas e, que, embora expressem diferencialmente citoqueratinas e outras substâncias quando comparadas às células epiteliais, ambas derivam de uma única célula-tronco mamária (ZHANG; LI; SONG; SHENG *et al.*, 2016).

Figura 2. Composição celular do alvéolo mamário.



Adaptado (RADISKY; HIRAI; BISSELL, 2003).

O estroma mamário é responsável pela sustentação dos lobos e assegura a manutenção dessas estruturas por meio dos ligamentos suspensórios de Cooper (NELSON; BISSELL, 2005). Também incorpora tecido adiposo e está presente tanto no interior dos lóbulos, estroma intralobular, quanto entre eles, estroma interlobular (HASSIOTOU; GEDDES, 2013). A matriz estromal apresenta uma composição complexa sendo formada por diferentes tipos celulares, tais como células endoteliais, fibroblastos, adipócitos, células do sistema imune, células vasculares e linfáticas hormonais e atua na sinalização com o epitélio, o que o torna um componente essencial para o desenvolvimento da glândula mamária (SAKAKURA; SUZUKI; SHIURBA, 2013).

Finalmente, o tecido adiposo, definido como um tecido conjuntivo frouxo formado por adipócitos, é constituído por gorduras mamária e subcutânea, sendo responsável por envolver toda a glândula formando uma rede de proteção (ZHU; NELSON, 2013). Nos períodos que compreendem a gestação e a lactação, observa-se que os adipócitos possuem conteúdo lipídico reduzido, o que os torna uma fonte de energia essencial para a produção de leite. Ademais, os adipócitos também se destacam pela sua função endócrina, uma vez que regulam o crescimento e a função epitelial (MUSUMECI; CASTROGIOVANNI; SZYCHLINSKA; AIELLO *et al.*, 2015).

Alterações nos mecanismos de regulação do crescimento e proliferação de células mamárias, resultam na formação de células anormais e na multiplicação desordenada dessas células. Essas alterações podem favorecer a instalação de tumores no tecido mamário e, por consequência, o desenvolvimento de câncer.

2. CÂNCER DE MAMA

2.1 HALLMARKS

A transformação de células normais em células tumorais envolve diferentes mecanismos. Esses têm sido descritos como capacidades ou *hallmarks* e estão intimamente relacionados ao fenótipo maligno (ZHONG; YU; VIRSHUP; MADAN, 2020). Inicialmente, Hanahan e Weinberg, em 2011, propuseram oito *hallmarks* principais: (i) proliferação sustentada, (ii) insensibilidade aos supressores de crescimento, (iii) potencial replicativo infinito,

(iv) resistência a mecanismos de morte celular, (v) indução da angiogênese, (vi) evasão do sistema imunológico, (vii) desregulação do metabolismo energético e (viii) ativação de invasão e metástase (HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A proliferação celular é um processo complexo e rigorosamente controlado. Mutações em genes denominados proto-oncogenes e genes supressores tumorais iniciam o processo de carcinogênese conferindo às células a capacidade de contornar esse controle e de superexpressar marcadores associados ao metabolismo, proliferação, migração e invasão (LI; EU; KONG; WANG *et al.*, 2020; PARK; PYUN; PARK, 2020). As proteínas codificadas por esses genes mutados passam a estimular e/ou a sustentar a progressão da célula ao longo do ciclo celular, como a RAS (do inglês *Rat Sarcoma vírus*) que estimula a via MAPK, a RAF, uma proteína quinase serina/treonina que atua como o principal efetor de RAS, c-MYC, um fator de transcrição que regula a divisão e morte celulares (DEBERARDINIS; THOMPSON, 2008), os fatores de transcrição E2F1-E2F3, responsáveis pela ativação de genes que induzem a entrada da célula na fase S e as quinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6, as quais atuam na regulação da transição do ciclo celular da fase G1 para a fase S – (QIE; DIEHL, 2016; RUBIN; SAGE; SKOTHEIM, 2020).

A insensibilidade aos supressores de crescimento envolve alterações em supressores tumorais, os quais são responsáveis por promover o reparo do DNA, estimular a ativação dos *checkpoints* do ciclo celular e ativar a morte celular programada. Mutações nos supressores *TP53*, *BRCA1* (do inglês *Breast Cancer Type 1*), *BRAC2* do inglês *Breast Cancer Type*, *PTEN* (do inglês *phosphatase and tensin homologue*), *ATM* (do inglês *ataxia-telangiectasia mutated*) e *CHK2* (do inglês *Checkpoint kinase 2*) têm sido descritas em diferentes tumores (LEE; MULLER, 2010).

Com relação ao potencial replicativo infinito, a manutenção dos telômeros, por meio da reativação da enzima telomerase, condiciona a imortalidade replicativa. Uma vez que a atividade transcriptase reversa da telomerase determina a continuidade da proliferação celular, essa é rigorosamente regulada (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Assim, falhas nesses mecanismos resultam em instabilidade

genômica e garantem a manutenção das células malignas (GUTERRES; VILLANUEVA, 2020).

Adicionalmente, as células inibem a apoptose. Nos mamíferos, as principais vias de sinalização apoptótica são associadas a dois mecanismos: o intrínseco e o extrínseco (STRASSER; VAUX, 2020). No primeiro, há a permeabilização da membrana mitocondrial externa com ativação das proteínas BAK (do inglês *Bcl-2 antagonist killer*) e/ou BAX (do inglês *Bcl-2 Associated X-protein*). *Ocorre a subsequente liberação do citocromo c no citoplasma, formação do apoptossoma e ativação de caspases* (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2018). A via extrínseca é mediada por integrantes da família de receptores da morte, tais como: TNFR1, FAs, também designado como antígeno de apoptose 1 ou *cluster* de diferenciação 95, e TRAILR (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*) (STRASSER; VAUX, 2020). Uma vez combinados aos seus ligantes, esses receptores desencadeiam a transdução do sinal que ativa diretamente as caspases (TZIFI; ECONOMOPOULOU; GOURGIOTIS; ARDAVANIS *et al.*, 2012). Esse processo é inibido por membros da família BCL-2, os quais incluem o próprio BCL-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*), BCL-XL (do inglês *B-cell lymphoma-extra large*), MCL-1 (do inglês *myeloid cell leukemia-1*) e BCL-2-L2 (do inglês *Bcl-2-like protein 2*). Essas proteínas inibem a apoptose ligando-se às proteínas BAX e BAK, impedindo sua oligomerização e sequestrando-as da membrana mitocondrial (THOMAS; LAM; EDWARDS, 2010). Em tumores é notória a expressão exacerbada desses efetores anti-apoptóticos, com inibição de fatores pró-apoptóticos (SEILLER; MAIGA; TOUZEAU; BELLANGER *et al.*, 2020).

Intimamente associada à resistência à morte celular, a evasão imune tem sido amplamente explorada nos últimos tempos enquanto chave para o processo de carcinogênese. Células do sistema imunológico, como os linfócitos T, podem ser recrutadas para destruir as células transformadas ao reconhecerem o padrão diferenciado de peptídeos expressos (VAN DER LEUN; THOMMEN; SCHUMACHER, 2020). Contudo, quando pouco imunogênicas, essas células tumorais evadem ao controle imunológico e se tornam imunorresistentes (AMARAVADI; KIMMELMAN; WHITE, 2016). Ademais, podem expressar a proteína transmembrana PD-L1 (do inglês *Programmed death-ligand 1*). A

ligação de PD-L1 ao seu agonista PD-1, inibindo a ativação de linfócitos T (LI; SHAO; SHI; HAN, 2018).

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular preexistente e é descrita como um processo essencial à manutenção da proliferação e viabilidade das células tumorais (MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021). Todavia, essa rede vascular é caracterizada pela má formação dos vasos sanguíneos produzindo, desse modo, vasos permeáveis dispostos de maneira desorganizada o que culmina em tumores mal perfundidos (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). Esse desenvolvimento inadequado ocorre, em parte, pelos níveis anormais de fatores de crescimento secretados pelas células tumorais e estromais, como de crescimento endotelial vascular, VEGF (VIALARD; LARRIVÉE, 2017). A sinalização angiogênica ocorre mediante a ligação de VEGF a receptores tirosina quinase localizados na superfície de células do endotélio, nomeadamente VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (MELINCOVICI; BOȘCA; ȘUȘMAN; MĂRGINEAN *et al.*, 2018). Angiopoietinas, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador beta também se encontram envolvidos. Além disso, a proliferação contínua resulta na compressão dos vasos intratumorais, o que limita a perfusão e, por consequência, reduz o suprimento de oxigênio e nutrientes. Nesse contexto há formação de um microambiente hipóxico que favorece a seleção de clones capazes de resistir a condições desfavoráveis (MILOSEVIC; JANKOVIC; MILENKOVIC; STOJANOV, 2018).

Por fim, a disseminação metastática é a principal causa de morte relacionada ao câncer. A cascata invasão-metástase inicia-se com a migração das células tumorais e invasão local da matriz extracelular (MEC) circundante. Posteriormente as células atingem a corrente sanguínea, alcançam locais distantes, extravasam no parênquima do órgão, se adaptam ao novo ambiente formando micrometástases multicelulares e, potencialmente, prosperam de modo a estabelecer metástases macroscópicas clinicamente detectáveis (MEIRSON; GIL-HENN; SAMSON, 2020). Proteínas como a E-caderina, ocludina, cateninas, claudinas e metaloproteinases de matriz (MMP) encontram-se intimamente relacionadas a esse evento. De fato, a perda dos sistemas juncionais, nos quais estão envolvidas E-caderinas e claudinas, conduzem à

transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo no qual as células epiteliais assumem um fenótipo migratório com o aumento na expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina, vimentina e fibronectina (CIUCIULETE; STEPAN; BADIU; ANDREIANA *et al.*, 2021; MENDONSA; NA; GUMBINER, 2018). Quanto às MMPs, a degradação da matriz extracelular é um evento crucial para que as células neoplásicas possam invadir tecidos adjacentes e metastizar (MONDAL; ADHIKARI; BANERJEE; AMIN *et al.*, 2020). O aumento da atividade de MMP2 e a MMP9 são descritas em diversos cânceres avançados, contribuindo para um pior prognóstico. Não obstante, essas proteínas estão associadas à agressividade tumoral, bem como têm se mostrado como um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias (JIANG; LI, 2021).

2.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA

A demanda crescente por abordagens terapêuticas mais eficazes para o tratamento do câncer ressalta o impacto dessa doença nos sistemas de saúde em todo o mundo. Globalmente, o câncer representa a segunda principal causa de morte, sendo responsável por cerca de 10 milhões de óbitos em 2020 (WHO, 2023a). Nesse mesmo ano, segundo a *World Health Organization*, os tumores mais frequentemente diagnosticados foram: de mama, 2,26 milhões de casos, de pulmão, 2,21 milhões de casos, colorretal, 1,93 milhões de casos, de próstata 1,41 milhões de casos, de pele não melanoma, 1,2 milhões de casos e de estômago, 1,09 milhões de casos (WHO, 2023a). Estima-se que, entre os anos de 2020 a 2040, sejam registrados 19,3 milhões de novos casos de câncer, sendo que, dentre estes, 3,03 milhões acometerão a mama (WHO, 2023b). No Brasil, dados do INCA apontam 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025, dos quais cerca de 70% se concentrarão nas regiões sul e sudeste. Das neoplasias mais incidentes no país, o câncer de mama (ROXBURGH; MCMILLAN) se destaca na população feminina, correspondendo a 10,5% do total de cânceres diagnosticados e com 74 mil novos casos previstos por ano até 2025 (INCA, 2023).

A etiologia do CM é de natureza multifatorial, sendo uma doença associada à idade, a aspectos genéticos/hereditários, a fatores endócrinos/história reprodutiva e ao comportamento/exposição ambiental

(UNLU; KIYAK; CAKA; YAGMUR *et al.*, 2017). Dentre esses, a idade é o fator de risco mais bem estabelecido, uma vez que a incidência e a mortalidade por CM aumentam com a idade. De fato, a idade avançada é vinculada ao acúmulo de alterações moleculares oriundas do próprio processo de envelhecimento. Além disso, estimativas globais ratificam a relação entre o CM e a idade avançada, visto que a incidência da doença cresce exponencialmente na população a partir de 40 anos, alcançando seu pico próximo aos 60 (WHO, 2021).

Acerca dos fatores genéticos/hereditários, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* aumentam as chances de desenvolvimento de CM (MOYER, 2014). Estes são supressores tumorais e atuam no reparo de eventuais quebras no DNA. Células mutadas acumulam rearranjos cromossômicos durante sucessivas mitoses, o que culmina no surgimento de clones potencialmente metastáticos (SALEEM; GHAZALI; WAHAB; YUSOFF *et al.*, 2020). Ademais, cerca de 25% dos casos de CM estão relacionados ao histórico familiar, de modo que o número de parentes de primeiro e segundo graus diagnosticados, a existência de CM bilateral, ou até mesmo o acometimento de homens estabelece a possível existência da doença familiar (BREWER; JONES; SCHOEMAKER; ASHWORTH *et al.*, 2017). Nesse contexto, estudos demonstraram que mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* representam cerca de 15 a 20% dos casos familiares e que mulheres que carregam essas mutações apresentam um risco estimado de 40 a 87% de desenvolverem a doença aos 70 anos (ESPINEL; CHAMPINE; HAMPEL; JETER *et al.*, 2022).

Mutações no gene *TP53* também são altamente penetrantes, sendo detectadas em cerca de 30-35% dos CMs primários invasivos (KAUR; VASUDEVA; KUMAR; MUNSHI, 2018). Esse gene é codificado para p53, um supressor de tumor responsável pelo controle do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e senescência celular (KASTENHUBER; LOWE, 2017). Por fim, alterações na sinalização relacionada a fatores de crescimento, como no receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), estão intimamente relacionadas não somente ao surgimento, mas à agressividade de tumores mamários. Mutações em seu gene codificante conduzem à síntese de uma proteína cuja atividade é contínua, o que culmina na proliferação celular autônoma (BROWN, 2021).

Fatores endócrinos, juntamente com a história reprodutiva, também estão correlacionados ao CM. De fato, uma exposição hormonal prolongada, especialmente ao estrogênio, é um fator de risco bem estabelecido (AKRAM; IQBAL; DANIYAL; KHAN, 2017). Esse hormônio é responsável por ativar a proliferação celular e, quando continuamente estimuladas, as células podem sofrer danos no DNA, o que o torna potencialmente genotóxico (GOMPEL, 2019). Assim, mulheres cuja menarca tenha ocorrido com idade inferior a 12 anos apresentam um risco 20% maior de desenvolver o CM, quando comparadas àquelas em que a primeira menstruação ocorreu acima dos 13 anos. Paralelamente, a menopausa tardia, com idade superior a 55 anos, também se apresenta como um aspecto que favorece o surgimento da doença (KASHYAP; PAL; SHARMA; GARG *et al.*, 2022). Em uma análise conjunta de 13 estudos sobre mulheres na pós-menopausa, os níveis circulantes de estrogênio foram 6% menores naquelas cujas menarcas ocorreu com idade ≥ 14 anos (KEY; APPLEBY; REEVES; RODDAM *et al.*, 2011).

Nesse contexto hormonal, alterações dos padrões reprodutivos como gravidez tardia, nuliparidade e menor prevalência da amamentação também merecem atenção (INCA, 2022). A idade tardia da primeira gravidez, tal como a nuliparidade, podem aumentar o risco de CM (WHO, 2021). Alguns estudos epidemiológicos demonstram que mulheres que tiveram filhos em idade mais jovem, em torno dos 20 anos, têm menor propensão ao desenvolvimento da doença em relação àquelas que não tiveram filhos ou os tiveram tardiamente, com idade superior aos 30 anos (SUN; ZHAO; YANG; XU *et al.*, 2017). Além disso, a amamentação exerce um papel protetivo devido à diferenciação e posterior apoptose de células mamárias, diminuindo os efeitos genotóxicos impostos pelo estrogênio (WINTERS; MARTIN; MURPHY; SHOKAR, 2017).

Com relação aos fatores comportamentais/ambientais destacam-se: a ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso/obesidade, dieta, sedentarismo e exposição à radiação (COUGHLIN, 2019). Meta-análises realizadas *pelo World Cancer Research Fund*, WCRF, destacaram um aumento de 7% no risco de CM para uma ingestão de 10g de álcool/dia (SUN; XIE; WANG; CHONG *et al.*, 2020; WCRF, 2018) e os mecanismos envolvidos incluem a metabolização do etanol em acetaldeído e o aumento dos níveis circulantes de estrogênio e da atividade dos Receptores de Estrógeno (Res) (ZHOU; YU; WANG; XIAO *et al.*, 2022). O

acetaldeído é um metabólito altamente reativo ao DNA, se mostrando, portanto, genotóxico. Ademais, também pode se ligar a proteínas, tais como a glutathione, interferindo no sistema de defesa antioxidante e enzimas envolvidas no reparo e metilação do DNA (GARAYCOECHEA; CROSSAN; LANGEVIN; MULDERIG *et al.*, 2018). Paralelamente, o consumo de álcool aumenta os níveis de hormônios sexuais via modulação do estresse oxidativo e inibição das enzimas responsáveis pela degradação de esteroides como a sulfotransferase e 2-hidroxiase (LIU; NGUYEN; COLDITZ, 2015).

Contudo, o risco de CM é reduzido em mulheres que mantêm uma rotina regular de atividade física e naquelas cujo consumo de frutas e vegetais é prioritário na dieta (PARK; HOANG, 2021). Pesquisas demonstraram que mulheres que caminham pelo menos 7 horas por semana apresentam um risco de 10 a 25% menor de desenvolverem CM em comparação às sedentárias, destacando-se um efeito protetor ainda maior para aquelas no período pós-menopausa (BUKI; JAMISON; ANDERSON; CUADRA, 2007; WINTERS; MARTIN; MURPHY; SHOKAR, 2017). Os mecanismos biológicos que medeiam a relação entre a prática de atividade física e a diminuição do risco de CM baseiam-se, principalmente, na modulação de marcadores inflamatórios, hormônios sexuais, eixo da insulina/fator de crescimento semelhante à insulina ou IGF-1 e adipocinas (JONES; THOMAS; HESSELSWEET; ALVAREZ-REEVES *et al.*, 2013). Assim, a obesidade é um preocupante fator de risco. De fato, o tecido adiposo é metabolicamente ativo com altos níveis de enzima aromatase, responsável pela conversão de andrógeno em estrogênio, contribuindo para o aumento dos níveis hormonais circulantes (LEE; KRUPER; DIELI-CONWRIGHT; MORTIMER, 2019). Além disso, a obesidade conduz à inflamação do tecido adiposo via ativação de macrófagos que produzem mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , e interleucina 6, IL-6 (PRICEMAN; KUJAWSKI; SHEN; CHERRYHOLMES *et al.*, 2013). Estes, por sua vez, estimulam a liberação de leptina, adipocinas e proteína C reativa, juntamente com a diminuição de citocinas anti-inflamatórias como a adiponectina (ROXBURGH; MCMILLAN, 2014). A inflamação desregulada no tecido adiposo resulta em acúmulo de células T pró-inflamatórias e redução de T regs, o que contribui para a resistência à insulina relacionada à obesidade (PRICEMAN; KUJAWSKI; SHEN; CHERRYHOLMES *et al.*, 2013). A resistência à insulina,

bem como a hiperinsulinemia, têm sido relatadas como fatores de risco independentes para CM (COUGHLIN, 2019).

Portanto, cuidados com relação à dieta são primordiais. O consumo de carne vermelha, processada ou não processada, é vinculado ao risco de CM devido ao alto teor de ferro heme, aos mutagênicos criados durante o cozimento e à agentes carcinógenos adicionados durante o processamento, nomeadamente nitritos e nitratos (INOUE-CHOI; SINHA; GIERACH; WARD, 2016). Não obstante, a carne vermelha é uma importante fonte de nutrientes, como proteínas, zinco e vitamina B12 e as diretrizes nutricionais recomendam seu consumo limitado, variando de 350 a 500g/semana e a abstenção de carne processada, tais como os embutidos (WOLK, 2017).

Já frutas e vegetais são fontes importantes de polifenóis e fibras. Estudos demonstram que os polifenóis podem controlar a proliferação celular no CM, bem como a atividade metastática ao modular a IL-6 (KANAYA; ADAMS; TAKASAKI; CHEN, 2014). São capazes de inibir a atividade das enzimas lipoxigenase e da ciclooxigenase, assim como do fator de transcrição NF-kB (DE CICCIO; CATANI; GASPERI; SIBILANO *et al.*, 2019). Além disso, alguns polifenóis antagonizam a sinalização do estrogênio via inibição da enzima aromatase ou ligação ao RE (CHEN; CHIEN, 2014). As fibras também reduzem os níveis séricos do estrogênio, bem como melhoram a sensibilidade à insulina, com consequente redução de ganho de peso (XU; SUN; SHI; ZOU *et al.*, 2022).

Por fim, a radiação ionizante, oriunda de fluoroscopia, radioterapia, combustíveis e resíduos radioativos e métodos diagnósticos, causa danos diretos e indiretos ao DNA e aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), e nitrogênio (ISAKOFF; MAYER; HE; TRAINA *et al.*). Estas promovem alterações epigenéticas, o que culmina em mutações e instabilidade genômica (PRIOR; MIOUSSE; NZABARUSHIMANA; PATHAK *et al.*, 2016).

Diante da natureza multifatorial do CM e da complexa rede bioquímica associada ao desenvolvimento e progressão desses tumores o diagnóstico precoce é decisivo para um melhor prognóstico e um tratamento eficaz.

2.3 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E MOLECULARES

O diagnóstico precoce do CM é preponderante para a cura e é realizado pelo monitoramento clínico, por exames de imagem e por técnicas moleculares

(JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018). O autoexame é amplamente divulgado, baseado na avaliação periódica do aspecto, textura e coloração das mamas, sendo uma alternativa para a busca ativa pela análise especializada (MILOSEVIC; JANKOVIC; MILENKOVIC; STOJANOV, 2018). Clinicamente, de forma geral, as alterações benignas são limitadas e apresentam consistência e mobilidade mais suaves. Já as alterações de natureza maligna são caracterizadas por terem uma consistência mais sólida e por apresentarem uma fixação pelo substrato ou pela pele (MILOSEVIC; JANKOVIC; MILENKOVIC; STOJANOV, 2018).

Para uma melhor acurácia diagnóstica, são adotadas as técnicas de imagem como a mamografia, a ultrassonografia, a ressonância magnética (MRI), a tomografia por emissão de pósitrons (PET), a tomografia computadorizada (TC) e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018). A mamografia é considerada o padrão-ouro para a detecção e triagem do CM, uma vez que se mostra sensível e específica, com baixo custo e ampla aceitabilidade pelas pacientes (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018). É indicada para mulheres acima de 40 anos, mesmo assintomáticas, sendo realizada a cada dois anos (MILOSEVIC; JANKOVIC; MILENKOVIC; STOJANOV, 2018). Porém, ainda há casos falso-positivos, o que demanda estratégias alternativas de diagnóstico (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018).

A ultrassonografia é considerada como um método de diagnóstico e monitoramento, sendo, por vezes, complementar à mamografia. Não utiliza radiação ionizante e apresenta alta sensibilidade, podendo ser utilizada em pessoas jovens, grávidas e lactantes (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018). Essa técnica permite a avaliação da morfologia e das margens de lesões por múltiplos planos e com alta resolução, o que auxilia na escolha terapêutica, além de possibilitar a visualização de possíveis metástases (GUO; LU; QIN; FEI, 2018). Já a MRI detecta a presença de microcalcificações, lesões pré-malignas, tumores residuais em pacientes já operados e corrimento mamário (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018).

O desenvolvimento e implantação de métodos avançados como PET, TC e SPECT tem possibilitado superar as limitações das técnicas tradicionais. PET e SPECT usam, respectivamente, isótopos radioativos que emitem pósitrons, por exemplo: ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N e ^{11}C , e isótopos que emitem fótons gama $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I ou ^{125}I e são eficazes no diagnóstico do CM, especialmente nos casos com metástases ósseas (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*, 2018). De fato, a análise precisa das imagens patológicas da mama se tornaram, à medida que as tecnologias e técnicas de bioinformática evoluíram, um meio importante para a detecção precoce de CM (ZHANG; XIA, 2021).

A caracterização molecular de tumores também tem contribuído substancialmente para os avanços na área, possibilitando o surgimento do que é chamado pelos pesquisadores de radiômica. Esta inclui a obtenção de dados como forma, tamanho, textura e intensidade que são correlacionados com os níveis genéticos e moleculares (TAGLIAFICO; PIANA; SCHENONE; LAI *et al.*, 2020). Além disso, pesquisas têm se dedicado à padronização de ferramentas e marcadores relacionados à biópsia líquida, a qual se destaca por possibilitar diagnóstico e triagem precoces, além de permitir o monitoramento longitudinal eficiente da evolução do tumor em resposta a terapia (ALIMIRZAI; BAGHERZADEH; AKBARI, 2019). Contudo, a confirmação diagnóstica permanece por depender da análise do tecido afetado, o qual é excisado por biópsia monitorada, permitindo, assim, a classificação das lesões mamárias

O conhecimento das características histológicas do tumor é relevante e auxilia na compreensão de seu comportamento clínico (RAKHA; REIS-FILHO; BAEHNER; DABBS *et al.*, 2010). Nesse sentido, o CM é categorizado, principalmente, em carcinomas, quando se origina nas células epiteliais mamárias dos ductos terminais e dos lóbulos, e em sarcomas, quando envolve tecidos conjuntivos, como miofibroblastos e vasos sanguíneos. Este representa menos de 1% e é pouco explorado na literatura científica (ZUBAIR; WANG; ALI, 2020). Assim, o CM é amplamente definido como carcinoma *in situ*, invasivo e de intervalo. Os primeiros apresentam baixa capacidade invasiva, ficando mais frequentemente localizados em seus lóbulos e ductos predominantes (ZUBAIR; WANG; ALI, 2020). Esse subtipo representa 20% do total dos casos e muitos pesquisadores o consideram como um precursor não obrigatório do carcinoma invasivo (CORRADINI; CREMONINI; CATTANI; CUCCHI *et al.*, 2021)

Os carcinomas invasivos da mama, por sua vez, possuem alta capacidade invasiva, podendo penetrar tecidos vizinhos e causar metástase. Esse subtipo compreende tumores de amplo espectro que apresentam características clínicas particulares e, por esse motivo, a Organização Mundial de Saúde subdivide os carcinomas invasivos em pelo menos 18 grupos, com diferentes potenciais de malignidade e de migração (ZUBAIR; WANG; ALI, 2020). Dentre esses, o CM invasivo sem tipo especial é o mais frequente, sendo responsável por cerca de 40-80% dos diagnósticos (ŁUKASIEWICZ; CZECELEWSKI; FORMA, 2021).

Por fim, o CM intervalado é definido como uma lesão detectada entre mamografias. É subdividido em ocultos radiograficamente, perdidos e câncer intervalado verdadeiro. Os cânceres ocultos radiograficamente são aqueles muito pequenos para serem detectados. Os perdidos não foram detectados devido a erros de interpretação ou falha técnica. Já os intervalados verdadeiros são tumores que, apesar de negativos em uma triagem anterior, são vistos claramente na mamografia diagnóstica posterior (CORRADINI; CREMONINI; CATTANI; CUCCHI *et al.*, 2021)

Contudo, apenas a classificação histológica não é suficiente para a determinação de um prognóstico e para a escolha da terapia. Isso porque o CM pode estar associado e é influenciado pela expressão de diferentes marcadores moleculares que definem suas particularidades como o RE, o Receptor de Progesterona (RP), o HER2 e o Ki-67, um marcador de proliferação celular (WALKER-SMITH; PECK, 2019). Atualmente, a prática clínica usa uma classificação baseada em cinco subtipos, são eles os subtipos luminais A e B, HER2-enriquecido (HER2E), *basal-like*, e *claudin-low*.

2.3.1 Luminais A e B

Os tumores luminais são assim denominados devido à semelhança das células malignas com as células normais que circundam o lúmen dos ductos mamários. Expressam RE e/ou RP no epitélio luminal que reveste os ductos e correspondem a cerca de 70% de todos os casos (BURGUIN; DIORIO; DUROCHER, 2021). A distinção em Luminal A e B ocorre por meio da análise de marcadores relacionados, principalmente, a vias de proliferação celular (ŁUKASIEWICZ; CZECELEWSKI; FORMA, 2021).

Os tumores Luminal A são RE-positivos e podem ou não expressar RP. São HER2-negativos e apresentam baixos níveis da proteína (Ki-67 < 14%) por isso, são considerados de baixo grau histológico e de crescimento lento, sendo, portanto, associados a um melhor prognóstico (ŁUKASIEWICZ; CZECZELEWSKI; FORMA, 2021). Além disso, a taxa de recidiva e de metástase são relativamente baixas quando comparadas com outros subtipos (MERINO BONILLA; TORRES TABANERA; ROS MENDOZA, 2017).

Os tumores do subtipo Luminal B são de maior grau histológico, sendo mais agressivos e associados a um pior prognóstico. Expressam genes vinculados a HER2 e marcadores de proliferação e migração celulares, apresentando um Ki-67 $\geq$ 14% e uma maior instabilidade genômica (TSANG; TSE, 2020). Nesse sentido, a taxa de recorrência é maior, inclusive com metástases localizadas no osso e fígado, com sobrevida de 1,6 anos após recidiva (ŁUKASIEWICZ; CZECZELEWSKI; FORMA, 2021). O CM Luminal B representa de 10% a 20% dos casos de CM diagnosticados (LI; WEI; LI; WU *et al.*, 2022).

2.3.2 HER2E

Os tumores denominados HER2E contabilizam 15-30% dos tumores mamários. Superexpressam HER2 e são negativos para RE e RP. Apresentam grau histológico intermediário ou alto, com fenótipo mais agressivo e com alta tendência a multifocalidade (TSANG; TSE, 2020). Todavia, a superexpressão de HER2 possibilitou o desenvolvimento de terapias-alvos baseadas na utilização de anticorpos monoclonais anti-HER2, tais como o trastuzumabe, promovendo, desse modo, melhor resposta terapêutica (HURVITZ; MARTIN; SYMMANS; JUNG *et al.*, 2018).

2.3.3 Basal-like

Os tumores *basal-like* são definidos por uma assinatura distinta de expressão gênica caracterizada pela alta expressão de marcadores basais tais como as citoqueratinas (CKs) 5, 6 e 17, laminina e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR1), além de baixa expressão de marcadores luminais (ALLURI; NEWMAN, 2014). Esses tumores acometem 15 a 20% das mulheres. Cerca de 70% dos casos são triplo-negativos (TNs), não expressando

RE, RP e HER2 (BANDO; KOBAYASHI; MIYAKAMI; SUMIDA *et al.*, 2021), o que limita seu tratamento e justifica um pior prognóstico associado a essas pacientes.

2.3.4 Claudin-low

Descrito pela primeira vez em 2007, o subtipo molecular *claudin-low* é caracterizado pela baixa expressão de genes envolvidos na formação de junções celulares como claudinas 3, 4 e 7, ocludina e E-caderina, combinada a alta expressão de genes vinculados a EMT e de marcadores de células-tronco tumorais (POPOVA; KUZNETSOVA; BOGOMAZOVA; IVANOV, 2022). Correspondem a cerca de 7% dos CM diagnosticados (ŁUKASIEWICZ; CZECZELEWSKI; FORMA, 2021) e, em sua maioria, são TNs (FOUGNER; BERGHOLTZ; NORUM; SØRLIE, 2020).

2.4 A COMPLEXIDADE DE TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS

O CMTN é assim definido por não expressar os marcadores RE, RP e HER2 (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010). Representando cerca de 15% a 20% dos casos diagnosticados da doença, é mais prevalente em mulheres jovens, afrodescendentes, hispânicas e portadoras de mutações germinativas deletérias em *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* (do inglês *DNA repair protein RAD51 homolog 1*) (SHIMELIS; LADUCA; HU; HART *et al.*, 2018). É um grupo altamente heterogêneo, dividido em subgrupos distintos de acordo com os perfis clínico, histopatológico e molecular (BORRI; GRANAGLIA, 2021).

Histologicamente, a maioria dos tumores TNs é ductal invasiva de nenhum tipo especial de alto grau, com bordas expansivas, polimorfismo nuclear caracterizado por numerosas mitoses e com zonas geográficas de necrose e infiltrados linfocíticos (GEYER; PAREJA; WEIGELT; RAKHA *et al.*, 2017). Também são identificados carcinomas com diferenciação apócrina, carcinomas com características medulares e carcinomas metaplásicos (LIAO; ZHANG; SUN; LI *et al.*, 2018). No entanto, o CMTN também pode se apresentar com baixo grau histológico que, apesar de raro, possui baixo potencial metastático. Previamente, foi sugerida a existência de pelo menos dois subconjuntos desses tumores de baixo grau, incluindo uma família de lesões compostas pelos casos de adenose microglandular, adenose microglandular atípica e carcinoma de células acinares

e outro grupo caracterizado por tumores semelhantes a glândulas salivares da mama (GEYER; PAREJA; WEIGELT; RAKHA *et al.*, 2017).

Molecularmente, sua heterogeneidade impressiona. O CMTN é caracterizado por apresentar genomas complexos, presença de alta instabilidade genética e padrões intrincados de alterações no número de cópias e rearranjos cromossômicos (LI; ZHANG; HOU; ZHOU *et al.*, 2020). Apesar de não ser identificado um padrão molecular específico, podem apresentar mutações somáticas em genes supressores tumorais como *TP53* e *PTEN*. Além disso, alterações em genes da via PI3K/PTEN/AKT/mTOR têm sido descritas em uma alta porcentagem dos casos (PRVANOVIĆ; NEDELJKOVIĆ, 2021).

O estudo clássico de Lehman e colaboradores, 2011, classificou sete grupos distintos de CMTN conforme seu transcriptoma, padrão de mutações somáticas e variações no número de cópias gênicas envolvidos em vias celulares específicas (LEHMANN; BAUER; CHEN; SANDERS *et al.*, 2011). Posteriormente, Bareche e colaboradores, 2018, identificaram alterações genômicas características de cada subtipo molecular de CMTN (BARECHE; VENET; IGNATIADIS; AFTIMOS *et al.*, 2018). Os subtipos foram assim definidos:

- Basal 1: ativação de vias reguladoras do ciclo celular e de resposta a danos no DNA. Apresenta altos níveis de instabilidade cromossômica, alta taxa de mutações em *TP53*, ganhos no número de cópias e ampliações de PI3K, AKT e deleções em genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA;
- Basal 2: altos níveis de fatores de crescimento, de marcadores mioepiteliais e ativação de vias metabólicas;
- Imunomodulador: altos níveis de expressão de genes associados à resposta imune e inibidores de *checkpoint* do ciclo celular, incluindo o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) PD-1 e PD-L1. Associado a um melhor prognóstico do CMTN;
- Mesenquimal: expressão de genes envolvidos na motilidade celular e na EMT;
- Tronco mesenquimal: expressão de genes envolvidos na motilidade celular e na EMT. Também expressa genes associados

à proliferação celular e é enriquecido por genes relacionados às células-tronco mesenquimais;

- Receptor de andrógeno luminal: Alta carga mutacional nos genes *PI3K*, *AKT* e *CDH1*. Associado a um pior prognóstico do CMTN;
- Instável: expressão elevada de citoqueratinas basais.

Portanto, esforços recentes de análises moleculares têm melhorado nossa compreensão acerca da complexidade do CMTN. No entanto, ainda são necessários estudos dedicados à compreensão das diferentes vias envolvidas que conduzem a cada subtipo e os impactos desses eventos no prognóstico, na sobrevida e na resposta dos pacientes à terapia.

2.4.1 Prognóstico do CMTN

Entre os subtipos de CM, o TN é o mais agressivo, com rápida progressão e baixa taxa de sobrevida (SIDDHARTH; SHARMA, 2018; ZOU; XIE; ZHENG; LIU *et al.*, 2022). Aproximadamente 46% dos pacientes com esses tumores desenvolvem metástase à distância, sendo que menos de 30% destes pacientes sobrevivem por mais de 5 anos, com tempo médio de sobrevida de aproximadamente 13 meses (CHUE; LA COURSE, 2019; LUO; WANG; HE; ZHU *et al.*, 2022). As metástases mais prevalentes são as cerebrais, pulmonares e viscerais (YIN, L.; DUAN, J. J.; BIAN, X. W.; YU, S. C., 2020). A taxa de mortalidade de pacientes com CMTN dentro de 3 meses após a recorrência é de até 75% com um pico de risco de recidiva e morte ocorrendo entre 3 e 5 anos após o tratamento inicial (ZOU; XIE; ZHENG; LIU *et al.*, 2022).

De acordo com a literatura, diversos fatores têm sido associados ao pior prognóstico do CMTN, incluindo invasão linfovascular, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos e expressão de marcadores moleculares conforme seus subtipos (BOU ZERDAN; GHORAYEB; SALIBA; ALLAM *et al.*, 2022; SPORIKOVA; KOUDELAKOVA; TROJANEC; HAJDUCH, 2018). Estes incluem alta expressão de p54 e Ki-67 e baixa expressão de Bcl-2 e E-caderina, por exemplo. Também influenciam no prognóstico o tamanho do tumor e alto grau mitótico nuclear (ALMANSOUR, 2022; BI; TIAN; LE; WANG *et al.*, 2016; WU; MA; DENG; LUO *et al.*, 2019). Já a infiltração de linfócitos vem sendo associada a um prognóstico mais favorável da doença (ONO; TSUDA; SHIMIZU; YAMAMOTO *et al.*, 2012).

A resposta patológica completa (pCR) é um parâmetro amplamente utilizado na clínica que define a ausência a lesão após tratamento (SASANPOUR; SANDOUGH DARAN; MOSAVI-JARRAHI; MALEKZADEH, 2018). Muitos estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre a pCR e um bom prognóstico do CMTN, contudo, autores ainda criticam os parâmetros adotados, os quais não consideram a eliminação da doença residual nos linfonodos (SASANPOUR; SANDOUGH DARAN; MOSAVI-JARRAHI; MALEKZADEH, 2018; VON MINCKWITZ; UNTCH; BLOHMER; COSTA *et al.*, 2012). De fato, o prognóstico da doença é diretamente impactado por seu perfil histológico e molecular, os quais direcionam as abordagens terapêuticas, como por exemplo o método, a dose, a duração e a intensidade das drogas a serem utilizadas (CAO; NIU, 2020).

2.4.2 Tratamento do CMTN

De forma geral, o CMTN possui opções de tratamento mais limitadas, uma vez que não expressa os receptores que o tornaria elegível a hormonioterapia e terapia-alvo com anti-HER2 (YIN, L.; DUAN, J.-J.; BIAN, X.-W.; YU, S.-C., 2020). Nos últimos anos, casos de CMTN metastáticos têm sido tratados com inibidores de poli, ADP-ribose, polimerase (PARP), quando identificadas mutações em *BRCA1/BRCA2* e com agentes imunoterápicos direcionados a moléculas que suprimem a resposta imunológica, quando os tumores expressam essas proteínas de *checkpoint* (BARCHIESI; ROBERTO; VERRICO; VICI *et al.*, 2021; VALENCIA; RIOJA; MORANTE; RUIZ *et al.*, 2022). Portanto, a principal forma de tratamento para a ampla maioria dos pacientes permanece a quimioterapia (QT) citotóxica, com a necessidade de constante otimização dos regimes adotados.

Os benefícios da QT para o CMTN estão bem estabelecidos, com dados relatando sua eficácia nos cenários neoadjuvante -antes da intervenção cirúrgica-, adjuvante -após intervenção cirúrgica- e metastático (LEBERT; LESTER; POWELL; SEAL *et al.*, 2018; LEE; YOST; YUAN, 2020). Quando comparado com os subtipos luminais, o uso da QT nesses tumores é acompanhado por uma taxa de resposta patológica significativamente maior e pode melhorar consideravelmente o prognóstico dos pacientes, principalmente na neoadjuvância (WAHBA; EL-HADAAD, 2015). Assim, o uso de tratamento

sistêmico neoadjuvante nos estágios iniciais da doença tem se tornado um padrão de tratamento para casos de CMTN e está associado a taxas mais promissoras de pCR, em torno de 30 - 40%, (DIECI; DEL MASTRO; CINQUINI; MONTEMURRO *et al.*, 2019). De fato, pacientes que atingem pCR com a terapia primária geralmente possuem uma maior sobrevida livre e global (HUANG; O'SHAUGHNESSY; ZHAO; HAIDERALI *et al.*, 2020).

As combinações de doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel são amplamente empregadas na QT neoadjuvante e resultam em taxas de pCR de 35 a 45% (BISWAS; EFIRD; PRASAD; JINDAL *et al.*, 2017). Também têm sido incluídos quimioterápicos à base de platina, o que tem melhorado as taxas de pCR a curto prazo (ISAKOFF; MAYER; HE; TRAINA *et al.*, 2015). Na terapia adjuvante, as diretrizes da Rede Nacional Abrangente de Câncer - NCCN (do inglês *The National Comprehensive Cancer Network*) recomendam o uso de regimes de combinação baseados em taxanos, como o docetaxel, antraciclina como doxorrubicina, alquilante como ciclofosfamida, compostos de platina, tais como a cisplatina e carboplatina, e antimetabólitos como 5-Fluorouracil (5-Fu)/metatrexato (YIN, L.; DUAN, J.-J.; BIAN, X.-W.; YU, S.-C., 2020).

O mecanismo de ação dos taxanos se dá principalmente pela inibição da despolimerização dos microtúbulos, impedindo as células de formar fusos mitóticos, forçando-as a pararem na pro-metáfase, e inibindo, assim, a divisão celular. Além disso, também podem mediar a resposta imune antitumoral por meio da ativação de macrófagos e induzir de apoptose (CHUNG; ANAND; ANSELME; CHAN *et al.*, 2021). O docetaxel apresenta uma maior potência citotóxica, tem o dobro do efeito de despolimerização dos microtúbulos comparado ao taxel e tem um espectro antitumoral mais amplo (YIN, L.; DUAN, J. J.; BIAN, X. W.; YU, S. C., 2020).

As antraciclinas e seus antibióticos derivados, como a doxorrubicina, são utilizadas para tratar diversos tipos de cânceres como leucemia, linfoma, câncer uterino, câncer de ovário, câncer de pulmão e CM (W EDWARDSON; NARENDRULA; CHEWCHUK; MISPEL-BEYER *et al.*, 2015). Existem dois mecanismos propostos pelos quais essa droga atua na célula-alvo: (i) intercalação no DNA e interrupção do reparo mediado pela topoisomerase II e (ii) geração de radicais livres, danificando as membranas celulares, DNA e proteínas (THORN; OSHIRO; MARSH; HERNANDEZ-BOUSSARD *et al.*, 2011).

De acordo com os dados clínicos existentes, após 6 meses de QT com antraciclinas, a taxa de mortalidade diminuiu cerca de 38% em pacientes com menos de 50 anos no momento do diagnóstico. Já a taxa de mortalidade em pacientes com mais de 50 anos no momento do diagnóstico diminuiu em aproximadamente 20% (GROUP, 2005).

Agentes alquilantes como a ciclofosfamida e os compostos de platina atuam através de três mecanismos distintos: (i) alquilação das bases do DNA com a fixação de grupos alquilas induzindo a atividade de enzimas de reparo, retardando dessa maneira, a replicação do DNA e a transcrição do RNA; (ii) indução da formação de ligações inespecíficas dentro da molécula de DNA, o que impede sua replicação e transcrição e (iii) indução do pareamento incorreto dos nucleotídeos promovendo parada do ciclo celular pelos mecanismos de reparo (NAKATSUKASA; KOYAMA; OOUCHI; IMANISHI *et al.*, 2017). Curiosamente, a ciclofosfamida não possui atividade antitumoral *in vitro*. Depois de administrada ao paciente, a ciclofosfamida é primeiramente convertida em aldofosfamida pelas oxidasas microssomais do fígado. Esta é instável e é ativada pelo citocromo P450 nas células tumorais para produzir compostos com atividade alquilante (MORE; THOMAS; CHITLANGE; NANDA *et al.*, 2019). Diversos estudos têm mostrado que a ciclofosfamida pode ser empregada como um neoadjuvante eficaz para o tratamento do CMTN (KORDE; SOMERFIELD; CAREY; CREWS *et al.*, 2021). Já os estudos de Von Minckwitz *et al.* mostraram que a adição de carboplatina à quimioterapia convencional com taxanos ou antraciclinas aumentou significativamente a taxa de pCR em pacientes com TNBC (VON MINCKWITZ; SCHNEEWEISS; LOIBL; SALAT *et al.*, 2014).

Já os antimetabólitos, tais como o antagonista das pirimidinas 5-Fu, executam seu mecanismo de ação mediante o bloqueio da síntese de DNA, tendo suas ações restritas à fase S. Esses fármacos apresentam estruturas análogas às purinas e pirimidinas, inibindo-as por competição (MIURA; KINOUCHI; ISHIDA; FUJIBUCHI *et al.*, 2010). O 5-Fu também não possui nenhuma atividade biológica *per se*, sendo necessária sua conversão em metabólitos ativos como monofosfato de fluorouridina *in vivo*. A capecitabina é uma pro-droga capaz de gerar 5-Fu no organismo e é um agente citotóxico que apresenta atividade seletiva contra células tumorais. É adequada para o tratamento de CMTNs avançados, primários ou metastáticos, quando a QT com

paclitaxel ou antraciclina se mostram ineficazes (NORTHFELT; ALLRED; LIU; HOBDAY *et al.*, 2014; O'SHAUGHNESSY; KAUFMANN; SIEDENTOPF; DALIVOUST *et al.*, 2012). A combinação de capecitabina e cisplatina no tratamento de pacientes com CMTN previamente tratados com antraciclina e taxano mostraram efeitos significativos na redução dos tumores, além efeitos colaterais toleráveis (LI; LI; ZHANG; YUAN *et al.*, 2015). Zhang *et al.* conduziram um estudo de fase II para avaliar a eficácia e tolerabilidade da gencitabina e cisplatina como regime de tratamento de primeira linha para o CMTN metastático. Os resultados mostraram que a combinação foi significativamente eficaz e segura (ZHANG; WANG; HU; WANG *et al.*, 2015).

Não obstante, devido a sua alta agressividade, alto potencial de disseminação e recidiva, o tratamento do CMTN com as opções terapêuticas atualmente disponíveis ainda é desafiador. Os tratamentos empregados visam melhorar a sobrevida e a qualidade de vida da paciente, mas a taxa de mortalidade associadas a esses tumores ainda é alta. Isso posto, o desenvolvimento de fármacos inéditos que possibilitem terapias mais eficazes para o CMTN é essencial e nesse cenário, compostos metálicos, tais como os complexos de cobre têm se destacado.

3. COMPLEXOS DE COBRE NO TRATAMENTO DO CM

A química inorgânica medicinal, por meio da síntese química, oferece alternativas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, uma vez que explora diferentes coordenações e geometrias, além da termodinâmica, cinética, estado redox e propriedades intrínsecas de íons metálicos catiônicos (SANTINI; PELLEI; GANDIN; PORCHIA *et al.*, 2014). A inclusão dos complexos metálicos no tratamento do câncer tem sua gênese na descoberta das propriedades anticancerígenas da cisplatina (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Não obstante, seu uso na prática clínica é questionado, devido a graves efeitos colaterais como hepato e nefrotoxicidade, além de apresentarem eficácia terapêutica limitada ou farmacorresistência (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018). Considerando os índices alarmantes em relação ao câncer no mundo, a síntese de novos complexos metálicos com propriedades antitumorais e capazes de superar as limitações dos compostos baseados em platina é de suma importância.

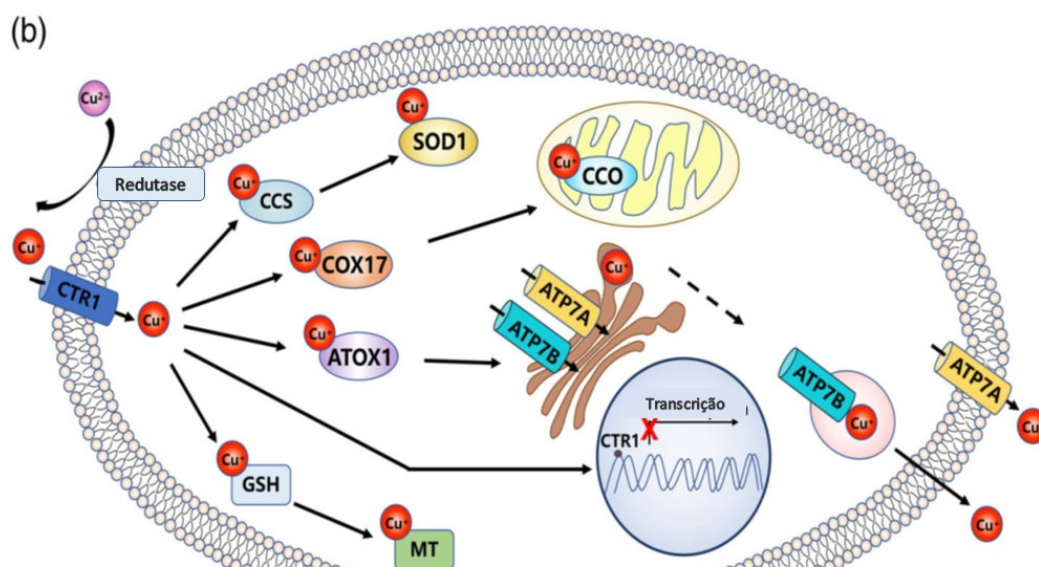
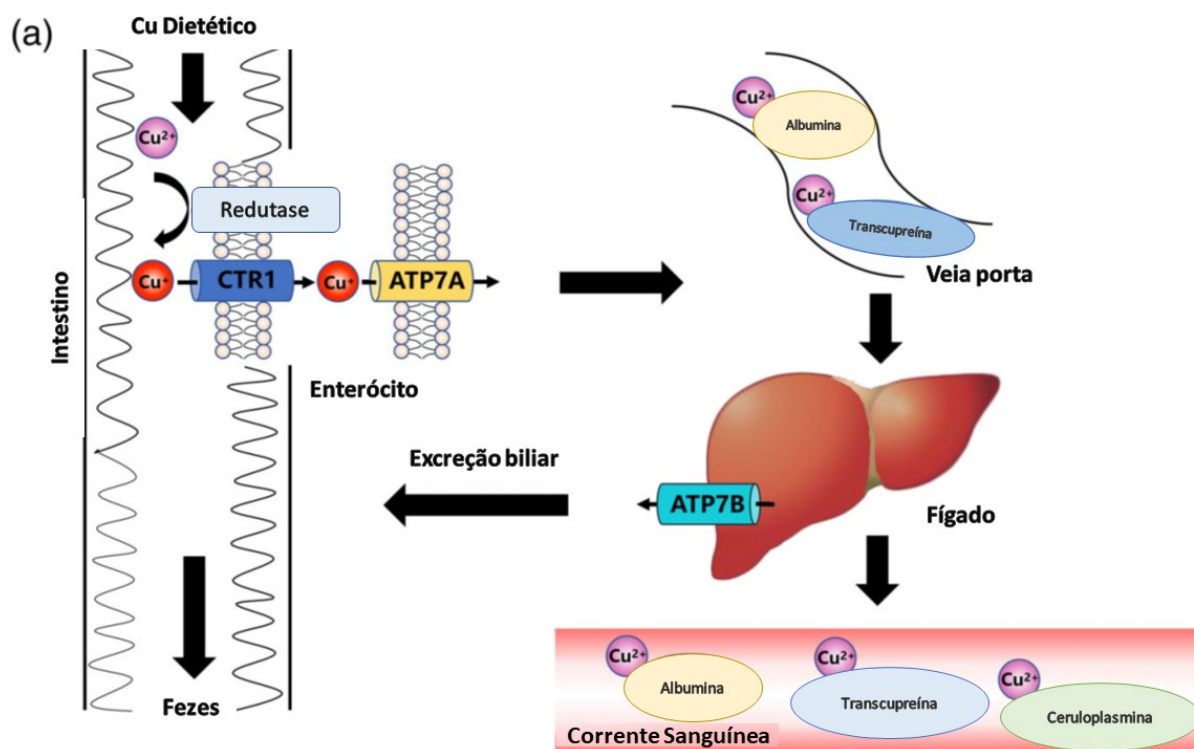
Especial atenção tem sido dedicada ao cobre, um micronutriente essencial a processos biológicos fundamentais aos organismos aeróbios (ARREDONDO; NÚÑEZ, 2005). Devido à sua estrutura eletrônica única, o cobre é um metal cuja capacidade em doar e aceitar elétrons, alternando entre os estados reduzido (Cu^+) e oxidado (Cu^{2+}), permite sua atuação em reações de oxi-redução, agindo como um importante transdutor de sinal, componente estrutural e cofator enzimático (LOPEZ; RAMCHANDANI; VAHDAT, 2019). Na espécie humana, a Cu/Zn superóxido dismutase 1 ou SOD1, citocromo c oxidase, ceruloplasmina, lisil oxidase (LOX) e tirosinase são exemplos de enzimas que dependem do cobre para exercerem suas funções (BLOCKHUYS; CELAURO; HILDESJÖ; FEIZI *et al.*, 2017).

Por ser um componente essencial a diferentes processos celulares, o organismo dispõe de mecanismos sofisticados para assegurar a homeostasia do cobre, incluindo transportadores específicos que regulam a sua absorção, distribuição e efluxo (GUPTE; MUMPER, 2009), tais como o Transportador de cobre de alta afinidade tipo 1 (CTR1) e os Transportadores de cobre ATPase A (ATP7A) e B (ATP7B). Para a desintoxicação encontram-se envolvidas as glutatonas e as metalotioneínas (DENOYER; MASALDAN; LA FONTAINE; CATER, 2015).

A dieta é a principal fonte de cobre. Após a ingestão, este se encontra principalmente no estado Cu^{2+} , sendo, então, reduzido a Cu^+ para ser absorvido no intestino delgado via CTR1. Uma vez no enterócito, o ATP7A é responsável pela transferência do cobre para a veia porta, que, posteriormente, é transportado para o fígado por proteínas plasmáticas, nomeadamente albumina e transcurreína (BOSSAK; DREW; STEFANIAK; PŁONKA *et al.*, 2018; MIGOCKA, 2015). Este é um órgão central na regulação da homeostase sistêmica do cobre, uma vez que capta, excreta e distribui esse metal. Portanto, ao chegar no fígado, o cobre pode ser armazenado nos hepatócitos, transportado para a bile para excreção, ou liberado na corrente sanguínea para distribuição (CHEN; MIN; WANG, 2022). Assim, quando em excesso, o transportador ATP7B, presente nos hepatócitos, exporta o cobre para bile (LI; CHEN; YIN; LIU *et al.*, 2018) e, em condições de demanda, o cobre é liberado na circulação sanguínea e direcionado aos órgãos pelas proteínas plasmáticas

ceruloplasmina, albumina e transcupreína (**Figura 3**) (KIDANE; FARHAD; LEE; SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 3. Mecanismos regulatórios da absorção, distribuição e excreção do cobre. Em **a)** Absorção do cobre no intestino delgado, transporte para o fígado distribuição para a corrente sanguínea e excreção pela bile. Em **b)** metabolismo celular do cobre.



Adaptado (LI, 2020).

Portanto, a desregulação da homeostase do cobre é vinculada a diversas patologias como a doença de Menkes e a doença de Wilson, as quais estão associadas à deficiência e sobrecarga desse metal, respectivamente. Além disso, distúrbios neurodegenerativos, e. g. Alzheimer, Parkinson e CreutzfeldtJakob, artrite reumatóide, úlceras gastrointestinais, diabetes e câncer também são relacionados a níveis alterados desse metal (CHEN; JIANG; SHI; PENG *et al.*, 2020; CZŁONKOWSKA; LITWIN; DUSEK; FERENCI *et al.*, 2018).

No câncer, estudos pré-clínicos realizados em modelos de roedores com tumores mamários, pancreático e de pulmão, demonstraram que a administração de cobre, CuSO₄, por gavagem ou via ingestão em água potável, aumentou significativamente o crescimento da lesão (BRADY; CROWE; TURSKI; HOBBS *et al.*, 2014; ISHIDA; ANDREUX; POITRY-YAMATE; AUWERX *et al.*, 2013). Paralelamente, a deficiência severa de cobre controlada pela dieta desses animais também induziu o processo tumorigênico. De fato, a redução acentuada na ingestão desse micronutriente conduz à depleção do sistema imunológico em camundongos, promovendo o desenvolvimento do câncer (DAVIS; NEWMAN, 2000).

A literatura tem demonstrado níveis séricos elevados de cobre em pacientes oncológicos, quando comparados a indivíduos saudáveis (SANTINI; PELLEI; GANDIN; PORCHIA *et al.*, 2014). Somando-se a isso, níveis elevados de cobre foram correlacionados a diversos cânceres, como cervical (ZHANG; SHI; ZHAO, 2018), ovariano (YAMAN; KAYA; SIMSEK, 2007), pulmonar (ZHANG; YANG, 2018), gástrico (YAMAN; KAYA; YEKELER, 2007) e CM (PAVITHRA; SATHISHA; KASTURI; MALLIKA *et al.*, 2015). Em tumores, o cobre tem sido descrito como um modulador da proliferação, angiogênese e metástase. O cobre regula BRAF e MAPK sendo um elemento essencial à atividade das ERK1 e 2, aumentando sua fosforilação e, por conseguinte, a divisão celular (GARBER, 2015). Na angiogênese, estimula a formação de novos vasos sanguíneos ao promover a proliferação e mobilidade das células endoteliais vasculares e regular a síntese e secreção de mediadores pró-angiogênicos como o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator de crescimento endotelial vascular (DE LUCA; BARILE; ARCIELLO; ROSSI, 2019). O cobre também se liga à angiogenina e é capaz de estabilizar o fator induzível de hipóxia

nuclear-1 (HIF-1) que, por sua vez, aumenta a expressão de genes pró-angiogênicos e de remodelagem da matriz extracelular (GÉRARD; BORDELEAU; BARRALET; DOILLON, 2010; QIU; DING; ZHANG; KANG, 2012).

Com relação à metástase, as atividades das enzimas LOX e de proteínas semelhantes a LOX alteram o microambiente tumoral estabelecendo um nicho pré-metastático dependente de cobre (BHUVANASUNDAR; JOHN; SULOCHANA; CORAL *et al.*, 2014). O mediador pró-metastático MEMO1 também é dependente de cobre e tem sido descrito como um fator prognóstico na detecção de metástases precoces à distância (MACDONALD; NALVARTE; SMIRNOVA; VECCHI *et al.*, 2014).

Por outro lado, níveis elevados de cobre têm sido associados à morte de células tumorais via estresse oxidativo. A reação de Fenton mediada por cobre, ou a depleção de moléculas antioxidantes levam à formação EROs, as quais induzem a expressão de genes reguladores do processo apoptótico ou promovem a disfunção mitocondrial, ativando a via intrínseca da apoptose (COBINE; BRADY, 2022). É válido destacar que níveis baixos de EROs atendem às funções celulares essenciais de modo que, em excesso, alteram a homeostase tanto de células normais, quanto tumorais (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017).

Nesse sentido, a reação de Fenton é uma das reações de catálise mediada por metais, sendo que o cobre atua em uma faixa de pH mais ampla e com maior taxa reacional (HAO; ZHANG; GAO; WEI *et al.*, 2021). Além disso, o estresse oxidativo mediado por cobre também pode ser desencadeado pela depleção de antioxidantes como o tripeptídeo γ -glutamil-cisteinil-glicina, também conhecido como glutathiona (GSH). O cobre pode oxidar a GSH reduzida em dissulfeto de glutathiona oxidada, afetando, desse modo, sua capacidade de proteger as células de radicais reativos (NGAMCHUEA; BATCHELOR-MCAULEY; COMPTON, 2016). Na mitocôndria, foi demonstrado que o transporte seletivo de cobre para essa organela está relacionado ao aumento de EROs (LIU; YANG; ZHANG; YANG *et al.*, 2019). A produção de radicais OH por íons cobre promove a clivagem do DNA e induz a apoptose mitocondrial ao alterar a permeabilidade de sua membrana. Ademais o estresse oxidativo induzido por cobre leva a geração de peróxidos lipídicos, os quais podem

produzir metabólitos secundários nocivos às células tumorais (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; LAWS; BINEVA-TODD; ESKANDARI; LU *et al.*, 2018).

Outro mecanismo associado a ação antitumoral do cobre é a autofagia. Tsang e colaboradores, 2020, demonstraram que o cobre pode interagir com as quinases autofágicas ULK1 e ULK2, promovendo a formação de autofagossomos (TSANG; POSIMO; GUDIEL; CICCHINI *et al.*, 2020). Adicionalmente, os complexos de cobre podem estimular a regulação positiva de proteínas associadas à autofagia, como LC3 e p62 (XIONG; ZHOU; KARGES; DU *et al.*, 2021). O cobre também pode induzir a morte de células tumorais pela inibição do proteassoma, um complexo multiproteico localizado no núcleo e citosol, responsável pela degradação e reciclagem de proteínas obsoletas. GAŁCZYŃSKA e colaboradores, 2020, demonstraram que a inibição do proteassoma estava associada a liberação de citocromo c no citosol e à ativação da cascata das caspases, induzindo a apoptose no tumor (GAŁCZYŃSKA; DRULIS-KAWA; ARABSKI, 2020). Corroborando esse dado, um estudo anterior demonstrou que células neoplásicas são mais dependentes do proteassoma para manterem sua rápida proliferação, tornando-as mais sensíveis à inibição dessa estrutura (SANTINI; PELLEI; GANDIN; PORCHIA *et al.*, 2014). Não obstante, é válido ressaltar que a via de morte celular mediada pelo cobre e seus complexos difere entre os diversos tumores, o que justifica o desenvolvimento de diferentes complexos com estrutura e propriedades únicas para o tratamento do câncer (LELIÈVRE; SANCEY; COLL; DENIAUD *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a abordagem atualmente adotada no desenvolvimento de complexos de cobre para fins terapêuticos, especialmente na oncologia, inclui duas estratégias: 1) compostos capazes de sequestrar o cobre diminuindo assim sua biodisponibilidade, os quelantes de cobre, e 2) complexos de cobre que desencadeiam a morte celular mediante interação com diferentes vias bioquímicas, como as relacionadas à produção de EROs, os ionóforos de cobre (DENOYER; MASALDAN; LA FONTAINE; CATER, 2015). Inicialmente, os quelantes de cobre foram propostos para tratar a doença de Wilson, contudo constatou-se, posteriormente, que esses agentes eram capazes de inibir a angiogênese e prejudicar o crescimento e a metástase de células tumorais prostáticas, pulmonares e mamárias (LI, 2020; WADHWA; MUMPER, 2013).

Dentre os quelantes de cobre com propriedades antitumorais destacam-se o tetramolibdato (TM), D-penicilamina e trientina.

O TM reage com íons cobre, seja Cu^+ ou Cu^{2+} formando aglomerados insolúveis que, posteriormente, são excretados do organismo (DENOYER; CLATWORTHY; CATER, 2018). Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição de NFkB, resultando na diminuição da expressão de VEGF, bFGF e IL-1; na diminuição da expressão do HIF-1 α ; na inibição da atividade da SOD1 e na supressão de ATOX1 e ATP7A (ALVAREZ; XUE; ROBINSON; CANALIZO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; KIM; ABELMAN; YANO; RIBEIRO *et al.*, 2015). A D-penicilamina também reduz o crescimento e vascularização tumorais ao modular a expressão da molécula de adesão intercelular ICAM-1, bem como ao inibir a atividade de LOX e VEGF (CROWE; JACKAMAN; BEDDOES; RICCIARDO *et al.*, 2013; MAMMOTO; JIANG; JIANG; PANIGRAHY *et al.*, 2013). Já a tridentina reduz a quelação de cobre com um perfil de toxicidade mais tolerável em relação aos anteriores (KATHAWALA; HIRSCHFIELD, 2017). Promove a eliminação do cobre via excreção urinária e, em carcinoma hepatocelular, esse quelante foi responsável pela redução da produção de IL-8 e expressão a molécula de adesão celular endotelial plaquetária CD31, controlando o processo metastático (MORIGUCHI; NAKAJIMA; KIMURA; WATANABE *et al.*, 2002; YOSHII; YOSHIJI; KURIYAMA; IKENAKA *et al.*, 2001).

Na segunda estratégia, os ionóforos são responsáveis por aumentar os níveis de cobre intracelular, sendo capazes de intercalar ao DNA e regular o estresse oxidativo (OLIVERI, 2022). Dentre os ionóforos de cobre relatados, o clioquinol e dissulfiram são compostos clinicamente testados. Mecanicamente, ambos conduzem à produção intracelular de EROs e à inibição da atividade proteossômica em células tumorais, o que culmina na apoptose (DENOYER; CLATWORTHY; CATER, 2018; PARK; FOUANI; JANSSON; WOOL *et al.*, 2016). Individualmente, o clioquinol induz a apoptose dependente de caspase (CATER; HAUPT, 2011) e o dissulfiram suprime o sistema ubiquitina-proteossoma (EKINCI; ROHONDIA; KHAN; DOU, 2019).

Com relação ao CM, complexos de cobre inéditos têm sido sintetizados, caracterizados e testados no tratamento dessa doença. Estudos *in vitro* com cinco complexos ternários de cobre(II), demonstraram atividade significativa sobre as linhagens celulares CAL 51 e MDA-MB-231, sendo mais eficazes do

que a carboplatina em promover a morte celular (LI; YAGÜE; WANG; DAI *et al.*, 2019). Os complexos inibiram a atividade proteassômica levando ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas, inibição da proliferação celular e indução da apoptose (LI; YAGÜE; WANG; DAI *et al.*, 2019).

Recentemente, Lee e colaboradores, 2022, sintetizaram e avaliaram o potencial antitumoral do complexo ternário de cobre $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{L-tir})\text{Cl}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, onde fen = 1,10-fenantrolina e tir = tirosina, o qual exibiu capacidade antiproliferativa sobre as células MDA-MB-231 dependente da dose com toxicidade reduzida para a linhagem não tumora MCF-10A (LEE; LEONG; LIM; WONG *et al.*, 2022). Ademais, o complexo desencadeou parada do ciclo celular, indução da apoptose nas células MCF7 e MDA-MB-231 e promoveu o aumento da expressão de LC3II, indicando ativação da autofagia (LEE; LEONG; LIM; WONG *et al.*, 2022). Complexos metálicos, incluindo os de cobre, também conduzem a morte de células-tronco tumorais em CM (LI; LIU; SHI; WANG *et al.*, 2021).

Zhang e colaboradores, 2005, descreveram a síntese e caracterização do complexo octaédrico $[\text{Cu}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2$, em que $\text{L} = 1\text{-}[3\text{-(2-piridil)pirazol-1-ilmetil}]\text{naftaleno}$, o qual apresentou alta afinidade ao DNA e elevada citotoxicidade contra a linhagem de tumor mamário MDA-MB-453 (ZHANG; LIU; BU; YANG, 2005). Em um estudo posterior, os autores demonstraram que o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})_{1/2}(\text{CH}_3\text{OH})_{1/2}$, baseado no mesmo ligante, também apresentou elevada citotoxicidade contra a linhagem MDA-MB-453. As propriedades citotóxicas de ambos os complexos, foram associadas com sua capacidade de intercalar e gerar quebras no DNA (CHEN; LIU; ZHANG; GUO *et al.*, 2007).

Enquanto Bolos e colaboradores, 2002, sintetizaram um complexo de cobre baseado na ligação de $[\text{Cu}(\text{dien})\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (BOLOS; PAPAISIS; KORTSARIS; VOYATZI *et al.*, 2002) ao ligante 2-amino-5metiltiazol. Ensaios *in vitro*, demonstraram citotoxicidade elevada às células de mama T47D, inibindo o ciclo celular, bem como a síntese de DNA, mas sem ativação da apoptose (BOLOS; PAPAISIS; KORTSARIS; VOYATZI *et al.*, 2002). Outro estudo realizado por NG e colaboradores, 2014, mostrou que complexos de cobre baseados em fenantrolina apresentaram citotoxicidade seletiva para células

MDA-MB-231 resistentes a cisplatina em comparação às células MCF-10A. De acordo com os ensaios realizados, a atividade dos compostos baseava-se na geração de EROs, quebras no DNA, parada do ciclo celular e indução da apoptose (NG; KONG; TIONG; MAAH *et al.*, 2014). Em 2020, Zhang e colaboradores sintetizaram dois complexos de cobre contendo bases de Schiff derivadas de l-metioninol, os quais foram capazes de inibir o metabolismo, além de controlar a migração e proliferação de células MDA-MB-231 (ZHANG; HOU; LIU; HUANG *et al.*, 2020).

Nesse cenário, a síntese de complexos de cobre inéditos, bem como a realização de diferentes ensaios avaliando seu potencial antitumoral e a identificação de novas vias moduladas, tornam-se determinante no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento do CM.

4. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

A ideia do que hoje denomina-se sinalização purinérgica, começou a ser concebida em 1929, ano no qual Drury e Szent-Györgi descreveram as ações de nucleotídeos e nucleosídeos purínicos, nomeadamente, adenosina 5'-trifosfato e adenosina, no coração e nos vasos sanguíneos (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*). Os pesquisadores observaram que a injeção intravenosa de extratos de músculo cardíaco e de outros tecidos culminou na diminuição da frequência e ritmo do coração das cobaias. Ao isolarem a substância associada à essa alteração, identificaram a adenosina (ADO) (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929). Posteriormente, a capacidade da ADO de regular o fluxo sanguíneo coronariano foi demonstrada (LINDNER; RIGLER, 1931). Definida como um agente hipotensor, a ADO apresenta uma meia-vida plasmática curta, o que limitou, por um longo período, sua aplicação como um agente hipotensivo (HONEY; RITCHIE; THOMSON, 1930). Entretanto, esta mesma propriedade, 50 anos depois, a tornou uma opção promissora ao tratamento de taquicardia supraventricular (BELARDINELLI; SHRYOCK; SONG; WANG *et al.*, 1995).

Na década de 1950, foi demonstrado o armazenamento do nucleotídeo adenosina 5'-trifosfato (ATP) em grânulos densos de plaquetas sanguíneas e

em grânulos secretores de células cromafins (FANTL; WARD, 1956). Paralelamente, foi descrita a liberação de ATP em conjunto com adrenalina e noradrenalina após estimulação da medula adrenal (CARLSSON; HILLARP, 1956), o que indicou seu papel como uma molécula sinalizadora. Em 1959, F. Holton e P. Holton propuseram o ATP como o nucleotídeo responsável não somente pela vasodilatação antidrômica, como também pela transmissão central de neurônios aferentes, atuando dessa forma como uma substância transmissora análoga à acetilcolina (HOLTON, 1959).

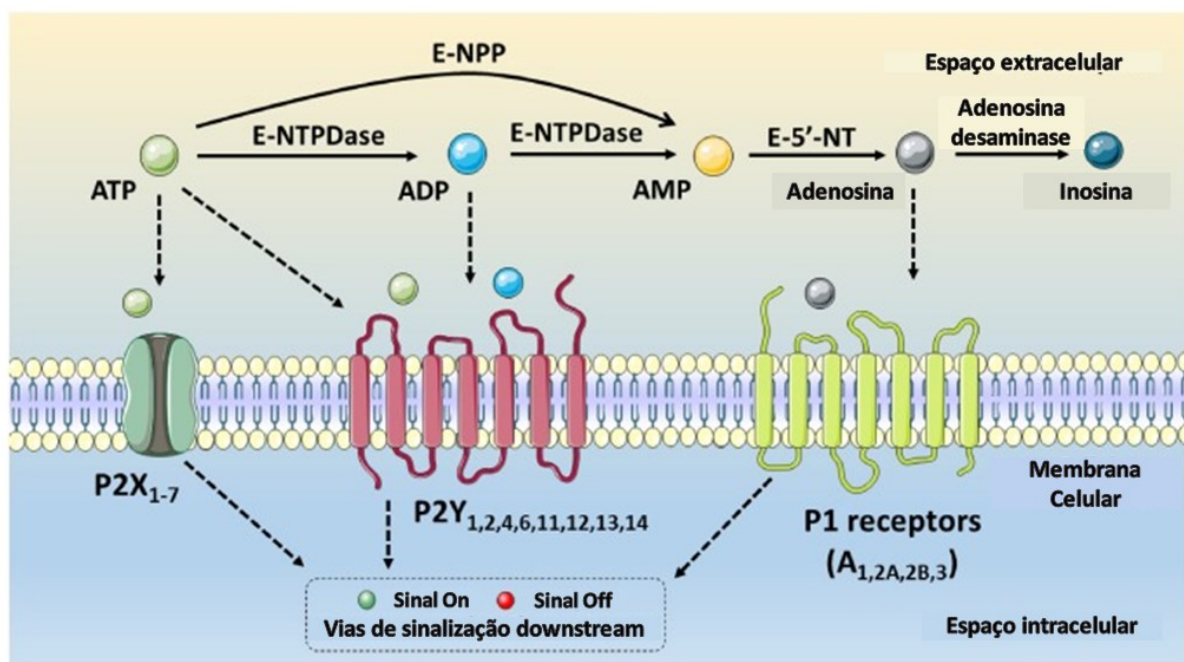
Contudo, havia uma resistência considerável quanto ao papel sinalizador do ATP e seu envolvimento em vias extracelulares moduladas por mecanismos não adrenérgicos e não colinérgicos. A transformação desse cenário iniciou-se na década de 1970, quando Burnstock e colaboradores demonstraram uma rápida hiperpolarização e o relaxamento muscular após bloqueio da ação adrenérgica e colinérgica em músculo liso de *Taenia coli* (BURNSTOCK, 1972). Posteriormente, demonstraram o ATP como responsável por esse efeito (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012). Desse modo, em 1972, o termo “purinérgico” foi cunhado e a hipótese da sinalização purinérgica, sinalização mediada por nucleotídeos e/ou nucleosídeos púricos e pirimídicos, foi proposta por Burnstock (BURNSTOCK, 1972).

Inicialmente descrita como uma sinalização associada à neurotransmissão e à neuromodulação, a sinalização purinérgica está, atualmente, vinculada a diversos processos celulares como diferenciação, proliferação, migração, apoptose, regeneração e cicatrização de lesões (HUANG; XIE; ILLES; DI VIRGILIO *et al.*, 2021; MCEWAN; SOPHOCLEOUS; CUTHBERTSON; MANSFIELD *et al.*, 2021; XING; SONG; ZHANG; ZHANG *et al.*, 2021). Portanto, correlaciona-se diretamente a diferentes patologias, quais sejam: hipertensão arterial, diabetes (REICHERT; CASTRO; ASSMANN; BOTTARI *et al.*, 2021), cardiopatias (BURNSTOCK, 2017), distúrbios do sistema nervoso central (SNC) (ERB; WOODS; KHALAFALLA; WEISMAN, 2019), trombose, aterosclerose (FERRARI; LA SALA; MILANI; CELEGHINI *et al.*, 2020), insuficiência renal (MENZIES; TAM; UNWIN; BAILEY, 2017) e câncer (FRANCIOSI; DO CARMO; ZANINI; CARDOSO, 2022).

O sistema purinérgico é composto por três agentes principais: (a) as moléculas sinalizadoras ou efetores purinérgicos - nucleotídeos e nucleosídeos

- , b) os receptores, aos quais os sinalizadores se ligam e desencadeiam a resposta celular, e c) as enzimas responsáveis por gerar, reconhecer e degradar os efetores purinérgicos (**FIGURA 4**). (DOU; CHEN; COWAN; CHEN, 2018). Destaca-se que a resposta celular decorrente da ligação dos efetores purinérgicos aos seus receptores é específica, uma vez que a expressão de seus componentes varia entre os tipos celulares (BURNSTOCK, 2020).

Figura 4. Representação simplificada do sistema purinérgico. O Sistema purinérgico é constituído enzimas que atuam na superfície celular hidrolisando purinas extracelulares. Estas são denominadas ectoenzimas e incluem as E-NTPDases, ENPPs e E5'-NT ou ecto-5'-nucleotidase e atuam na degradação sequencial de nucleotídeos. A adenina (Ado), nucleosídeo resultante das reações sequenciais de degradação do ATP, pode ser convertido em inosina (Ino) pela enzima adenosina desaminase. Os nucleotídeos ATP e ADP e o nucleosídeo Ado, são exemplos de moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico, que se ligam a receptores específicos, os quais incluem: os receptores ionotrópicos P2X (1-7), os metabotrópicos P2Y (1,2,4,6,11-14) ou os receptores P1 (A1, 2A,2B e 3) acoplados à proteína G. A ligação dos efetores purinérgicos ocorre de acordo a afinidade de cada efector ao seu receptor podendo ativar ou desativar diferentes cascatas de sinalização.



Adaptado, (REICHERT; CASTRO; ASSMANN; BOTTARI *et al.*, 2021).

4.1 SINALIZADORES PURINÉRGICOS

Os sinalizadores ou efetores purinérgicos podem ser distribuídos em dois grupos: 1) purinas e 2) pirimidinas. As purinas e pirimidinas são moléculas vitais que regem as reações bioquímicas celulares sendo essenciais à síntese de ácidos nucleicos (NELSON; VORUGANTI, 2021). Ademais, as purinas atuam como fonte de energia, regulam o crescimento celular e integram a estrutura de coenzimas. As pirimidinas, por sua vez, estão envolvidas na síntese de polissacarídeos e fosfolípidios, em modificações pós-traducionais em proteínas, como a glicosilação, e em processos de desintoxicação (BURNSTOCK; ARNETT; ORRISS, 2013; KHAIRULLINA; TSARDAKAS RENHULDT; WIESENBERGER; BENTZER *et al.*, 2022).

Dentre as purinas, o efector purinérgico que mais se destaca é o ATP (JAFARI; SAADATPOUR; SALMANINEJAD; MOMENI *et al.*), visto que, como “moeda” energética, é uma molécula essencial ao metabolismo celular (RIGOLET; BOUCHEZ; PAUMARD; RANSAC *et al.*, 2020). Enquanto sinalizador, atua no meio intra e extracelular e seus produtos de hidrólise são a adenosina-5'-difosfato (ADP), a adenosina-5'-monofosfato (AMP) e ADO. Devido à sua carga negativa e ao seu tamanho relativamente grande, o ATP não consegue ser transportado via difusão simples para o meio extracelular, sendo liberado das células por mecanismos específicos e inespecíficos. No primeiro caso, o ATP pode ser liberado através de grânulos exocíticos, de microvesículas derivadas da membrana plasmática, por transportadores específicos de cassete de ligação de ATP (ABC) e via canais de membrana. Estes incluem hemicanais de conexina, panexina 1 (PANX1), modulador de homeostase de cálcio 1 (CALHM1), canais aniônicos regulados por volume (VRACs) e canais maxi-ânion (MACs) (VULTAGGIO-POMA; SARTI; DI VIRGILIO, 2020). Inespecificamente, o ATP pode ser liberado das células mediante dano celular por necrose ou apoptose (KOMORI, 2016).

As pirimidinas, tais como, uridina-5'-trifosfato (UTP), uridina-5'-difosfato (UDP), uridina-difosfato-glicose (UDP-glicose) e inosina também são descritas como efetores da sinalização purinérgica (MORRONE; JACQUES-SILVA; HORN; BERNARDI *et al.*, 2003), embora o conhecimento ainda seja restrito quando ao seu papel em mecanismos específicos de sinalização. Contudo, para

desencadear as respostas necessárias, os efetores purinérgicos, assim como em qualquer via de sinalização, precisam interagir com receptores específicos, denominados purinoreceptores ou receptores purinérgicos.

4.2 RECEPTORES PURINÉRGICOS

Descritos pela primeira vez em 1976, os receptores purinérgicos estão distribuídos por todos os tipos celulares e podem ser divididos em duas classes com base na seletividade ao agonista (BURNSTOCK, 1976): receptores purinérgicos do tipo 1 ou P1 e receptores purinérgicos do tipo 2 ou P2. Os receptores P1 têm como único agonista a ADO, enquanto os receptores P2 são responsivos a diferentes nucleotídeos/nucleosídeos, como ATP, ADP, UTP e UDP (STEFANELLO; SPANEVELLO; PASSAMONTI; PORCIÚNCULA *et al.*, 2019).

No início da década de 1990, os receptores P1 foram clonados e caracterizados em 4 subtipos P1_{A1}, P1_{A2A}, P1_{A2B} e P1_{A3}, sendo todos receptores acoplados à proteína G e responsivos à adenosina (BOREA; GESSI; MERIGHI; VINCENZI *et al.*, 2018). O receptor A1 medeia respostas vinculadas ao seu acoplamento a diferentes proteínas que integram a família Gi/o. Um mecanismo de transdução do sinal conhecido desse receptor é associado à inibição da adenilato ciclase, o que culmina na diminuição do AMP cíclico (AMPc) (BURNSTOCK; ARNETT; ORRISS, 2013). Também ativa a fosfolipase C ou PLC, o que desencadeia o metabolismo do fosfatidilinositol de membrana e resulta na produção do Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e do diacilglicerol (DAG). A produção desses metabólitos, por sua vez, leva ao aumento do influxo de cálcio para o interior da célula (PASQUINI; CONTRI; MERIGHI; GESSI *et al.*, 2022). Em contrapartida, os receptores A2A, acoplados às proteínas Gs, ativam a adenilato ciclase. O receptor A2B é capaz de ativar a guanilato ciclase, via junção à Gq mediada por PLC e aumentar a concentração citosólica de Ca²⁺ independente de IP3. Já os receptores A3 são reconhecidos por estarem acoplados à proteína Gi e, minoritariamente, à proteína Gq e, assim, estão associados à inibição da adenilato ciclase (CRONSTEIN; SITKOVSKY, 2017). Os receptores P1 são responsáveis por controlar as atividades cardiovasculares, modular do sistema imune e regular o SNC (ATIF; ALSRHANI; NAZ; IMRAN *et al.*, 2021).

Com relação à família de receptores P2, esta foi subdividida em dois grupos: os receptores P2X e P2Y. Os P2X são receptores ionotrópicos caracterizados como canais iônicos localizados na superfície da membrana plasmática, sendo identificados sete subtipos desses receptores ou P2X₁₋₇ (ANTONIOLI; BLANDIZZI; PACHER; HASKÓ, 2019). Estruturalmente, P2X são canais iônicos triméricos responsivos exclusivamente ao ATP, cuja estrutura apresenta um grupo amino, localizado na porção citoplasmática, um grupo C-terminal mais longo e um domínio extracelular, responsável pela ligação do efector, ATP, antagonistas competitivos e íons metálicos moduladores (GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO, 2019). Os receptores P2X também apresentam domínios transmembrana, que atuam como um canal de cátions não seletivo (DI VIRGILIO; SARTI; FALZONI; DE MARCHI *et al.*, 2018). Uma vez efetuada a ligação do ATP, esses receptores permitem o influxo de íons Na⁺ e Ca²⁺ e o efluxo de íons K⁺, promovendo a sinalização (NORTH, 2016). Quanto às propriedades de abertura dos canais iônicos, estas variam de acordo o subtipo do receptor, sendo que os receptores P2X₂, P2X₄, P2X₇ apresentam uma dessensibilização lenta, enquanto os receptores P2X₁ e P2X₃ apresentam uma dessensibilização rápida (DI VIRGILIO; SARTI; FALZONI; DE MARCHI *et al.*, 2018).

Já os P2Y são caracterizados como receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e distribuídos em 8 subtipos (BURNSTOCK, 2014). Estes podem ser agrupados em duas categorias principais: receptores P2Y acoplados à proteína G_q, responsáveis pela ativação da proteína fosfolipase C β e, portanto, da via de sinalização associada - P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ -, e receptores P2Y acoplados à proteína G_i, cujo acoplamento leva a inibição da enzima adenilato ciclase - P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ - (ZIMMERMANN, 2016). Com relação ao P2Y₁₁, este apresenta um comportamento peculiar, uma vez que é acoplado às proteínas G_q e G_s, provocando, desse modo, um aumento nos níveis citosólicos de AMPc e Ca²⁺, o que demonstra a complexidade desses receptores. Destaca-se que ao contrário dos receptores P2X, responsivos somente ao ATP, os receptores P2Y têm como ligantes diferentes efetores purinérgicos como ATP, ADP, UTP e o UDP-glicose (ERB; WEISMAN, 2012; GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO, 2019).

Assim a sinalização purinérgica também possui um mecanismo de inativação do sinal. Este é executado por enzimas integrantes da família das

ectonucleotidases, cuja atividade é responsável por hidrolisar as moléculas dos efetores purinérgicos (VUERICH; ROBSON; LONGHI, 2019).

4.3 ECTONUCLEOTIDASES

Integrantes essenciais do sistema purinérgico, as ectonucleotidases são ectoenzimas responsáveis por hidrolisar nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, e, por consequência, por controlar a magnitude e a duração da resposta a esses efetores, de modo a interromper a sinalização e evitar a superestimulação ou dessensibilização do receptor (GRKOVIĆ; MITROVIĆ; DRAGIĆ, 2022). Estão localizadas na superfície das células de diferentes tipos celulares e, atualmente, são classificadas em quatro famílias, nomeadamente: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases ou ENTPDases, ectonucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases ou ENPPs, alcalino-fosfatases ou APs e ecto-5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2021).

As E-NTPDases são enzimas que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados em nucleotídeos monofosfatados e fosfato inorgânico (Pi), e, portanto, têm como um de seus substratos o ATP e o ADP (MOESTA; LI; SMYTH, 2020). Do ponto de vista estrutural, as E-NTPDases são descritas como proteínas integrais de membrana, altamente glicosiladas, cuja atividade catalítica subjacente requer concentrações milimolares de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (KNOWLES, 2011). Apresentam em sua estrutura dois domínios transmembrana próximos às regiões amino e carboxiterminal, importantes na regulação das enzimas e responsáveis por ancorar as proteínas à membrana. Ao longo de anos de pesquisas, foram identificados oito membros dessa família de enzimas em humanos enumerados E-NTPDase1-8 (PAES-VIEIRA; GOMES-VIEIRA; MEYER-FERNANDES, 2021). Os membros dessa família possuem massas molares entre 70 e 80KDa e todos apresentam homologia de sequência em cinco regiões altamente conservadas, denominadas “regiões conservadas da aspirase”, que constituem o sítio catalítico das enzimas (MOESTA; LI; SMYTH, 2020; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

No tocante à localização celular, as E-NTPDases 1,2,3 e 8 encontram-se dispostas na superfície extracelular da membrana plasmática, enquanto as E-NTPDases 4, 5, 6 e 7, localizam-se intracelularmente, estando as E-NTPDases 5 e 6 distribuídas no citoplasma, enquanto que as E-NTPDases 4 e 7 encontram-

se inteiramente voltadas para a cavidade de organelas citoplasmáticas (KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011; YEGUTKIN, 2014). Com relação à atividade catalítica, as diferentes isoenzimas têm afinidades distintas pelos substratos, e.g., as enzimas E-NTPDases 1 e 2 hidrolisam preferencialmente nucleotídeos de adenina, quando comparados a di/tri fosfatos de uridina (KNOWLES, 2011; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Dentre os 8 integrantes da família, a E-NTPDase 1 apresenta razão de hidrólise 1:1 para os nucleotídeos ATP e ADP, sem preferência por qualquer um destes enquanto a E-NTPDase 2 tem alta preferência por ATP exibindo uma razão de hidrólise de 30:1 em relação ao ADP. Já as E-NTPDases 3 e 8 têm uma afinidade similar pela hidrólise de ATP e UTP. Não obstante, as E-NTPDases intracelulares 5 e 6 hidrolisam preferencialmente NTP, mas não ADP, enquanto a E-NTPDase 7 tem como principais substratos o UTP, CTP e GTP, ainda que, apresente uma baixa afinidade pelo ATP (YEGUTKIN, 2014).

Os integrantes das E-NTPDases também diferem entre si quanto a sua distribuição tecidual e celular (GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO, 2020). A E-NTPDase 1, e.g., é expressa em células endoteliais e musculares lisas, em uma variedade de leucócitos, tais como linfócitos e monócitos, e na micróglia do cérebro, enquanto a E-NTPDase 2 é expressa na superfície adventícia dos vasos sanguíneos, em células do tipo I das papilas gustativas, em células progenitoras neurais e no sistema nervoso entérico (JIANG; WU; CSIZMADIA; FELDBRÜGGE *et al.*, 2014; KISHORE; ROBSON; DWYER, 2018). Já a E-NTPDase 3 é distribuída em alguns subconjuntos de neurônios e em tecidos que compõem o sistema renal, digestivo, respiratório e reprodutivo. A E-NTPDase 8 é predominantemente expressa no fígado, rim e intestino. Com relação às E-NTPDases intracelulares, estas apresentam uma distribuição tecidual mais ampla, uma vez que a expressão dessas enzimas é diretamente associada ao controle de nucleotídeos no meio intracelular (ZIMMERMANN, 2021; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

Os membros da família ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfoesterase, representam o grupo mais diversificado de enzimas capazes de hidrolisar ligações fosfodiéster e pirofosfato, implicados em processos biológicos e fisiopatológicos importantes, os quais incluem: sinalização de nucleotídeos e fosfolípidios, mineralização óssea, doenças fibróticas e infiltração de células

imunes associadas a tumores (HAUSMANN; PERRAKIS; MOOLENAAR, 2013; MACKENZIE; HUESA; RUTSCH; MACRAE, 2012). As E-NPPs são ectoenzimas transmembrana de passagem única, com exceções às E-NPP2, Autotaxina, e ENNP6, que são secretadas e ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essas enzimas têm como principais substratos nucleotídeos trifosfatados, ATP e UTP, que são hidrolisados em nucleotídeos monofosfatados, AMP e UMP, liberando pirofosfato inorgânico (PPi) ao invés de Pi (BORZA; SALGADO-POLO; MOOLENAAR; PERRAKIS, 2022; STEFAN; JANSEN; BOLLEN, 2005). A família das E-NPPs é constituída por sete enzimas, E-NPP1-7, das quais somente as E-NPP1, 2 e 3 estão associadas à sinalização purinérgica (MUTAFOVA-YAMBOLIEVA; DURNIN, 2014; ONYEDIBE; WANG; SINTIM, 2019).

Quanto as APs, essas enzimas, possuem uma ampla especificidade de substratos que incluem nucleotídeos de adenina tri, di e monofosfatados, polifosfatos inorgânicos e pirofosfato (GREEN; SAMBROOK, 2020). Dentre todas as famílias de ectoenzimas, as APs são as únicas que podem catalisar a desfosforilação completa do ATP, ATP em ADP, AMP e então adenosina. A família das APs é composta por 4 isoenzimas, sendo três dessas tecido-específicas: as fosfatases alcalinas do intestino, placentária e de células germinativas, e a fosfatase alcalina não específica para tecidos ou TNAP, esta última sendo expressa predominantemente nos ossos, fígado e rins (ZAHER; EL-GAMAL; OMAR; ALJAREH *et al.*, 2020). As APs são amplamente distribuídas em diferentes células, sendo encontradas em praticamente todos os tecidos de mamíferos e expressas, inclusive, em uma variedade de tumores (AL-RASHIDA; IQBAL, 2015). Quanto a estrutura, as APs destacam-se pela presença de íons Zn^{2+} e Mg^{2+} no seu sítio. Já a nomenclatura refere-se ao fato de a atividade catalítica dessas enzimas ocorrer em uma faixa de pH superior a 9 (ZIMMERMANN, 2021).

Finalmente, a ecto-5'-nucleotidase, também designada como CD73, do inglês *Cluster of Differentiation 73*, é uma enzima que catalisa a hidrólise de ribo e desoxirribonucleotídeos 5'-monofosfatados, os quais incluem AMP, CMP, IMP e GMP, em seus respectivos nucleosídeos (JUNKER; RENN; DOBELMANN; NAMASIVAYAM *et al.*, 2019). Dentre os produtos de catálise, destaca-se a ADO, oriunda da hidrólise de AMP em adenosina e Pi. Esta glicoproteína é a principal enzima produtora de ADO e, portanto, a principal responsável pela ativação dos

receptores P1(KNAPP; ZEBISCH; PIPPEL; EL-TAYEB *et al.*, 2012). Do ponto de vista estrutural, a CD73 de mamíferos é composta por duas subunidades glicoproteicas unidas por ligações não covalentes e apresenta, em seu domínio N-terminal, regiões de ligação a íons Zn^{2+} e outros íons bivalentes (JEFFREY; LAWSON; POWERS, 2020). Nas células, a ectoenzima encontra-se ancorada à membrana plasmática via molécula de GPI e seu sítio catalítico encontra-se voltado para o meio extracelular (JOSEPH; SHEPARD; KANNARKAT; RUTLEDGE *et al.*, 2008). A análise de comparação de sequências revelou que a CD73 pode ser agrupada na superfamília das metalofosfoesterases que possuem uma gama especificidade de substratos, tais como: fosfoproteínas de Serina/Treonina, vários nucleotídeos e esfingomielina (YEGUTKIN, 2014). Quanto a sua distribuição tecidual, a CD73 é encontrada em uma gama de tecidos, sendo mais expressa no cólon, rins e cérebro e menos abundante no fígado, pulmão e coração (DWYER; KISHORE; ROBSON, 2020). No SNC, essa enzima está presente no córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo. Já no sistema vascular, a CD73 é notadamente expressa no endotélio dos vasos de grande calibre, enquanto no sistema imune essa enzima é expressa em algumas subpopulações de linfócitos (MINOR; ALCEDO; BATTAGLIA; SNIDER, 2019). A expressão dessa enzima também foi descrita em células estromais e algumas células tumorais(CORBELINI; FIGUEIRÓ; DAS NEVES; ANDRADE *et al.*, 2015).

Isso posto, avaliar o perfil de expressão da ectonucleotidases em condições fisiológicas e patológicas torna-se imperativo. De fato, essas enzimas apresentam um controle rebuscado sobre a sinalização purinérgica, e esta, por sua vez, é associada à fisiopatologia de várias doenças, inclusive câncer. Portanto, se tornam importantes alvos terapêuticos.

4.4 IMPLICAÇÕES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO CM

A sinalização purinérgica reticulada à outras redes de transmissores, regula diferentes *hallmarks* do câncer como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e angiogênese (JUNKER; RENN; DOBELMANN; NAMASIVAYAM *et al.*, 2019). O ATP, e.g., promove a proliferação celular ao ativar o receptor metabotrópico P2Y, enquanto a ativação de P2X7 é associada, não apenas a proliferação, como também à sobrevivência tumoral (AVANZATO;

GENOVA; FIORIO PLA; BERNARDINI *et al.*, 2016). Não obstante, esse receptor é altamente expresso no CM (TAN; HAN; ZOU; LUO *et al.*, 2015).

Sabe-se que células tumorais expressam componentes do sistema purinérgico e que uma das características distintivas do câncer é a presença de altas concentrações de ATP e adenosina extracelular no microambiente tumoral (DRAGANOV; GOPALAKRISHNA-PILLAI; CHEN; ZUCKERMAN *et al.*, 2015). No CM, análises de expressão gênica mostraram que células MCF7 e Hs578T expressam predominantemente os transcritos dos receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 (QIU; LIU; LI; ZHANG *et al.*, 2018), e dados pré-clínicos mostraram que a expressão desses receptores está vinculada a processos de invasão e metástase, especialmente o receptor P2Y2 (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). Quanto aos receptores P1, a sinalização mediada pelo receptor A3 também é associada à quimiotaxia e motilidade de células de CM. Como mostrado por Ledderose e colaboradores, 2016, em células de CM MDA-MB-231, os receptores A3 são superexpressos, assim como as ectonucleotidases ENPP1 e CD73, sendo ADO agonista dos receptores A3 (LEDDEROSE; HEFTI; CHEN; BAO *et al.*, 2016). Outro mecanismo purinérgico associado a alta taxa de metástase dessas células, refere-se à indução de hipóxia via ativação de P2Y2 mediada pelo ATP liberado pelas células MDA-MB-231 gerando, desse modo, um microambiente tumoral ou TME favorável à formação de um nicho pré-metastático (EUN; KO; PARK; CHANG *et al.*, 2015). Previamente foi demonstrado que a CD73 é superexpressa em CMTN (ALLARD; TURCOTTE; SPRING; POMMEY *et al.*, 2014), bem como está associada a quimiorresistência em pacientes diagnosticados com esses tumores ao promover a imunossupressão (LOI; POMMEY; HAIBE-KAINS; BEAVIS *et al.*, 2013). Turcotte e colaboradores, 2017, avaliaram o papel da CD73 no CM HERE+ e observaram que a expressão elevada dessa ectonucleotidase correlacionava-se com um aumento significativo na resistência ao trastuzumabe e pior evolução clínica (TURCOTTE; ALLARD; MITTAL; BARECHE *et al.*, 2017). Em outro estudo Ghalamfarsa e colaboradores, 2018, observaram que a hipóxia no microambiente tumoral aumenta as moléculas produtoras de ADO, especialmente a CD73. Essa via promovia a proliferação de células tumorais e desencadeava a produção de fatores angiogênicos, tais como VEGF, IL-6 e bFGF (GHALAMFARSA; RASTEGARI; ATYABI; HASSANNIA *et al.*, 2018).

Adicionalmente, dados de outros pesquisadores indicam que a CD73 favorece tanto a angiogênese quanto a metástase em CM (GAO; DONG; ZHANG, 2014; SOLEIMANI; TAGHIZADEH; SHAHSAVARI; AMINI *et al.*, 2019).

Nesse contexto, mediadores do sistema purinérgico têm-se apresentado como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do câncer, especialmente o CM, o que torna a identificação de compostos que possam modular a resposta purinérgica, de modo a inibir ou minimizar seus efeitos pró-tumorais, essencialmente necessária.

REFERÊNCIAS

- AKRAM, M.; IQBAL, M.; DANIYAL, M.; KHAN, A. U. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, 50, n. 1, p. 1-23, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- AL-RASHIDA, M.; IQBAL, J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. **Mini Rev Med Chem**, 15, n. 1, p. 41-51, 2015. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150219113205>
- ALIMIRZAI, S.; BAGHERZADEH, M.; AKBARI, M. R. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. 95, n. 6, p. 643-660, Jun 2019. <https://doi.org/10.1111/cge.13514>
- ALLARD, B.; TURCOTTE, M.; SPRING, K.; POMMEY, S. *et al.* Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. **Int J Cancer**, 134, n. 6, p. 1466-1473, Mar 15 2014. <https://doi.org/10.1002/ijc.28456>
- ALLURI, P.; NEWMAN, L. A. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives. **Surg Oncol Clin N Am**, 23, n. 3, p. 567-577, Jul 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2014.03.003>
- ALMANSOUR, N. M. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. **Front Mol Biosci**, 9, p. 836417, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.836417>
- ALVAREZ, H. M.; XUE, Y.; ROBINSON, C. D.; CANALIZO-HERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Tetrathiomolybdate inhibits copper trafficking proteins through metal cluster formation. **Science**, 327, n. 5963, p. 331-334, Jan 15 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1179907>
- AMARAVADI, R.; KIMMELMAN, A. C.; WHITE, E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. **Genes Dev**, 30, n. 17, p. 1913-1930, Sep 1 2016. <https://doi.org/10.1101/gad.287524.116>
- ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKÓ, G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Pharmacol Rev**, 71, n. 3, p. 345-382, Jul 2019. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014878>
- ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M. T. Iron and copper metabolism. **Mol Aspects Med**, 26, n. 4-5, p. 313-327, Aug-Oct 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.010>

ATIF, M.; ALSRHANI, A.; NAZ, F.; IMRAN, M. *et al.* Targeting Adenosine Receptors in Neurological Diseases. **Cell Reprogram**, 23, n. 2, p. 57-72, Apr 2021. <https://doi.org/10.1089/cell.2020.0087>

AVANZATO, D.; GENOVA, T.; FIORIO PLA, A.; BERNARDINI, M. *et al.* Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor-derived endothelial cells via cAMP signaling. **Sci Rep**, 6, p. 32602, Sep 2 2016. <https://doi.org/10.1038/srep32602>

BANDO, Y.; KOBAYASHI, T.; MIYAKAMI, Y.; SUMIDA, S. *et al.* Triple-negative breast cancer and basal-like subtype : Pathology and targeted therapy. **J Med Invest**, 68, n. 3.4, p. 213-219, 2021. <https://doi.org/10.2152/jmi.68.213>

BARCHIESI, G.; ROBERTO, M.; VERRICO, M.; VICI, P. *et al.* Emerging role of PARP inhibitors in metastatic triple negative breast cancer. current scenario and future perspectives. **Frontiers in Oncology**, 11, p. 769280, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.769280>

BARECHE, Y.; VENET, D.; IGNATIADIS, M.; AFTIMOS, P. *et al.* Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. **Ann Oncol**, 29, n. 4, p. 895-902, Apr 1 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy024>

BELARDINELLI, L.; SHRYOCK, J. C.; SONG, Y.; WANG, D. *et al.* Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. **Faseb j**, 9, n. 5, p. 359-365, Mar 1995. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.5.7896004>

BHUVANASUNDAR, R.; JOHN, A.; SULOCHANA, K. N.; CORAL, K. *et al.* A molecular model of human Lysyl Oxidase (LOX) with optimal copper orientation in the catalytic cavity for induced fit docking studies with potential modulators. **Bioinformation**, 10, n. 7, p. 406, 2014. <https://doi.org/10.6026/97320630010406>

BI, Y.; TIAN, M.; LE, J.; WANG, L. *et al.* Study on the expression of PAK4 and P54 protein in breast cancer. **World J Surg Oncol**, 14, n. 1, p. 160, Jun 13 2016. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0913-6>

BISWAS, T.; EFIRD, J. T.; PRASAD, S.; JINDAL, C. *et al.* The survival benefit of neoadjuvant chemotherapy and pCR among patients with advanced stage triple negative breast cancer. **Oncotarget**, 8, n. 68, p. 112712, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22521>

BLOCKHUYS, S.; CELAURO, E.; HILDESJÖ, C.; FEIZI, A. *et al.* Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. **Metallomics**, 9, n. 2, p. 112-123, Feb 22 2017. <https://doi.org/10.1039/C6MT00202A>

BOLOS, C. A.; PAPAISIS, K. T.; KORTSARIS, A. H.; VOYATZI, S. *et al.* Antiproliferative activity of mixed-ligand dien-Cu(II) complexes with thiazole, thiazoline and imidazole derivatives. **J Inorg Biochem**, 88, n. 1, p. 25-36, Jan 1 2002. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00344-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00344-0)

BOREA, P. A.; GESSI, S.; MERIGHI, S.; VINCENZI, F. *et al.* Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiol Rev**, 98, n. 3, p. 1591-1625, Jul 1 2018. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>

BORRI, F.; GRANAGLIA, A. Pathology of triple negative breast cancer. **Semin Cancer Biol**, 72, p. 136-145, Jul 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.005>

BORZA, R.; SALGADO-POLO, F.; MOOLENAAR, W. H.; PERRAKIS, A. Structure and function of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP) family: Tidying up diversity. **J Biol Chem**, 298, n. 2, p. 101526, Feb 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101526>

BOSSAK, K.; DREW, S. C.; STEFANIAK, E.; PŁONKA, D. *et al.* The Cu(II) affinity of the N-terminus of human copper transporter CTR1: Comparison of human and mouse sequences. **J Inorg Biochem**, 182, p. 230-237, May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.01.011>

BOU ZERDAN, M.; GHORAYEB, T.; SALIBA, F.; ALLAM, S. *et al.* Triple Negative Breast Cancer: Updates on Classification and Treatment in 2021. 14, n. 5, Feb 28 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14051253>

BRADY, D. C.; CROWE, M. S.; TURSKI, M. L.; HOBBS, G. A. *et al.* Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. **Nature**, 509, n. 7501, p. 492-496, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13180>

BREWER, H. R.; JONES, M. E.; SCHOEMAKER, M. J.; ASHWORTH, A. *et al.* Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Res Treat**, 165, n. 1, p. 193-200, Aug 2017. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2>

BROWN, G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. **Int J Mol Sci**, 22, n. 18, Sep 7 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22189667>

BUKI, L. P.; JAMISON, J.; ANDERSON, C. J.; CUADRA, A. M. Differences in predictors of cervical and breast cancer screening by screening need in uninsured Latino women. **Cancer**, 110, n. 7, p. 1578-1585, Oct 1 2007. <https://doi.org/10.1002/cncr.22929>

BURGUIN, A.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. **J Pers Med**, 11, n. 8, Aug 19 2021. <https://doi.org/10.3390/jpm11080808>

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev**, 24, n. 3, p. 509-581, Sep 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. **J Theor Biol**, 62, n. 2, p. 491-503, Oct 21 1976. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in endocrine organs. **Purinergic Signal**, 10, n. 1, p. 189-231, Mar 2014. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9396-x>

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. **Circ Res**, 120, n. 1, p. 207-228, Jan 6 2017. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>

BURNSTOCK, G. Introduction to Purinergic Signaling. **Methods Mol Biol**, 2041, p. 1-15, 2020. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1

BURNSTOCK, G.; ARNETT, T. R.; ORRISS, I. R. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. **Purinergic Signal**, 9, n. 4, p. 541-572, Dec 2013. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9381-4>

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Purinergic signaling. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, 1, n. 2, p. 116-125, 2012. <https://doi.org/10.1002/wmts.14>

CAO, L.; NIU, Y. Triple negative breast cancer: special histological types and emerging therapeutic methods. **Cancer biology & medicine**, 17, n. 2, p. 293, 2020. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0465>

CARLSSON, A.; HILLARP, N. A. Release of adenosine triphosphate along with adrenaline and noradrenaline following stimulation of the adrenal medulla. **Acta Physiol Scand**, 37, n. 2-3, p. 235-239, Sep 26 1956. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1956.tb01359.x>

CATER, M. A.; HAUPT, Y. Clioquinol induces cytoplasmic clearance of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP): therapeutic indication for prostate cancer. **Biochem J**, 436, n. 2, p. 481-491, Jun 1 2011. <https://doi.org/10.1042/BJ20110123>

CHEN, F. P.; CHIEN, M. H. Phytoestrogens induce differential effects on both normal and malignant human breast cells in vitro. **Climacteric**, 17, n. 6, p. 682-691, Dec 2014. <https://doi.org/10.3109/13697137.2014.937688>

CHEN, J.; JIANG, Y.; SHI, H.; PENG, Y. *et al.* The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. **Pflugers Arch**, 472, n. 10, p. 1415-1429, Oct 2020. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02412-2>

CHEN, L.; MIN, J.; WANG, F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. **Signal Transduct Target Ther**, 7, n. 1, p. 378, Nov 23 2022. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01229-y>

CHEN, R.; LIU, C. S.; ZHANG, H.; GUO, Y. *et al.* Three new Cu(II) and Cd(II) complexes with 3-(2-pyridyl)pyrazole-based ligand: syntheses, crystal structures, and evaluations for bioactivities. **J Inorg Biochem**, 101, n. 3, p. 412-421, Mar 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.11.001>

CHUE, B. M.; LA COURSE, B. D. Case report of long-term survival with metastatic triple-negative breast carcinoma: Treatment possibilities for metastatic disease. **Medicine (Baltimore)**, 98, n. 16, p. e15302, Apr 2019. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015302>

CHUNG, A. W.; ANAND, K.; ANSELME, A. C.; CHAN, A. A. *et al.* A phase 1/2 clinical trial of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA and taxane for treating chemoresistant triple-negative breast cancer. **Science translational medicine**, 13, n. 624, p. eabj5070, 2021. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj5070>

CIUCIULETE, A. R.; STEPAN, A. E.; BADIU, A. M.; ANDREIANA, B. C. *et al.* E-cadherin, fibronectin and Slug immunoexpression in non-melanoma skin cancers. **Rom J Morphol Embryol**, 62, n. 3, p. 705-712, Jul-Sep 2021. <https://doi.org/10.47162/RJME.62.3.07>

COBINE, P. A.; BRADY, D. C. Cuproptosis: Cellular and molecular mechanisms underlying copper-induced cell death. **Mol Cell**, 82, n. 10, p. 1786-1787, May 19 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.001>

CORBELINI, P. F.; FIGUEIRÓ, F.; DAS NEVES, G. M.; ANDRADE, S. *et al.* Insights into Ecto-5'-Nucleotidase as a New Target for Cancer Therapy: A Medicinal Chemistry Study. **Curr Med Chem**, 22, n. 15, p. 1776 - 1792, May 4 2015. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150408112615>

CORRADINI, A. G.; CREMONINI, A.; CATTANI, M. G.; CUCCHI, M. C. *et al.* Which type of cancer is detected in breast screening programs? Review of the literature with focus on the most frequent histological features. **Pathologica**, 113, n. 2, p. 85-94, Apr 2021. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-123>

COSENTINO, K.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. MIM through MOM: the awakening of Bax and Bak pores. **Embo j**, 37, n. 17, Sep 3 2018. <https://doi.org/10.15252/embo.2018100340>

COUGHLIN, S. S. Epidemiology of Breast Cancer in Women. **Adv Exp Med Biol**, 1152, p. 9-29, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_2

CRONSTEIN, B. N.; SITKOVSKY, M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, 13, n. 1, p. 41-51, Jan 2017. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.178>

CROWE, A.; JACKAMAN, C.; BEDDOES, K. M.; RICCIARDO, B. *et al.* Rapid copper acquisition by developing murine mesothelioma: decreasing bioavailable copper slows tumor growth, normalizes vessels and promotes T cell infiltration. **PLoS One**, 8, n. 8, p. e73684, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073684>

CZŁONKOWSKA, A.; LITWIN, T.; DUSEK, P.; FERENCI, P. *et al.* Wilson disease. **Nat Rev Dis Primers**, 4, n. 1, p. 21, Sep 6 2018. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, 740, p. 364-378, Oct 5 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DAVIS, C. D.; NEWMAN, S. Inadequate dietary copper increases tumorigenesis in the Min mouse. **Cancer letters**, 159, n. 1, p. 57-62, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00531-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00531-0)

DE CICCIO, P.; CATANI, M. V.; GASPERI, V.; SIBILANO, M. *et al.* Nutrition and Breast Cancer: A Literature Review on Prevention, Treatment and Recurrence. **Nutrients**, 11, n. 7, Jul 3 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11071514>

DE LUCA, A.; BARILE, A.; ARCIELLO, M.; ROSSI, L. Copper homeostasis as target of both consolidated and innovative strategies of anti-tumor therapy. **J Trace Elem Med Biol**, 55, p. 204-213, Sep 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.008>

DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Chapter 14 - Metabolism of Cell Growth and Proliferation. *In*: MENDELSON, J.; HOWLEY, P. M., *et al* (Ed.). **The Molecular Basis of Cancer (Third Edition)**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2008. p. 189-203. <https://doi.org/10.1016/B978-141603703-3.10014-7>

DENOYER, D.; CLATWORTHY, S. A. S.; CATER, M. A. Copper Complexes in Cancer Therapy. **Met Ions Life Sci**, 18, Feb 5 2018. <https://doi.org/10.1515/9783110470734-016>

DENOYER, D.; MASALDAN, S.; LA FONTAINE, S.; CATER, M. A. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. **Metallomics**, 7, n. 11, p. 1459-1476, Nov 2015. <https://doi.org/10.1039/C5MT00149H>

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, 36, n. 3, p. 293-303, Jan 19 2017. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>

DI VIRGILIO, F.; SARTI, A. C.; FALZONI, S.; DE MARCHI, E. *et al.* Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**, 18, n. 10, p. 601-618, Oct 2018. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>

DIECI, M. V.; DEL MASTRO, L.; CINQUINI, M.; MONTEMURRO, F. *et al.* Inclusion of platinum agents in neoadjuvant chemotherapy regimens for triple-negative breast cancer patients: development of GRADE (Grades of Recommendation, Assessment, Development and Evaluation) recommendation by the Italian Association of Medical Oncology (AIOM). **Cancers**, 11, n. 8, p. 1137, 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11081137>

DOU, L.; CHEN, Y. F.; COWAN, P. J.; CHEN, X. P. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. **Clin Immunol**, 188, p. 67-73, Mar 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.12.006>

DRAGANOV, D.; GOPALAKRISHNA-PILLAI, S.; CHEN, Y. R.; ZUCKERMAN, N. *et al.* Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. **Sci Rep**, 5, p. 16222, Nov 10 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16222>

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol**, 68, n. 3, p. 213-237, Nov 25 1929. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>

DWYER, K. M.; KISHORE, B. K.; ROBSON, S. C. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease. **Nat Rev Nephrol**, 16, n. 9, p. 509-524, Sep 2020. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0304-7>

EKINCI, E.; ROHONDIA, S.; KHAN, R.; DOU, Q. P. Repurposing Disulfiram as An Anti-Cancer Agent: Updated Review on Literature and Patents. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, 14, n. 2, p. 113-132, 2019. <https://doi.org/10.2174/1574892814666190514104035>

ERB, L.; WEISMAN, G. A. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. **Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal**, 1, n. 6, p. 789-803, Nov-Dec 2012. <https://doi.org/10.1002/wmts.62>

ERB, L.; WOODS, L. T.; KHALAFALLA, M. G.; WEISMAN, G. A. Purinergic signaling in Alzheimer's disease. **Brain Res Bull**, 151, p. 25-37, Sep 2019. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.014>

ESPINEL, W.; CHAMPINE, M.; HAMPEL, H.; JETER, J. *et al.* Clinical Impact of Pathogenic Variants in DNA Damage Repair Genes beyond BRCA1 and BRCA2 in Breast and Ovarian Cancer Patients. **Cancers (Basel)**, 14, n. 10, May 13 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14102426>

EUN, S. Y.; KO, Y. S.; PARK, S. W.; CHANG, K. C. *et al.* P2Y2 nucleotide receptor-mediated extracellular signal-regulated kinases and protein kinase C activation induces the invasion of highly metastatic breast cancer cells. **Oncol Rep**, 34, n. 1, p. 195-202, Jul 2015. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3972>

FANTL, P.; WARD, H. A. Nucleotides of human blood platelets. **Biochem J**, 64, n. 4, p. 747-754, Dec 1956. <https://doi.org/10.1042/bj0640747>

FERRARI, D.; LA SALA, A.; MILANI, D.; CELEGHINI, C. *et al.* Purinergic Signaling in Controlling Macrophage and T Cell Functions During Atherosclerosis Development. **Front Immunol**, 11, p. 617804, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617804>

FOUGNER, C.; BERGHOLTZ, H.; NORUM, J. H.; SØRLIE, T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 1787, Apr 14 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15574-5>

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med**, 363, n. 20, p. 1938-1948, Nov 11 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1001389>

FRANCIOSI, M. L. M.; DO CARMO, T. I. T.; ZANINI, D.; CARDOSO, A. M. Inflammatory profile in cervical cancer: influence of purinergic signaling and possible therapeutic targets. **Inflamm Res**, 71, n. 5-6, p. 555-564, Jun 2022. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01560-8>

FU, N. Y.; NOLAN, E.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development. **Physiological reviews**, 100, n. 2, p. 489-523, 2020. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2018>

GAŁCZYŃSKA, K.; DRULIS-KAWA, Z.; ARABSKI, M. Antitumor Activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) Complexes. **Molecules**, 25, n. 15, Jul 31 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25153492>

GAO, Z. W.; DONG, K.; ZHANG, H. Z. The roles of CD73 in cancer. **Biomed Res Int**, 2014, p. 460654, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/460654>

GARAYCOECHEA, J. I.; CROSSAN, G. P.; LANGEVIN, F.; MULDERRIG, L. *et al.* Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells. **Nature**, 553, n. 7687, p. 171-177, 2018. <https://doi.org/10.1038/nature25154>

GARBER, K. Cancer's copper connections. : American Association for the Advancement of Science 2015. <https://doi.org/10.1126/science.349.6244.129>

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, 482, n. 3, p. 419-425, Jan 15 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

GÉRARD, C.; BORDELEAU, L.-J.; BARRALET, J.; DOILLON, C. J. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. **Biomaterials**, 31, n. 5, p. 824-831, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.009>

GEYER, F. C.; PAREJA, F.; WEIGELT, B.; RAKHA, E. *et al.* The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. **Am J Pathol**, 187, n. 10, p. 2139-2151, Oct 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.016>

GHALAMFARSA, G.; RASTEGARI, A.; ATYABI, F.; HASSANNIA, H. *et al.* Anti-angiogenic effects of CD73-specific siRNA-loaded nanoparticles in breast cancer-bearing mice. **J Cell Physiol**, 233, n. 10, p. 7165-7177, Oct 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.26743>

GIULIANI, A. L.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. **Immunol Lett**, 205, p. 16-24, Jan 2019. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.006>

GIULIANI, A. L.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. **Front Pharmacol**, 11, p. 619458, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.619458>

GOMPEL, A. [Hormone and breast cancer]. **Presse Med**, 48, n. 10, p. 1085-1091, Oct 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.09.021>

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Alkaline Phosphatase. **Cold Spring Harb Protoc**, 2020, n. 8, p. 100768, Aug 3 2020. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100768>

GRKOVIĆ, I.; MITROVIĆ, N.; DRAGIĆ, M. Ectonucleotidases in the hippocampus: Spatial distribution and expression after ovariectomy and estradiol replacement. **Vitam Horm**, 118, p. 199-221, 2022. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2021.11.005>

GROUP, E. B. C. T. C. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **The Lancet**, 365, n. 9472, p. 1687-1717, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)

GUO, R.; LU, G.; QIN, B.; FEI, B. Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection and Management: A Review. **Ultrasound Med Biol**, 44, n. 1, p. 37-70, Jan 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.09.012>

GUPTE, A.; MUMPER, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. **Cancer Treat Rev**, 35, n. 1, p. 32-46, Feb 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>

GUTERRES, A. N.; VILLANUEVA, J. Targeting telomerase for cancer therapy. **Oncogene**, 39, n. 36, p. 5811-5824, Sep 2020. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01405-w>

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, 12, n. 1, p. 31-46, Jan 2022. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HAO, Y. N.; ZHANG, W. X.; GAO, Y. R.; WEI, Y. N. *et al.* State-of-the-art advances of copper-based nanostructures in the enhancement of chemodynamic therapy. **J Mater Chem B**, 9, n. 2, p. 250-266, Jan 14 2021. <https://doi.org/10.1039/D0TB02360D>

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clin Anat**, 26, n. 1, p. 29-48, Jan 2013. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>

HAUSMANN, J.; PERRAKIS, A.; MOOLENAAR, W. H. Structure-function relationships of autotaxin, a secreted lysophospholipase D. **Adv Biol Regul**, 53, n. 1, p. 112-117, Jan 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.09.010>

HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. **J Physiol**, 145, n. 3, p. 494-504, Mar 12 1959. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006157>

HONEY, R. M.; RITCHIE, W. T.; THOMSON, W. A. R. The Action of Adenosine Upon the Human Heart. **QJM: An International Journal of Medicine**, os-23, n. 92, p. 485-489, 1930. <https://doi.org/10.1093/qjmed/os-23.92.485>

HUANG, M.; O'SHAUGHNESSY, J.; ZHAO, J.; HAIDERALI, A. *et al.* Association of Pathologic Complete Response with Long-Term Survival Outcomes in Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis Association of pCR with Survival Outcomes in TNBC. **Cancer Research**, 80, n. 24, p. 5427-5434, 2020. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1792>

HUANG, Z.; XIE, N.; ILLES, P.; DI VIRGILIO, F. *et al.* From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduct Target Ther**, 6, n. 1, p. 162, Apr 28 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

HURVITZ, S. A.; MARTIN, M.; SYMMANS, W. F.; JUNG, K. H. *et al.* Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. **Lancet Oncol**, 19, n. 1, p. 115-126, Jan 2018. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30716-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30716-7)

INCA. **Câncer de mama**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>. Acesso em: 03/01/2023.

INCA. **ESTIMATIVA: INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 03/01/2023.

INOUE-CHOI, M.; SINHA, R.; GIERACH, G. L.; WARD, M. H. Red and processed meat, nitrite, and heme iron intakes and postmenopausal breast cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Int J Cancer**, 138, n. 7, p. 1609-1618, Apr 1 2016. <https://doi.org/10.1002/ijc.29901>

ISAKOFF, S. J.; MAYER, E. L.; HE, L.; TRAINA, T. A. *et al.* TBCRC009: a multicenter phase II clinical trial of platinum monotherapy with biomarker assessment in metastatic triple-negative breast cancer. **Journal of clinical oncology**, 33, n. 17, p. 1902, 2015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.6660>

ISHIDA, S.; ANDREUX, P.; POITRY-YAMATE, C.; AUWERX, J. *et al.* Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 48, p. 19507-19512, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318431110>

JAFARI, S. H.; SAADATPOUR, Z.; SALMANINEJAD, A.; MOMENI, F. *et al.* Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. 233, n. 7, p. 5200-5213, Jul 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.26379>

JEFFREY, J. L.; LAWSON, K. V.; POWERS, J. P. Targeting Metabolism of Extracellular Nucleotides via Inhibition of Ectonucleotidases CD73 and CD39. **J Med Chem**, 63, n. 22, p. 13444-13465, Nov 25 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01044>

JIANG, H.; LI, H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, 21, n. 1, p. 149, Feb 10 2021. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07860-2>

JIANG, Z. G.; WU, Y.; CSIZMADIA, E.; FELDBRÜGGE, L. *et al.* Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. **Purinergic Signal**, 10, n. 4, p. 611-618, Dec 2014. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9423-6>

JOHNSON, M. C. Anatomy and Physiology of the Breast. *In*: JATOI, I. e KAUFMANN, M. (Ed.). **Management of Breast Diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1-36. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69743-5_1

JONES, S. B.; THOMAS, G. A.; HESSELSWEET, S. D.; ALVAREZ-REEVES, M. *et al.* Effect of exercise on markers of inflammation in breast cancer survivors: the Yale exercise and survivorship study. **Cancer Prev Res (Phila)**, 6, n. 2, p. 109-118, Feb 2013. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0278>

JOSEPH, R. A.; SHEPARD, B. D.; KANNARKAT, G. T.; RUTLEDGE, T. M. *et al.* Microtubule acetylation and stability may explain alcohol-induced alterations in hepatic protein trafficking. **Hepatology**, 47, n. 5, p. 1745-1753, May 2008. <https://doi.org/10.1002/hep.22014>

JUNKER, A.; RENN, C.; DOBELMANN, C.; NAMASIVAYAM, V. *et al.* Structure-Activity Relationship of Purine and Pyrimidine Nucleotides as Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. **J Med Chem**, 62, n. 7, p. 3677-3695, Apr 11 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00164>

KANAYA, N.; ADAMS, L.; TAKASAKI, A.; CHEN, S. Whole blueberry powder inhibits metastasis of triple negative breast cancer in a xenograft mouse model through modulation of inflammatory cytokines. **Nutr Cancer**, 66, n. 2, p. 242-248, 2014. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.863366>

KASHYAP, D.; PAL, D.; SHARMA, R.; GARG, V. K. *et al.* Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **Biomed Res Int**, 2022, p. 9605439, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>

KASTENHUBER, E. R.; LOWE, S. W. Putting p53 in Context. **Cell**, 170, n. 6, p. 1062-1078, Sep 7 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>

KATHAWALA, M.; HIRSCHFIELD, G. M. Insights into the management of Wilson's disease. **Therap Adv Gastroenterol**, 10, n. 11, p. 889-905, Nov 2017. <https://doi.org/10.1177/1756283X17731520>

KAUR, R. P.; VASUDEVA, K.; KUMAR, R.; MUNSHI, A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. **Curr Pharm Des**, 24, n. 30, p. 3566-3575, 2018. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180926095709>

KEY, T.; APPLEBY, P.; REEVES, G.; RODDAM, A. *et al.* Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. **British journal of cancer**, 105, n. 5, p. 709-722, 2011. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.254>

KHAIRULLINA, A.; TSARDAKAS RENHULDT, N.; WIESENBERGER, G.; BENTZER, J. *et al.* Identification and Functional Characterisation of Two Oat UDP-Glucosyltransferases Involved in Deoxynivalenol Detoxification. **Toxins (Basel)**, 14, n. 7, Jun 30 2022. <https://doi.org/10.3390/toxins14070446>

KIDANE, T. Z.; FARHAD, R.; LEE, K. J.; SANTOS, A. *et al.* Uptake of copper from plasma proteins in cells where expression of CTR1 has been modulated. **Biometals**, 25, n. 4, p. 697-709, Aug 2012. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9528-8>

KIM, K. K.; ABELMAN, S.; YANO, N.; RIBEIRO, J. R. *et al.* Tetrathiomolybdate inhibits mitochondrial complex IV and mediates degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer cells. **Sci Rep**, 5, p. 14296, Oct 15 2015. <https://doi.org/10.1038/srep14296>

KISHORE, B. K.; ROBSON, S. C.; DWYER, K. M. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics. **Purinergic Signal**, 14, n. 2, p. 109-120, Jun 2018. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9596-x>

KNAPP, K.; ZEBISCH, M.; PIPPEL, J.; EL-TAYEB, A. *et al.* Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. **Structure**, 20, n. 12, p. 2161-2173, Dec 5 2012. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.10.001>

KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signal**, 7, n. 1, p. 21-45, Mar 2011. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9214-7>

KOMORI, T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. **Int J Mol Sci**, 17, n. 12, Dec 6 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17122045>

KORDE, L. A.; SOMERFIELD, M. R.; CAREY, L. A.; CREWS, J. R. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy, endocrine therapy, and targeted therapy for breast cancer: ASCO guideline. **Journal of Clinical Oncology**, 39, n. 13, p. 1485-1505, 2021. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03399>

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; SÉVIGNY, J. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. **Adv Pharmacol**, 61, p. 263-299, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00009-6>

LAWS, K.; BINEVA-TODD, G.; ESKANDARI, A.; LU, C. *et al.* A Copper(II) Phenanthroline Metallopeptide That Targets and Disrupts Mitochondrial Function in Breast Cancer Stem Cells. **Angew Chem Int Ed Engl**, 57, n. 1, p. 287-291, Jan 2 2018. <https://doi.org/10.1002/anie.201710910>

LEBERT, J.; LESTER, R.; POWELL, E.; SEAL, M. *et al.* Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. **Current oncology**, 25, n. s1, p. 142-150, 2018. <https://doi.org/10.3747/co.25.3954>

LEDDEROSE, C.; HEFTI, M. M.; CHEN, Y.; BAO, Y. *et al.* Adenosine arrests breast cancer cell motility by A3 receptor stimulation. **Purinergic Signal**, 12, n. 4, p. 673-685, Dec 2016. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9531-6>

LEE, E. Y.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2, n. 10, p. a003236, Oct 2010. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>

LEE, J. S.; YOST, S. E.; YUAN, Y. Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: recent progresses and challenges. **Cancers**, 12, n. 6, p. 1404, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12061404>

LEE, K.; KRUPER, L.; DIELI-CONWRIGHT, C. M.; MORTIMER, J. E. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Curr Oncol Rep**, 21, n. 5, p. 41, Mar 27 2019. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0787-1>

LEE, Z. Y.; LEONG, C. H.; LIM, K. U. L.; WONG, C. C. S. *et al.* Induction of Apoptosis and Autophagy by Ternary Copper Complex Towards Breast Cancer Cells. **Anticancer Agents Med Chem**, 22, n. 6, p. 1159-1170, 2022. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210726132543>

LEHMANN, B. D.; BAUER, J. A.; CHEN, X.; SANDERS, M. E. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for

selection of targeted therapies. **J Clin Invest**, 121, n. 7, p. 2750-2767, Jul 2011. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>

LELIÈVRE, P.; SANCEY, L.; COLL, J. L.; DENIAUD, A. *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 (Basel)**, 12, n. 12, Dec 1 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12123594>

LI, D. D.; YAGÜE, E.; WANG, L. Y.; DAI, L. L. *et al.* Novel Copper Complexes That Inhibit the Proteasome and Trigger Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells. **ACS Med Chem Lett**, 10, n. 9, p. 1328-1335, Sep 12 2019. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00284>

LI, J.; EU, J. Q.; KONG, L. R.; WANG, L. *et al.* Targeting Metabolism in Cancer Cells and the Tumour Microenvironment for Cancer Therapy. **Molecules**, 25, n. 20, Oct 20 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25204831>

LI, Q.; LI, Q.; ZHANG, P.; YUAN, P. *et al.* A phase II study of capecitabine plus cisplatin in metastatic triple-negative breast cancer patients pretreated with anthracyclines and taxanes. **Cancer Biology & Therapy**, 16, n. 12, p. 1746-1753, 2015. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1095400>

LI, X.; SHAO, C.; SHI, Y.; HAN, W. Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **J Hematol Oncol**, 11, n. 1, p. 31, Feb 27 2018. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0578-4>

LI, Y. Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment. **IUBMB Life**, 72, n. 9, p. 1900-1908, Sep 2020. <https://doi.org/10.1002/iub.2341>

LI, Y.; LIU, B.; SHI, H.; WANG, Y. *et al.* Metal complexes against breast cancer stem cells. **Dalton Trans**, 50, n. 41, p. 14498-14512, Oct 26 2021. <https://doi.org/10.1039/D1DT02909F>

LI, Y. Q.; CHEN, J.; YIN, J. Y.; LIU, Z. Q. *et al.* Gene expression and single nucleotide polymorphism of ATP7B are associated with platinum-based chemotherapy response in non-small cell lung cancer patients. **J Cancer**, 9, n. 19, p. 3532-3539, 2018. <https://doi.org/10.7150/jca.26286>

LI, Z.; WEI, H.; LI, S.; WU, P. *et al.* The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Drug Des Devel Ther**, 16, p. 305-314, 2022. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S336643>

LI, Z.; ZHANG, X.; HOU, C.; ZHOU, Y. *et al.* Comprehensive identification and characterization of somatic copy number alterations in triple-negative breast

cancer. **Int J Oncol**, 56, n. 2, p. 522-530, Feb 2020.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4950>

LIAO, H. Y.; ZHANG, W. W.; SUN, J. Y.; LI, F. Y. *et al.* The Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Different Histological Subtypes in Triple-negative Breast Cancer. **J Cancer**, 9, n. 2, p. 296-303, 2018.
<https://doi.org/10.7150/jca.22280>

LINDNER, F.; RIGLER, R. über die Beeinflussung der Weite der Herzkranzgefäße durch Produkte des Zellkernstoffwechsels. **Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, 226, n. 1, p. 697-708, 1931/12/01 1931. <https://doi.org/10.1007/BF01751608>

LIU, Y.; NGUYEN, N.; COLDITZ, G. A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. **Women's health**, 11, n. 1, p. 65-77, 2015.
<https://doi.org/10.2217/WHE.14.62>

LIU, Z. H.; YANG, C. X.; ZHANG, L.; YANG, C. Y. *et al.* Baicalein, as a Prooxidant, Triggers Mitochondrial Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Through Mobilization of Intracellular Copper and Reactive Oxygen Species Generation. **Onco Targets Ther**, 12, p. 10749-10761, 2019.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S222819>

LOI, S.; POMMEY, S.; HAIBE-KAINS, B.; BEAVIS, P. A. *et al.* CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 27, p. 11091-11096, Jul 2 2013.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1222251110>

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**, 153, n. 6, p. 1194-1217, Jun 6 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

LOPEZ, J.; RAMCHANDANI, D.; VAHDAT, L. Copper Depletion as a Therapeutic Strategy in Cancer. **Met Ions Life Sci**, 19, Jan 14 2019.
<https://doi.org/10.1515/9783110527872-012>

ŁUKASIEWICZ, S.; CZECZELEWSKI, M.; FORMA, A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. 13, n. 17, Aug 25 2021.
<https://doi.org/10.3390/cancers13174287>

LUO, C.; WANG, P.; HE, S.; ZHU, J. *et al.* Progress and Prospect of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. **Front Oncol**, 12, p. 919072, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.919072>

MACDONALD, G.; NALVARTE, I.; SMIRNOVA, T.; VECCHI, M. *et al.* Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis. **Sci Signal**, 7, n. 329, p. ra56, Jun 10 2014. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004870>

MACKENZIE, N. C.; HUESA, C.; RUTSCH, F.; MACRAE, V. E. New insights into NPP1 function: lessons from clinical and animal studies. **Bone**, 51, n. 5, p. 961-968, Nov 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.07.014>

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAEE, K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors - clinical perspectives. **Cell Oncol (Dordr)**, 44, n. 4, p. 715-737, Aug 2021. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00602-3>

MAMMOTO, T.; JIANG, A.; JIANG, E.; PANIGRAHY, D. *et al.* Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. **Am J Pathol**, 183, n. 4, p. 1293-1305, Oct 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.026>

MARIEB, E. N. **Anatomia humana**. 7^a ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014.

MCEWAN, T. B.; SOPHOCLEOUS, R. A.; CUTHBERTSON, P.; MANSFIELD, K. J. *et al.* Autocrine regulation of wound healing by ATP release and P2Y(2) receptor activation. **Life Sci**, 283, p. 119850, Oct 15 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119850>

MEIRSON, T.; GIL-HENN, H.; SAMSON, A. O. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. **Oncogene**, 39, n. 9, p. 2024-2026, Feb 2020. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1110-1>

MELINCOVICI, C. S.; BOŞCA, A. B.; ŞUŞMAN, S.; MĂRGINEAN, M. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. **Rom J Morphol Embryol**, 59, n. 2, p. 455-467, 2018.

MENDONSA, A. M.; NA, T. Y.; GUMBINER, B. M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. **Oncogene**, 37, n. 35, p. 4769-4780, Aug 2018. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>

MENZIES, R. I.; TAM, F. W.; UNWIN, R. J.; BAILEY, M. A. Purinergic signaling in kidney disease. **Kidney Int**, 91, n. 2, p. 315-323, Feb 2017. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.029>

MERINO BONILLA, J. A.; TORRES TABANERA, M.; ROS MENDOZA, L. H. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. **Radiologia**, 59, n. 5, p. 368-379, Sep-Oct 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rxeng.2017.08.001>

MIGOCKA, M. Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. **IUBMB Life**, 67, n. 10, p. 737-745, Oct 2015. <https://doi.org/10.1002/iub.1437>

MILOSEVIC, M.; JANKOVIC, D.; MILENKOVIC, A.; STOJANOV, D. Early diagnosis and detection of breast cancer. **Technol Health Care**, 26, n. 4, p. 729-759, 2018. <https://doi.org/10.3233/THC-181277>

MINOR, M.; ALCEDO, K. P.; BATTAGLIA, R. A.; SNIDER, N. T. Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Am J Physiol Cell Physiol**, 317, n. 6, p. C1079-c1092, Dec 1 2019. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2019>

MIURA, K.; KINOUCHI, M.; ISHIDA, K.; FUJIBUCHI, W. *et al.* 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. **Cancers (Basel)**, 2, n. 3, p. 1717-1730, Sep 17 2010. <https://doi.org/10.3390/cancers2031717>

MOESTA, A. K.; LI, X. Y.; SMYTH, M. J. Targeting CD39 in cancer. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 12, p. 739-755, Dec 2020. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0376-4>

MONDAL, S.; ADHIKARI, N.; BANERJEE, S.; AMIN, S. A. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. **Eur J Med Chem**, 194, p. 112260, May 15 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112260>

MORE, G. S.; THOMAS, A. B.; CHITLANGE, S. S.; NANDA, R. K. *et al.* Nitrogen mustards as alkylating agents: a review on chemistry, mechanism of action and current USFDA status of drugs. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, 19, n. 9, p. 1080-1102, 2019. <https://doi.org/10.2174/1871520619666190305141458>

MORIGUCHI, M.; NAKAJIMA, T.; KIMURA, H.; WATANABE, T. *et al.* The copper chelator trientine has an antiangiogenic effect against hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of interleukin-8 production. **Int J Cancer**, 102, n. 5, p. 445-452, Dec 10 2002. <https://doi.org/10.1002/ijc.10740>

MORRONE, F. B.; JACQUES-SILVA, M. C.; HORN, A. P.; BERNARDI, A. *et al.* Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. **J Neurooncol**, 64, n. 3, p. 211-218, Sep 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1025699932270>

MOYER, V. A. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. **Ann Intern Med**, 160, n. 4, p. 271-281, Feb 18 2014. <https://doi.org/10.7326/M13-2747>

MUSUMECI, G.; CASTROGIOVANNI, P.; SZYCHLINSKA, M. A.; AIELLO, F. C. *et al.* Mammary gland: From embryogenesis to adult life. **Acta Histochem**, 117, n. 4-5, p. 379-385, May-Jun 2015. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.013>

MUTAFOVA-YAMBOLIEVA, V. N.; DURNIN, L. The purinergic neurotransmitter revisited: a single substance or multiple players? **Pharmacol Ther**, 144, n. 2, p. 162-191, Nov 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.012>

NAKATSUKASA, K.; KOYAMA, H.; OOUCHI, Y.; IMANISHI, S. *et al.* Docetaxel and cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative primary breast cancer. **Breast Cancer**, 24, n. 1, p. 63-68, Jan 2017. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0666-7>

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. **Semin Cancer Biol**, 15, n. 5, p. 342-352, Oct 2005. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.001>

NELSON, K. L.; VORUGANTI, V. S. Purine metabolites and complex diseases: role of genes and nutrients. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 24, n. 4, p. 296-302, Jul 1 2021. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000764>

NG, C. H.; KONG, S. M.; TIONG, Y. L.; MAAH, M. J. *et al.* Selective anticancer copper(II)-mixed ligand complexes: targeting of ROS and proteasomes. **Metallomics**, 6, n. 4, p. 892-906, Apr 2014. <https://doi.org/10.1039/C3MT00276D>

NGAMCHUEA, K.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; COMPTON, R. G. The Copper(II)-Catalyzed Oxidation of Glutathione. **Chemistry**, 22, n. 44, p. 15937-15944, Oct 24 2016. <https://doi.org/10.1002/chem.201603366>

NORTH, R. A. P2X receptors. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 371, n. 1700, Aug 5 2016. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0427>

NORTHFELT, D. W.; ALLRED, J. B.; LIU, H.; HOBDA, T. J. *et al.* Phase 2 trial of paclitaxel polyglumex with capecitabine for metastatic breast cancer. **American journal of clinical oncology**, 37, n. 2, p. 167, 2014. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e31826e0550>

O'SHAUGHNESSY, J. A.; KAUFMANN, M.; SIEDENTOPF, F.; DALIVOUST, P. *et al.* Capecitabine monotherapy: review of studies in first-line HER-2-negative metastatic breast cancer. **The oncologist**, 17, n. 4, p. 476-484, 2012. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0281>

OLIVERI, V. Selective Targeting of Cancer Cells by Copper Ionophores: An Overview. **Front Mol Biosci**, 9, p. 841814, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.841814>

ONO, M.; TSUDA, H.; SHIMIZU, C.; YAMAMOTO, S. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 132, n. 3, p. 793-805, Apr 2012. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1554-7>

ONYEDIBE, K. I.; WANG, M.; SINTIM, H. O. ENPP1, an Old Enzyme with New Functions, and Small Molecule Inhibitors-A STING in the Tale of ENPP1. **Molecules**, 24, n. 22, Nov 19 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24224192>

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Trans**, 47, n. 19, p. 6645-6653, May 15 2018. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>

PAES-VIEIRA, L.; GOMES-VIEIRA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R. E-NTPDases: Possible Roles on Host-Parasite Interactions and Therapeutic Opportunities. **Front Cell Infect Microbiol**, 11, p. 769922, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.769922>

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

PARK, J. H.; PYUN, W. Y.; PARK, H. W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**, 9, n. 10, Oct 16 2020. <https://doi.org/10.1039/C6MT00105J>

PARK, K. C.; FOUANI, L.; JANSSON, P. J.; WOOL, D. *et al.* Copper and conquer: copper complexes of di-2-pyridylketone thiosemicarbazones as novel anti-cancer therapeutics. **Metallomics**, 8, n. 9, p. 874-886, Sep 1 2016.

PARK, S. H.; HOANG, T. Dietary Factors and Breast Cancer Prognosis among Breast Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. 13, n. 21, Oct 23 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13215329>

PASQUINI, S.; CONTRI, C.; MERIGHI, S.; GESSI, S. *et al.* Adenosine Receptors in Neuropsychiatric Disorders: Fine Regulators of Neurotransmission and Potential Therapeutic Targets. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Jan 22 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031219>

PAVITHRA, V.; SATHISHA, T.; KASTURI, K.; MALLIKA, D. S. *et al.* Serum levels of metal ions in female patients with breast cancer. **Journal of clinical and**

diagnostic research: JCDR, 9, n. 1, p. BC25, 2015.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11627.5476>

POPOVA, O. P.; KUZNETSOVA, A. V.; BOGOMAZOVA, S. Y.; IVANOV, A. A. [Is there a claudin-low phenotype of breast cancer?]. **Ark Patol**, 84, n. 1, p. 45-49, 2022. <https://doi.org/10.17116/patol20228401145>

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Lett**, 387, p. 95-105, Feb 28 2017. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>

PRICEMAN, S. J.; KUJAWSKI, M.; SHEN, S.; CHERRYHOLMES, G. A. *et al*. Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 32, p. 13079-13084, Aug 6 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311557110>

PRIOR, S.; MIOUSSE, I. R.; NZABARUSHIMANA, E.; PATHAK, R. *et al*. Densely ionizing radiation affects DNA methylation of selective LINE-1 elements. **Environ Res**, 150, p. 470-481, Oct 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.043>

PRVANOVIĆ, M.; NEDELJKOVIĆ, M. Role of PTEN, PI3K, and mTOR in Triple-Negative Breast Cancer. 11, n. 11, Nov 17 2021. <https://doi.org/10.3390/life11111247>

QIE, S.; DIEHL, J. A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. **J Mol Med (Berl)**, 94, n. 12, p. 1313-1326, Dec 2016. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1475-3>

QIU, L.; DING, X.; ZHANG, Z.; KANG, Y. J. Copper is required for cobalt-induced transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1. **J Pharmacol Exp Ther**, 342, n. 2, p. 561-567, Aug 2012. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.194662>

QIU, Y.; LIU, Y.; LI, W. H.; ZHANG, H. Q. *et al*. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin. **Oncol Rep**, 39, n. 1, p. 138-150, Jan 2018. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6081>

RADISKY, D. C.; HIRAI, Y.; BISSELL, M. J. Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. **Trends Cell Biol**, 13, n. 8, p. 426-434, Aug 2003. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00146-6)

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; DABBS, D. J. *et al*. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**, 12, n. 4, p. 207, 2010. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>

RAMJIAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, 20, n. 2, p. 185-204, May 2017. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9552-y>

REICHERT, K. P.; CASTRO, M. F. V.; ASSMANN, C. E.; BOTTARI, N. B. *et al.* Diabetes and hypertension: Pivotal involvement of purinergic signaling. **Biomed Pharmacother**, 137, p. 111273, May 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111273>

RIGOULET, M.; BOUCHEZ, C. L.; PAUMARD, P.; RANSAC, S. *et al.* Cell energy metabolism: An update. **Biochim Biophys Acta Bioenerg**, 1861, n. 11, p. 148276, Nov 1 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148276>

ROXBURGH, C. S.; MCMILLAN, D. C. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. **Br J Cancer**, 110, n. 6, p. 1409-1412, Mar 18 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.90>

RUBIN, S. M.; SAGE, J.; SKOTHEIM, J. M. Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. **Mol Cell**, 80, n. 2, p. 183-192, Oct 15 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.020>

SAKAKURA, T.; SUZUKI, Y.; SHIURBA, R. Mammary stroma in development and carcinogenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 18, n. 2, p. 189-197, Jun 2013. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9281-9>

SALEEM, M.; GHAZALI, M. B.; WAHAB, M.; YUSOFF, N. M. *et al.* The BRCA1 and BRCA2 Genes in Early-Onset Breast Cancer Patients. **Adv Exp Med Biol**, 1292, p. 1-12, 2020. https://doi.org/10.1007/5584_2018_147

SANTINI, C.; PELLEI, M.; GANDIN, V.; PORCHIA, M. *et al.* Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chem Rev**, 114, n. 1, p. 815-862, Jan 8 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400135x>

SASANPOUR, P.; SANDOUGHDARAN, S.; MOSAVI-JARRAHI, A.; MALEKZADEH, M. Predictors of Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Iranian Breast Cancer Patients. **Asian Pac J Cancer Prev**, 19, n. 9, p. 2423-2427, Sep 26 2018.

SEILLER, C.; MAIGA, S.; TOUZEAU, C.; BELLANGER, C. *et al.* Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. **Cell Death Dis**, 11, n. 5, p. 316, May 5 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2505-1>

SHIMELIS, H.; LADUCA, H.; HU, C.; HART, S. N. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. **J Natl Cancer Inst**, 110, n. 8, p. 855-862, Aug 1 2018. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy106>

SIDDHARTH, S.; SHARMA, D. Racial Disparity and Triple-Negative Breast Cancer in African-American Women: A Multifaceted Affair between Obesity, Biology, and Socioeconomic Determinants. **Cancers (Basel)**, 10, n. 12, Dec 14 2018. <https://doi.org/10.3390/cancers10120514>

SOLEIMANI, A.; TAGHIZADEH, E.; SHAHSAVARI, S.; AMINI, Y. *et al.* CD73; a key ectonucleotidase in the development of breast cancer: Recent advances and perspectives. **J Cell Physiol**, 234, n. 9, p. 14622-14632, Sep 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28187>

SPORIKOVA, Z.; KOUDELAKOVA, V.; TROJANEC, R.; HAJDUCH, M. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. **Clin Breast Cancer**, 18, n. 5, p. e841-e850, Oct 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>

SRIVASTAVA, V.; HUYCKE, T. R.; PHONG, K. T.; GARTNER, Z. J. Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer. **Curr Opin Cell Biol**, 66, p. 51-58, Oct 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.003>

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends Biochem Sci**, 30, n. 10, p. 542-550, Oct 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.08.005>

STEFANELLO, N.; SPANEVELLO, R. M.; PASSAMONTI, S.; PORCIÚNCULA, L. *et al.* Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food Chem Toxicol**, 123, p. 298-313, Jan 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005>

STRASSER, A.; VAUX, D. L. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. **Mol Cell**, 78, n. 6, p. 1045-1054, Jun 18 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>

SUN, Q.; XIE, W.; WANG, Y.; CHONG, F. *et al.* Alcohol consumption by beverage type and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **Alcohol and Alcoholism**, 55, n. 3, p. 246-253, 2020. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agua012>

SUN, Y.-S.; ZHAO, Z.; YANG, Z.-N.; XU, F. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International journal of biological sciences**, 13, n. 11, p. 1387, 2017. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

TAGLIAFICO, A. S.; PIANA, M.; SCHENONE, D.; LAI, R. *et al.* Overview of radiomics in breast cancer diagnosis and prognostication. **Breast**, 49, p. 74-80, Feb 2020. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.10.018>

TAN, C.; HAN, L. I.; ZOU, L.; LUO, C. *et al.* Expression of P2X7R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene-specific shRNA in MCF-7 cells. **Exp Ther Med**, 10, n. 4, p. 1472-1478, Oct 2015. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2705>

THOMAS, L. W.; LAM, C.; EDWARDS, S. W. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. **FEBS Lett**, 584, n. 14, p. 2981-2989, Jul 16 2010. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.061>

THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and genomics**, 21, n. 7, p. 440, 2011. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Adv Anat Pathol**, 27, n. 1, p. 27-35, Jan 2020. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>

TSANG, T.; POSIMO, J. M.; GUDIEL, A. A.; CICCHINI, M. *et al.* Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma. **Nat Cell Biol**, 22, n. 4, p. 412-424, Apr 2020. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0481-4>

TURCOTTE, M.; ALLARD, D.; MITTAL, D.; BARECHE, Y. *et al.* CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. **Cancer Res**, 77, n. 20, p. 5652-5663, Oct 15 2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0707>

TZIFI, F.; ECONOMOPOULOU, C.; GOURGIOTIS, D.; ARDAVANIS, A. *et al.* The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. **Adv Hematol**, 2012, p. 524308, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/524308>

UNLU, O.; KIYAK, D.; CAKA, C.; YAGMUR, M. *et al.* Risk factors and histopathological features of breast cancer among women with different menopausal status and age at diagnosis. **J buon**, 22, n. 1, p. 184-191, Jan-Feb 2017.

VALENCIA, G. A.; RIOJA, P.; MORANTE, Z.; RUIZ, R. *et al.* Immunotherapy in triple-negative breast cancer: A literature review and new advances. **World Journal of Clinical Oncology**, 13, n. 3, p. 219, 2022. <https://doi.org/10.5306/wjco.v13.i3.219>

VAN DER LEUN, A. M.; THOMMEN, D. S.; SCHUMACHER, T. N. CD8(+) T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. **Nat Rev Cancer**, 20, n. 4, p. 218-232, Apr 2020. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0235-4>

VIALARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, 20, n. 4, p. 409-426, Nov 2017. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>

VISVADER, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes Dev**, 23, n. 22, p. 2563-2577, Nov 15 2009. <https://doi.org/10.1101/gad.1849509>

VON MINCKWITZ, G.; SCHNEEWEISS, A.; LOIBL, S.; SALAT, C. *et al.* Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. **The lancet oncology**, 15, n. 7, p. 747-756, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70160-3)

VON MINCKWITZ, G.; UNTCH, M.; BLOHMER, J. U.; COSTA, S. D. *et al.* Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, 30, n. 15, p. 1796-1804, May 20 2012. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.8595>

VUERICH, M.; ROBSON, S. C.; LONGHI, M. S. Ectonucleotidases in Intestinal and Hepatic Inflammation. **Front Immunol**, 10, p. 507, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00507>

VULTAGGIO-POMA, V.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. **Cells**, 9, n. 11, Nov 17 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9112496>

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

WADHWA, S.; MUMPER, R. J. D-penicillamine and other low molecular weight thiols: review of anticancer effects and related mechanisms. **Cancer Lett**, 337, n. 1, p. 8-21, Aug 28 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.027>

WAHBA, H. A.; EL-HADAAD, H. A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer biology & medicine**, 12, n. 2, p. 106, 2015.

WALKER-SMITH, T. L.; PECK, J. Genetic and Genomic Advances in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Nurs Womens Health**, 23, n. 6, p. 518-525, Dec 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nwh.2019.09.003>

WCRF. **Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: A Global Perspective.** Continuous Update Project Expert Report; 2018., 2018. Disponível em: <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/Summary-of-Third-Expert-Report-2018.pdf> Acesso em: 05/12/2022.

WHO. **Breast Cancer.** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em: 03/01/2023.

WHO. **Cancer.** 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 03/01/2023.

WHO. **Estimated number of new cases from 2020 to 2040.** 2023b. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=20&populations=903_904_905_908_909_935&single_unit=500000. Acesso em: 03/01/2023.

WINTERS, S.; MARTIN, C.; MURPHY, D.; SHOKAR, N. K. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 151, p. 1-32, 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>

WOLK, A. Potential health hazards of eating red meat. **J Intern Med**, 281, n. 2, p. 106-122, Feb 2017. <https://doi.org/10.1111/joim.12543>

WU, Q.; MA, G.; DENG, Y.; LUO, W. *et al.* Prognostic Value of Ki-67 in Patients With Resected Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Front Oncol**, 9, p. 1068, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01068>

XING, Y.; SONG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, T. *et al.* Purinergic Signaling Mediates PTH and Fluid Flow-Induced Osteoblast Proliferation. **Biomed Res Int**, 2021, p. 6674570, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6674570>

XIONG, K.; ZHOU, Y.; KARGES, J.; DU, K. *et al.* Autophagy-Dependent Apoptosis Induced by Apoferritin-Cu(II) Nanoparticles in Multidrug-Resistant Colon Cancer Cells. **ACS Appl Mater Interfaces**, 13, n. 33, p. 38959-38968, Aug 25 2021. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c07223>

XU, K.; SUN, Q.; SHI, Z.; ZOU, Y. *et al.* A Dose-Response Meta-Analysis of Dietary Fiber Intake and Breast Cancer Risk. **Asia Pac J Public Health**, 34, n. 4, p. 331-337, May 2022. <https://doi.org/10.1177/10105395211072997>

YAMAN, M.; KAYA, G.; SIMSEK, M. Comparison of trace element concentrations in cancerous and noncancerous human endometrial and ovary tissues. **International Journal of Gynecologic Cancer**, 17, n. 1, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00742.x>

YAMAN, M.; KAYA, G.; YEKELER, H. Distribution of trace metal concentrations in paired cancerous and non-cancerous human stomach tissues. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 13, n. 4, p. 612, 2007. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i4.612>

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 49, n. 6, p. 473-497, Nov-Dec 2014. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>

YIN, L.; DUAN, J.-J.; BIAN, X.-W.; YU, S.-c. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, 22, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

YIN, L.; DUAN, J. J.; BIAN, X. W.; YU, S. C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Res**, 22, n. 1, p. 61, Jun 9 2020. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

YOSHII, J.; YOSHIJI, H.; KURIYAMA, S.; IKENAKA, Y. *et al.* The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells. **Int J Cancer**, 94, n. 6, p. 768-773, Dec 15 2001. <https://doi.org/10.1002/ijc.1537>

ZAHER, D. M.; EL-GAMAL, M. I.; OMAR, H. A.; ALJAREH, S. N. *et al.* Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. **Arch Pharm (Weinheim)**, 353, n. 5, p. e2000011, May 2020. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000011>

ZHANG, H.; LIU, C. S.; BU, X. H.; YANG, M. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activity and DNA-binding properties of the copper (II) and zinc (II) complexes with 1-[3-(2-pyridyl)pyrazol-1-ylmethyl]naphthalene. **J Inorg Biochem**, 99, n. 5, p. 1119-1125, May 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.005>

ZHANG, J.; WANG, Z.; HU, X.; WANG, B. *et al.* Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer. **International journal of cancer**, 136, n. 1, p. 204-211, 2015. <https://doi.org/10.1002/ijc.28966>

ZHANG, M.; SHI, M.; ZHAO, Y. Association between serum copper levels and cervical cancer risk: a meta-analysis. **Bioscience Reports**, 38, n. 4, 2018. <https://doi.org/10.1042/BSR20180161>

ZHANG, P. L.; HOU, X. X.; LIU, M. R.; HUANG, F. P. *et al.* Two novel chiral tetranucleate copper-based complexes: crystal structures, nanoparticles, and inhibiting angiogenesis and the growth of human breast cancer by regulating the VEGF/VEGFR2 signal pathway in vitro. **Dalton Trans**, 49, n. 18, p. 6043-6055, May 14 2020. <https://doi.org/10.1039/D0DT00380H>

ZHANG, X.; YANG, Q. Association between serum copper levels and lung cancer risk: A meta-analysis. **Journal of International Medical Research**, 46, n. 12, p. 4863-4873, 2018. <https://doi.org/10.1177/0300060518798507>

ZHANG, Y.; LI, F.; SONG, Y.; SHENG, X. *et al.* Numb and Numbl act to determine mammary myoepithelial cell fate, maintain epithelial identity, and support lactogenesis. **Faseb j**, 30, n. 10, p. 3474-3488, Oct 2016. <https://doi.org/10.1096/fj.201600387R>

ZHANG, Y. N.; XIA, K. R. Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. 2021, p. 1994764, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1994764>

ZHONG, Z.; YU, J.; VIRSHUP, D. M.; MADAN, B. Wnts and the hallmarks of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 39, n. 3, p. 625-645, Sep 2020. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09887-6>

ZHOU, X.; YU, L.; WANG, L.; XIAO, J. *et al.* Alcohol consumption, blood DNA methylation and breast cancer: a Mendelian randomisation study. **European Journal of Epidemiology**, 37, n. 7, p. 701-712, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10654-022-00886-1>

ZHU, W.; NELSON, C. M. Adipose and mammary epithelial tissue engineering. **Biomatter**, 3, n. 3, p. e24630, 2013. <https://doi.org/10.4161/biom.24630>

ZIMMERMANN, H. Extracellular ATP and other nucleotides-ubiquitous triggers of intercellular messenger release. **Purinergic Signal**, 12, n. 1, p. 25-57, Mar 2016. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9483-2>

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochem Pharmacol**, 187, p. 114322, May 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114322>

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, 8, n. 3, p. 437-502, Sep 2012. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>

ZOU, Y.; XIE, J.; ZHENG, S.; LIU, W. *et al.* Leveraging diverse cell-death patterns to predict the prognosis and drug sensitivity of triple-negative breast cancer patients after surgery. **Int J Surg**, 107, p. 106936, Nov 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2022.106936>

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Front Pharmacol**, 11, p. 632079, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079>

Capítulo II

A new copper (II) complex containing long-chain aliphatic hydrazides and 1,10-phenanthroline upregulates ADP hydrolisis in triple-negative breast cancer cells

RESUMO

Os efeitos de novos complexos de cobre (II) contendo hidrazidas alifáticas de cadeia longa e 1,10-fenantrolina contra células de câncer de mama foram investigados em um painel de linhagens de células de câncer de mama (MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-231, e MDA-MB-157), e contra a linha celular não tumoral MCF-10A. Todos os complexos de cobre sintetizados mostraram significativa citotoxicidade e seletividade para linhagens de células tumorais. Em particular, o Complexo **2** exibiu valores de IC₅₀ variando entre 2,7 e 13,4 μ M considerando os tratamentos após 48 e 24 h, respectivamente. Além disso, este complexo mostrou-se mais seletivo para linhagens de células tumorais quando comparado aos efeitos citotóxicos da doxorrubicina e docetaxel. O Complexo **2** controlou a clonogenicidade das células MDA-MB-231 e modulou a hidrólise de nucleotídeos extracelulares, especialmente de ADP, cujo aumento na hidrólise sugere o aumento nos níveis de AMP. O mesmo complexo também promoveu a upregulação da expressão de ENTPD1, enzima responsável pela hidrólise de ATP e ADP. Anteriormente, níveis maiores de AMP foram associados à inibição da proliferação celular e da síntese de NAD e NADH em células de CM, sugerindo que o efeito do complexo **2** observado sobre a clonogenicidade das células MDA-MB-231 esteja associado ao aumento na hidrólise de ADP. Assim, um novo complexo de cobre (II) com maior efeito citotóxico e seletividade contra células de câncer de mama foi obtido e mecanismos inéditos associados à modulação da sinalização purinérgica foram inicialmente descritos para esse complexo, contribuindo para os esforços da química medicinal no desenvolvimento de novos quimioterápicos.

A new copper (II) complex containing long-chain aliphatic hydrazides and 1,10-phenanthroline upregulates ADP hydrolisis in triple-negative breast cancer cells

Authorship

Helen Soares Valença Ferreira^a, Fernanda Cardoso da Silva^a, Cristina Ribas Fürstenau^b, Dayanne Silva Borges^a, Raoni Pais Siqueira^a, Thaise Gonçalves Araújo^{a,c*}

Affiliation

^aLaboratory of Genetics and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Patos de Minas, MG 38700-002, Brazil; helensvalenca@gmail.com (H.S.V.F); fernanda.cardoso95@yahoo.com (F.C.S); daaysborges@gmail.com (D.S.B.); raoni.siqueira@ufu.br (R.P.S.); tgaraujo@ufu.br (T.G.A.)

^bLaboratory of Vascular Biochemistry, Center for Natural and Human Sciences (CCNH), Federal University of ABC, Rua Oratório, 305 - Bangú - CEP 09280-550, Santo André, SP, Brazil; c.furstenau@ufabc.edu.br (C.R.F).

^cLaboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia-MG, 38400-902, Brazil.

***Corresponding author:** Thaise G. Araújo, Laboratory of Genetics and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, street Major Jerônimo, 566, Sala 601, 38700-002, Patos de Minas, MG, Brazil. Phone: +55 34 38142027. tgaraujo@ufu.br.

Abstract

The effects of novel copper (II) complexes containing long-chain aliphatic hydrazides and 1,10-phenanthroline against breast cancer cells were investigated in a panel of breast cancer cell lines (MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-231, and MDA-MB-157), and against the non-tumor cell line MCF-10A. All synthesized copper complexes demonstrated significant cytotoxicity and selectivity for tumor cell lines. In particular, Complex **2** exhibited IC₅₀ values ranging between 2.7 and 13.4 μ M considering treatments after 48 and 24h, respectively. Furthermore, this complex was more selective for tumor cell lines when compared to the cytotoxic effects of doxorubicin and docetaxel. Complex **2** controls the clonogenicity of MDA-MB-231 cells and modulates the hydrolysis of extracellular nucleotides, especially ADP, whose hydrolysis increase suggests an increase in AMP levels. The same complex also upregulated the expression of ENTPD1, the enzyme responsible for the hydrolysis of ATP and ADP. Previously, increased AMP levels were associated with inhibition of cell proliferation and NAD and NADH synthesis in CM cells, suggesting that the observed complex **2** effect on the clonogenicity of MDA-MB-231 cells is associated with increased ADP hydrolysis. Thus, a new copper(II) complex with greater cytotoxic effect and selectivity against breast cancer cells was obtained and unpublished switches associated with purinergic signal modulation were initially received for this complex, confident for the efforts of medicinal chemistry in the development of new chemotherapy.

Keywords: Copper(II) complexes; aliphatic hydrazides; 1,10-phenanthroline; breast cancer; purinergic signalling.

1. Introduction

Cancer currently represents the second leading cause of death in the world. According to the World Health Organization, in 2020, about 10 million people died from the disease and, for 2040, 19.3 million new cases are expected being 3 million of Breast Cancer (BC) (WHO, 2023). According to WHO, BC has surpassed lung cancer as the most diagnosed cancer, with 2.26 million new cases in the year 2020 for 2.21 million new cases lung cancer (SUNG; FERLAY; SIEGEL, 2021).

BC treatment requires multidisciplinary efforts to overcome the heterogeneity of these tumors. Molecularly, they are categorized according to the activation of human epidermal growth factor 2 (HER2, encoded by *ERBB2*), expression of hormone receptors (estrogen receptor – ER and progesterone receptor – PR), and/or mutations in *BRCA1/2* (Breast Cancer Type 1 and 2) tumor suppressors. Thus, there are luminal A (ER+ and HER2-); luminal B-like HER2 (ER+ and/or PR+, Ki67 > 14%); luminal B-like HER2+ (ER+ and/or PR+ HER2+); HER2-enriched (ER-, PR- and HER2+); and triple-negative (TN) breast cancers (ER-, PR- and HER2-) (HACKING; YAKIREVICH; WANG, 2022; HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019). Thus, locoregional therapy strategies (surgery and radiotherapy) and systemic therapy (hormone therapy, targeted therapy and chemotherapy) are adopted according to the histological and molecular characteristics, in a neoadjuvant or adjuvant regimen (HARBECK; PENAULT-LLORCA; CORTES; GNANT *et al.*, 2019).

Patients with a high histological grade and increased risk of recurrence are commonly treated with chemotherapy (RAKHA; REIS-FILHO; BAEHNER; DABBS *et al.*, 2010). Initially, there is a reduction in lesion size and a complete

pathological response. However, the low selectivity, the activation of multiple drug resistance (MDR) mechanisms, the appearance of dormant and tolerant clones, and remodeling of the tumor microenvironment (TME) can compromise the successful of the treatment (FAMTA; SHAH; JAIN; KUMAR *et al.*, 2022).

In this context, the synthesis of new therapeutic agents based on cationic complexes emerges as a promising alternative in the development of novel chemotherapeutic agents. Copper is an essential micronutrient capable of existing in two distinct redox states oxidized Cu(II) or reduced Cu(I), which allows its participation in redox reactions and transduction of cellular signals. Cu(II) acts as a Lewis base and is an intermediate acid on the Pearson scale, which allows complexation with different ligands and atom donors (ZHOU; ZHANG ; LU; ZHANG *et al.*, 2022). In addition, copper is an important structural component and an enzymatic cofactor. Therefore, metallic copper complexes have demonstrated the potential to overcome the non-specificity exhibited by compounds already used in clinical practice. In fact, copper uptake occurs naturally by the body, and its influx is even more expressive in tumor cells, since these reprogram their metabolism and activate copper-dependent mechanisms such as angiogenesis, proliferation and invasion (ROMO; CAREPO; LEVÍN; NASCIMENTO *et al.*, 2021).

In BC, copper metal complexes have shown promising results. *In vitro* studies with five new Cu(II) complexes of the class $[Cu(no)(nn)(ClO_4)_2]$ containing acid hydrazide (no, 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide (4-FH) or 4-nitrobenzoic hydrazide (4-nh) and nn, 1,10-phenanthroline (phen), 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine or 2,2'-bipyridine were synthesized, characterized and tested for their antitumor potential. Among them $[Cu(4-fh)(phen)(ClO_4)_2]$ and

[Cu(4-nh)(phen)(ClO₄)₂].H₂O showed significant cytotoxicity against MDA-MB-231 cells and triggered apoptosis (PAIXÃO; MARZANO; JAIMES; PIVATTO *et al.*, 2017). Another ternary copper complex containing phen, [Cu(phen)(L-tyr)Cl].3H₂O, exhibited a remarkable selectivity to MDA-MB-231 lineage. Furthermore, this complex induced cell cycle arrest and apoptosis (LEE; LEONG; LIM; WONG *et al.*, 2022). Previous studies by our research group reported the effects of two Cu (II) ternary complexes, [Cu(4-fh)(phen)(ClO₄)₂] and [Cu(4-nh)(phen)(ClO₄)₂] · H₂O. Both were cytotoxic to MDA-MB-231 cell line, although only the complex [Cu(4-fh)(phen)(ClO₄)₂] showed significant selectivity index. This compound induced (DNA damage resulting in cell cycle arrest in G0/G1 and cell death) (MACHADO; PAIXÃO; LINO; DE SOUZA *et al.*, 2021).

In the present study we aimed to evaluate the effects of new Cu(II) complexes containing long-chain aliphatic hydrazides and phen in a panel of BC cells. Since the synthesized complexes have original structures, we hypothesize that their activities are superior to previously described compounds, and that they can modulate unprecedented mechanisms, such as nucleotide hydrolysis, which have not yet been described for copper metal complexes.

2. Results and Discussion

2.1 Effect of copper(II) complexes on cell viability

The cytotoxic activity of the synthesized copper(II) complexes containing long-chain aliphatic hydrazides and phen was evaluated at different concentrations (0 – 160 µM) over a panel of human breast cancer cells using MTT assays. The results showed a dose-dependent and time-dependent effect against most cell lines evaluated, since cytotoxicity was more prominent with increasing concentration and after 48 h of exposure (**Supplementary Figure**).

The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for each synthesized copper(II) complex was also determined. As shown in **Table 1**, the three complexes were active against all the tumor cells evaluated, presenting $IC_{50} < 15 \mu M$. The Complex **2** was the most active, indicating an IC_{50} $3.29 \mu M$ against MDA-MB-453 after 24 h of exposure, and IC_{50} 6.90, 5.12, 2.70, and $3.63 \mu M$ against MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-231, and MDA-MB-157, respectively, after 48 h of treatment. Complex **2** presented superior cytotoxicity in comparison with docetaxel (DTX) but being less cytotoxic than the potent chemotherapeutic doxorubicin (DOX). Also, all the ligands used in the synthesis, octanohydrazide (octh), decanohydrazide (dech), dodecanohydrazide (dodh), and phen did not present significant cytotoxic activity. Thus, the chelation to copper ion provided the cytotoxic activity of these compounds and the presence of the ligands dech and phen coordinated to the copper(II) in Complex **2** may be associated with its superior activity.

Table 1. Half-maximal inhibitory concentration or IC_{50} values (μM) of complexes 1-3 over breast cancer cell lines. Half-maximal inhibitory concentration or IC_{50} values (μM) of Complexes **1-3** over breast cancer cell lines.

Metallic compound	24h					48h				
	MCF-10A	MCF7	MDA-MB-453	MDA-MB-231	MDA-MB-157	MCF-10A	MCF7	MDA-MB-453	MDA-MB-231	MDA-MB-157
Complex 1	30.6 ± 1.9	8.40 ± 2.5	11.7 ± 4.0	14.6 ± 2.0	13.5 ± 1.9	20.4 ± 2.7	6.20 ± 0.7	8.01 ± 0.7	5.5 ± 0.5	9.50 ± 1.0
Complex 2	38.9 ± 4.3	10.8 ± 4.7	3.29 ± 2.1	13.4 ± 3.7	9.27 ± 2.1	30.8 ± 3.7	6.90 ± 1.3	5.12 ± 3.3	2.7 ± 1.5	3.63 ± 0.5
Complex 3	27.8 ± 6.7	7.40 ± 1.3	9.71 ± 2.2	10.6 ± 1.5	11.0 ± 2.2	20.0 ± 2.4	4.20 ± 0.3	6.98 ± 2.1	4.0 ± 1.4	7.94 ± 3.0
DTX	56.3 ± 12.2	73.7 ± 2.7	105.0 ± 1.4	43.5 ± 6.4	16.3 ± 5.7	25.6 ± 6.3	75.2 ± 2.8	76.0 ± 6.3	20.7 ± 0.7	13 ± 6.5
DOX	1.96 ± 5.2	0.61 ± 5.7	1.35 ± 4.5	1.51 ± 7.4	0.48 ± 2.9	0.32 ± 2.1	0.16 ± 3.2	0.42 ± 1.5	0.24 ± 3.1	0.36 ± 3.4
Phen	NA	NA	NA	>40	NA	>80	>10	NA	34.8 ± 6.1	NA
Dodh	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Dech	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Octh	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Note: MCF-10A, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB 157 cells were treated with increasing concentrations (0 – 160 µM) of indicated compounds or complexes 1-3 for 24 and 48h. Cell viability was determined using the MTT assay. The IC₅₀ values are expressed as the means ± standard deviation. NA: IC₅₀ > 160 µM. DTX: docetaxel; DOX: doxorubicin; phen: 1,10-phenanthroline; dodh: dodecanohydrazide; dech: decanohydrazide; octh: octanohydrazide.

It is noteworthy that the synthesized complexes indicated a considerable selectivity index ($SI > 2.0$) (**Table 2**). For example, Complex **2** presented SI 11.8 for MDA-MB-453 after 24 h of treatment and SI 11.40 for MDA-MB-231 after 48 h of treatment. In addition, it should be noted that the copper complexes were more selective in comparison to DTX and DOX, which are widely used for the treatment of BC, with prominent toxicity (SHAFEI; EL-BAKLY; SOBHY; WAGDY *et al.*, 2017; ZHANG; WU; LI; LIN *et al.*, 2022). When compared to other copper (II) complexes containing analogous ligands, Complex **2** stands out for its high selectivity. Machado *et al.*, 2021, also demonstrated the antiproliferative activity of a copper complex coordinated to phen against tumor cells. However, IC_{50} of Complex **2** were lower than the published compound, with higher SI. Therefore, due to the cytotoxic effects and selectivity presented of Complex **2**, this metallic compound was selected for further assays. Two concentrations were tested, one corresponding to the IC_{50} value and another corresponding to the IC_{25} , therefore, half of the IC_{50} value. Thus, cellular and molecular effects not directly associated with the death mechanisms could be evaluated.

Table 2. Selectivity index (SI) of Complexes **1-3** Selectivity index (SI) of Complexes **1-3**.

<u>Metallic compound</u>	24h				48h			
	MCF7	MDA -MB-453	MDA-MB-231	MDA-MB-157	MCF7	MDA -MB-453	MDA-MB-231	MDA-MB-157
Complex 1	3.83	2.62	2.09	2.27	3.29	2.55	3.70	2.15
Complex 2	3.60	11.8	2.90	4.2	4.46	6.02	11.40	8.48
Complex 3	3.76	2.86	2.62	2.53	4.76	2.9	5.00	2.52
DTX	0.76	0.54	1.29	3.45	0.34	0.34	4.60	1.96
DOX	3.21	1.45	1.29	4.08	2.00	0.76	1.24	0.88

Note: SI was calculated by dividing the IC₅₀ value for non-tumor cell lines, MCF10A, by the IC₅₀ values for tumor cells , MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-157.DTX: docetaxel; DOX: doxorubicin.

2.2 Complex 2 impairs migration and clonogenicity of MDA-MB231 cells

Faced with the challenges related to the treatment of TNBC, we further carried out wound healing assays to evaluate the antimigratory effect of Complex **2** on MDA-MB231 cells. TNBC is associated with worse prognosis and is mainly treated with chemotherapy. They are highly proliferative tumors, with greater genomic instability, in addition to a greater propensity for metastasis and resistance to apoptosis (ZOU; XIE; ZHENG *et al.*, 2022).

Representative micrographies show that Complex **2** significantly impaired cell migration at 6.7 μ M for both 24 and 48 h of treatment (**Figure 1A**). In fact, migration is one of the main events associated with the metastatic cascade (FANFONE; WU; MAMMI; BERTHENET *et al.*, 2022) and the antimetastatic potential of copper complexes has been previously demonstrated in *in vitro* models of ovarian and colorectal cancers (RUIZ; PERELMULTER; LEVÍN; ROMO *et al.*, 2022; SHI; CHEN; WANG; GUO *et al.*, 2018). However, no significant effect was seen at the lowest concentration tested. In this context, we suggest that the observed effect on migration came from the activation of cell death mechanisms. We hypothesized, therefore, that the action of Complex **2** involves other hallmarks of cancer and, for this, we evaluated the long-term effects of the compound through colony formation assays (**Figure 1B**). The results showed that after 24 h of treatment Complex **2** inhibited 29% of colony formation at 3.35 μ M and 47% at 6.7 μ M. After 48 h, Complex **2** inhibited about 50% of colony formation at both 3.35 and 6.7 μ M treatments. There was no significant difference between the concentrations used.

The ability to generate clones is a characteristic of the aggressiveness of tumor cells and is directly related to their ability to interact and modulate the tumor

microenvironment (TME) (ESQUER; ZHOU; ABRAHAM; LABARBERA, 2020). Purinergic signaling has gained attention in light of its critical role in TME, controlling the extracellular nucleotides contents through the activity of ectonucleotidases and the expression and functioning of their receptors (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020). The question raised here was: are copper metal complexes capable of regulating the expression of ectonucleotidases and, thus, changing the “purinome” of BC cells?

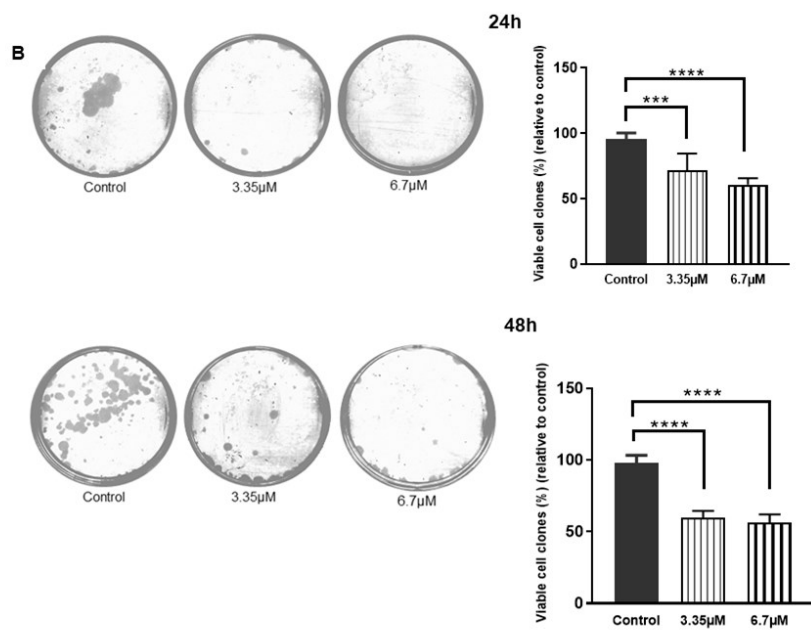
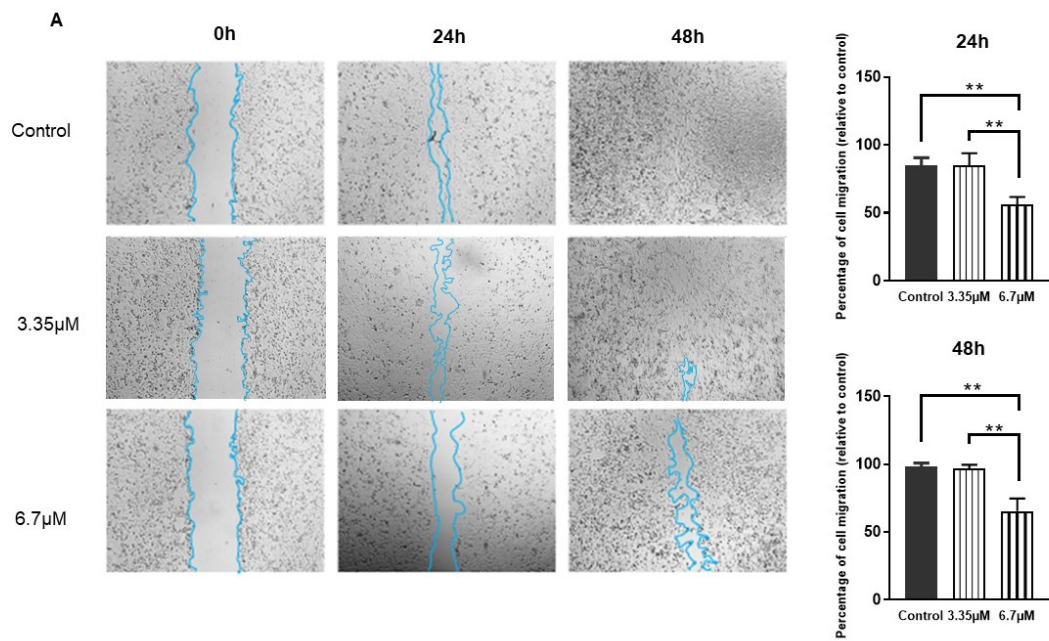


Figure 1. Effect of Complex **2** on MDA-MB-231 cell migration and clonogenicity in vitro. (A) Confluent MDA-MB-231 cells were injured and treated with 3.35 and 6.7 μ M of Complex **2**. Untreated cells were used as a control. The widths of the lesion lines made on the cells were examined after 0, 24 and 48 h of treatments. The wound photos were taken at the times indicated, using an optical microscope under exposure of 100x magnitude. (B) Clonogenic analysis of MDA-MB-231 cells after treatment with Complex **2** at 3.35 and 6.7 μ M. Quantitative representation of reduced cell colonies after drug exposure is also presented. The data are shown as means $\pm$ standard deviation with replications $n = 3$. Values of P represented for **** ($P < 0.0001$), *** ($P < 0.001$) and ** ($P < 0.01$) by Tukey's multiple comparisons test.

2.3 Effects of Complex 2 on ATP, ADP, and AMP hydrolysis

To answer the question above we further evaluated whether treatments with Complex **2** impacts nucleotide hydrolysis in MDA-MB-231 cells. In a previous study, our research group observed that adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine (ADO) hydrolysis is higher in MDA-MB-231 lineage compared to MCF7 cells indicating an orchestrated action of these enzymes in order to establish the concentrations of nucleotides that are necessary to maintain the phenotype of triple-negative BC cells (DA SILVA; DE MELO NETO; MARTINS; DE SOUSA CARDOSO *et al.*, 2022).

As firstly proposed by Burnstock in 1972, nucleotides act as autocrine and paracrine messengers, immunomodulating the TME and affecting the physiology

of cancerous cells (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020). In this context, the presence of ATP and ADO is regulated by a hierarchical control system composed by ectonucleotidases that are ectoenzymes located on the cell surface and are responsible for the hydrolysis of extracellular nucleotides (DA SILVA; DE MELO NETO; MARTINS; DE SOUSA CARDOSO *et al.*, 2022).

Herein, the activity of CD39 (also called NTPDase1) and CD73 (also called ecto-5'-nucleotidase) on the cell surface were indirectly measured before and after treatments with 1.35 or 2.7 μM of Complex **2** for 12, 24, and 48 h. CD39 converts ATP into ADP and ADP into adenosine monophosphate (AMP). CD73, in turn, is responsible to produce ADO through AMP hydrolysis. As shown in **Figure 2A**, after 12 h, there was an increase in ATP hydrolysis and a decrease in ADP hydrolysis compared to the control at both concentrations evaluated, with no effect being observed on ADO concentration (AMP hydrolysis). After 24 h, ATP hydrolysis decreased in the treatment with 1.35 μM , and increased in the highest concentration of Complex **2** (2.7 μM). No change in ADP hydrolysis was observed in both concentrations and AMP hydrolysis increased in the treatment with 2.7 μM (**Figure 2B**). Finally, after 48 h of treatment, greater ADP hydrolysis was identified, which may indicate higher AMP levels (**Figure 2C**). Thus, our results suggest that AMP levels decreased after 12 hours but increased significantly after 48 hours. However, it is important to highlight that only the enzymatic activities were measured, so that the nucleotide levels can be regulated by other mechanisms, which were not explored in the present study.

In an analysis regarding the activity of these enzymes over time, and according to the concentrations used, there was a peculiar behavior in the first

12 hours of treatment with the lowest concentration (1.35 μM), with an increase in ATP hydrolysis and a decrease in ADP hydrolysis (**Figure 2D**). However, after 24 h, there was a balance of enzymatic activities and, for both experimental conditions, after 48 hours, the increase in ADP hydrolysis is notorious, especially in the treatment with 2.7 μM of Complex **2** (**Figure 2E**).

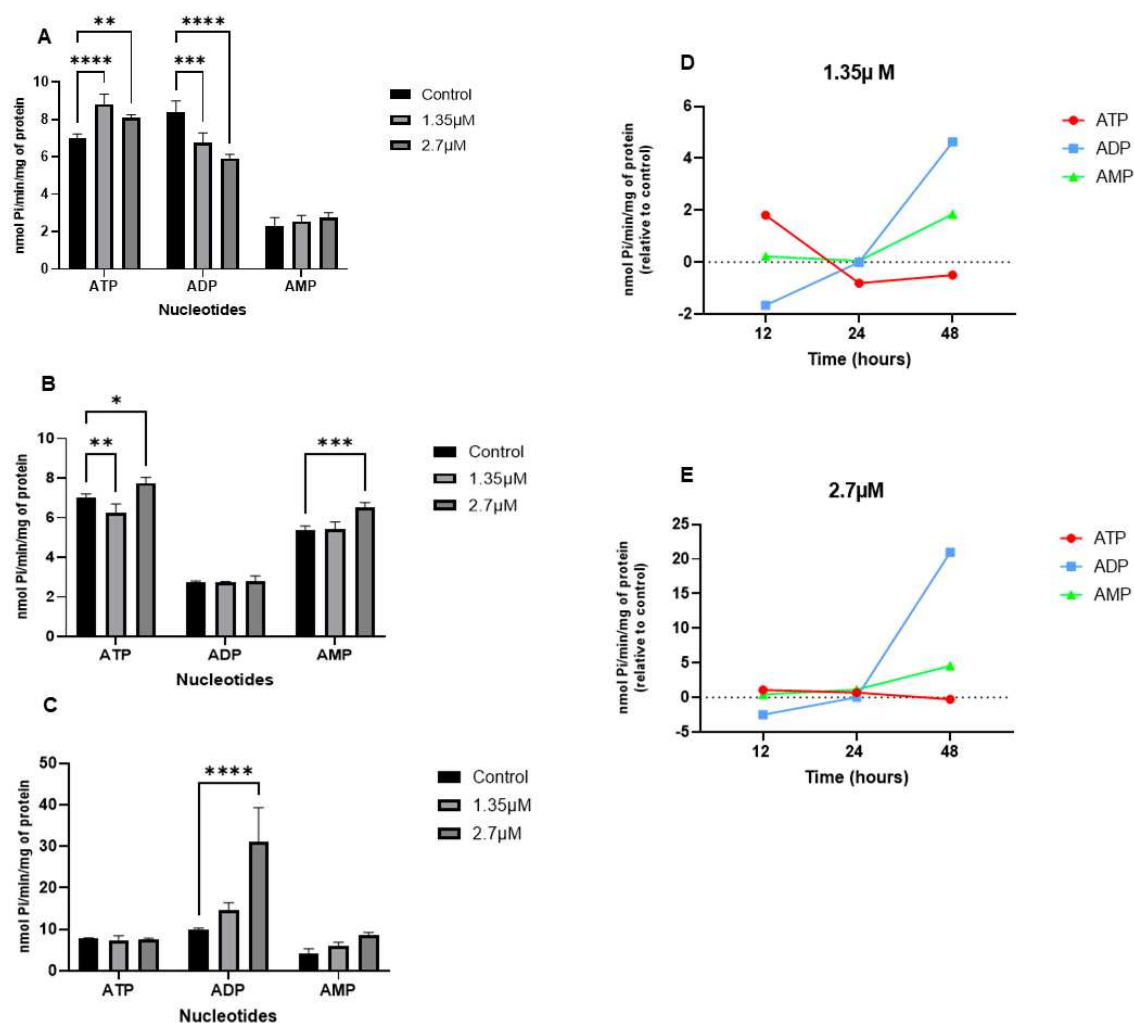


Figure 2. Hydrolysis of ATP, ADP and AMP on the surface of the MDA-MB-231 cell line. Treatments with Complex **2** were conducted for 12 h (A) 24 h (B) and 48 h (C). Hydrolysis was expressed in nmol/Pi/min/mg of protein. Data were also

present over the time and normalized to control (untreated) cells according to treatments with 1.35 μ M (D) and 2.7 μ M (E) of Complex **2**. Values are presented as mean $\pm$ standard deviation, n = 4. Values of P represented for **** (P < 0.0001), *** (P < 0.001) and ** (P < 0.01) by Dunnet's multiple comparisons test.

Our results show a clear modulation in nucleotide hydrolysis, especially on ADP, mediated by Complex **2** treatment, which can impact AMP levels. In a previous study, AMP inhibited cell proliferation and NAD and NADH synthesis in MCF-7 and MDA-MB-453 BC cells (MAZUREK; MICHEL; EIGENBRODT, 1997). These data corroborate the results presented here, so that the decrease in colonies formed may be associated with increased ADP hydrolysis and the consequent increase in AMP. The most interesting point is that CD39 hydrolyses both ATP and ADP, and this balance between the hydrolysis of both was not observed. Furthermore, despite the results indicating higher levels of AMP, we did not observe increase in AMP hydrolysis and ADO production, widely considered responsible for leading to TME immunosuppression and contributing to tumor aggressiveness (FENG; CAI; ZHU; XING et al., 2020). We suggest, therefore, that the action of Complex **2** may also occur at the level of purinergic receptors and, therefore, these will be the next targets to be investigated.

2.4 Complex 2 upregulates ENTPD1 expression in MDA-MB-231

Finally, to determine whether Complex **2** impacts MDA-MB-231 mRNA levels of ectonucleotidases (*ENTPD1*, *ENTPD2*, *ENTPD3* and *ENTPD5*, ecto-5'-nucleotidase-*NT5E*) and pro-inflammatory proteins downstream of the signaling pathway ADO (*IL-1 β* , *IL-6* and *TGF- β*), qPCR assays were performed (**Figure 3**).

ENTPD1 transcript levels were up-regulated under both treatment conditions. *ENTPD3* expression, in turn, increased only when MDA-MB231 cells were treated with 1.35 μ M of Complex **2**. These results corroborate the enzymatic assay and indicate that Complex **2** can impact the hydrolysis of ATP to ADP or hydrolysis of ADP to AMP, since *ENTPD1* and *ENTPD3* are involved in the hydrolysis of these nucleotides (ZAIB; JAFARI; LANGER et al., 2020). Therefore, according to the results presented, greater CD39 activity is accompanied by greater expression of *ENTPD1* when MDA-MB231 cells were treated with 2.7 μ M of Complex **2**.

Regarding the expression of the other transcripts, none of the treatments at 1.35 or 1.7 μ M showed changes in transcription levels of *ENTPD2*, *ENTPD5* and *NT5E*, which again highlights the ability of Complex **2** to control ADO production by cells MDA-MB231. Results also indicated that *IL-6* and *TGF- β* transcripts were significantly up-regulated in MDA-MB-231 cells after exposure to 1.35 μ M Complex **2** (Figure 3). However, the highest concentration (2.7 μ M) did not indicate significant changes in *IL-6* and *TGF- β* expression. IL-6 is a cytokine that is associated with poor prognosis and metastasis (CHEN; WEI; YANG; HUANG et al., 2022), and TGF- β is associated with resistance to chemotherapy in BC, both of which can be stimulated by ADO (XU; ZHANG; HE; ZHANG et al., 2018). Thus, we suggest that the concentration of the metal complex is preponderant for the desired effects, mainly in tenuous control mechanisms, such as purinergic signaling.

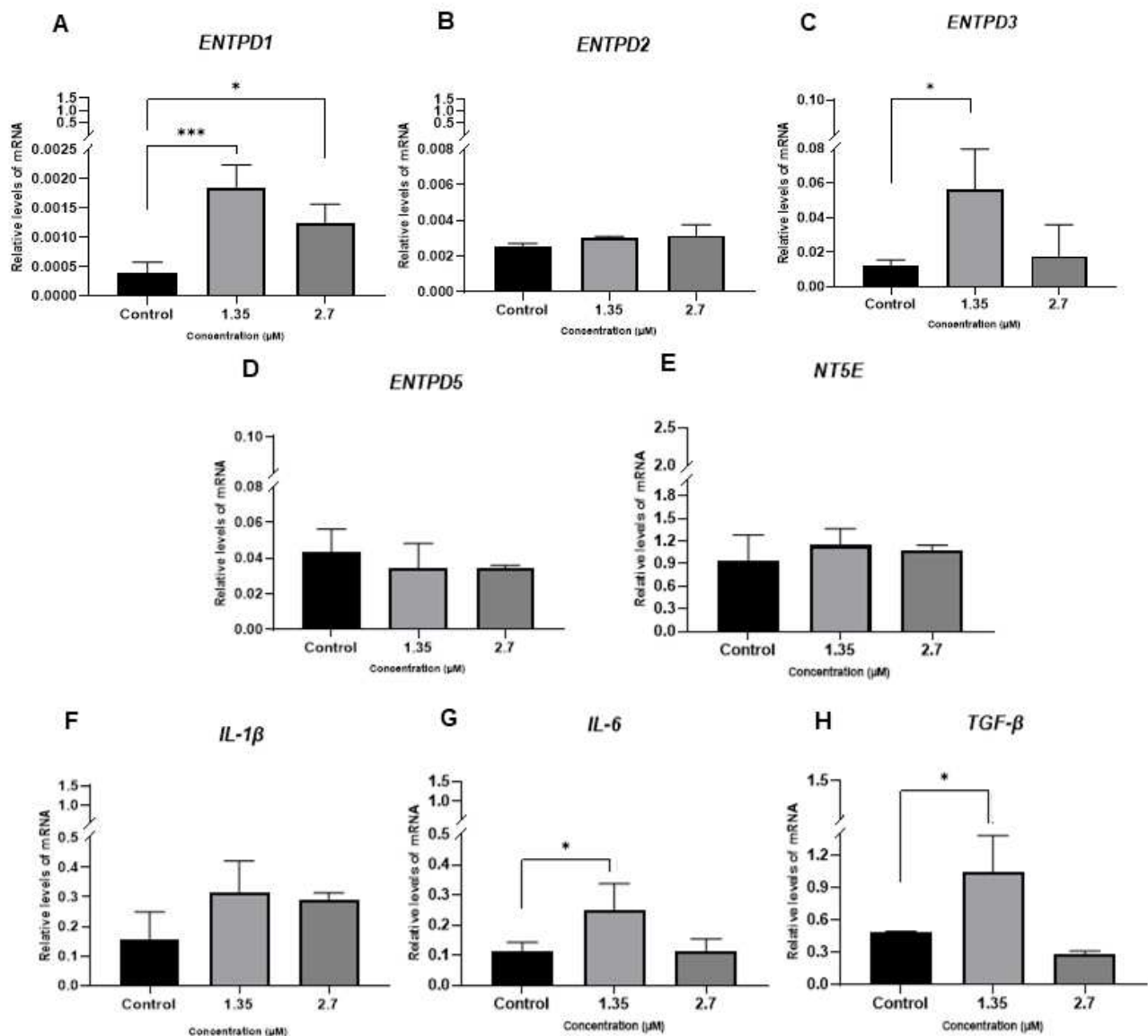


Figure 3. Relative mRNA levels target genes. (A) Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1 (*ENTPD1*), (B) Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (*ENTPD2*), (C) Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-3 (*ENTPD3*), (D) Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-5 (*ENTPD5*), (E) ecto-5'-nucleotidase (*NT5E*), (F) Interleukin-1 β (*IL-1 β*), (G) Interleukin-6 (*IL-6*) and (H) Transforming growth factor- β (*TGF- β*).

Values are presented as mean $\pm$ standard deviation, n = 4. P values represented by *** (P<0.001) e , ** (P < 0.01) and * (P < 0.1).

3. Concludind remarks

Herein we evaluated the cytotoxic effects of novel copper (II) complexes containing long-chain aliphatic hydrazides and 1,10-phenanthroline against breast cancer cells. All synthesized copper complexes showed significant cytotoxicity and selectivity, with Complex **2** being the most promising because of its potency and superior selectivity. Complex **2** also affected the clonogenic potential of the MDA-MB-231 cell line though increasing ADP hydrolisis and upregulating *ENTPD1* transcriptional levels. Further studies should be carried out to unravel the additional mechanism of action of this compound in the purinergic signalling, as well as to evaluate its effects *in vivo*.

4. Materials and Methods

4.1 Copper complexes and chemotherapeutics

The copper complexes (**Figure 4**) and ligands were synthesized and kindly provided by Dr. Wendell Guerra (Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica, Uberlândia, MG, Brazil). Doxorubicin (DOX) and docetaxel (DTX) were purchased from Sigma-Aldrich. All compounds were diluted in DMSO.

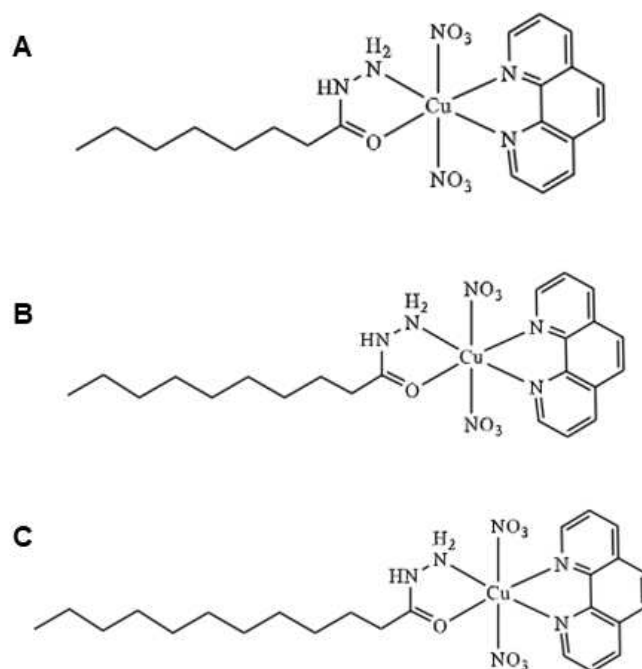


Figure 4. Structure of copper complexes. In (A) Complex **1**, formed by 1,10-phenanthroline and octanohydrazide, in (B) Complex **2**, formed by 1,10-phenanthroline and decanohydrazide and in (C) Complex **3**, formed by 1,10-phenanthroline and dodecanohydrazide.

4.2 Cell lines and culture

The human breast cancer cell lines MCF7 (luminal breast cancer), MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), MDA-MB-157 (triple-negative breast cancer), and MDA-MB-453 (HER2+), and human breast epithelial cell line MCF-10A (non-tumorigenic) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA). MCF7 was cultured in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640, Gibco). MDA-MB-231 was cultured in Leibovitz's medium (L-15, Gibco). MDA-MB-453 and MDA-MB-157 were cultured in Iscove's Modified

Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco). MCF-10A was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F12, Gibco), supplemented with 20 ng/mL EGF (Gibco), 0.5 µg/mL hydrocortisone (Sigma-Aldrich), and 10 µg/mL insulin (Gibco). All culture media were supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 50 µg/mL gentamicin (Cutilab). The cells were grown at 37 °C, under humidified and 5% CO₂ atmosphere, except MDA-MB-231 cells incubated without CO₂.

4.3 MTT assay

MCF7 (8.0×10^3 cells/well), MDA-MB-231 (1.5×10^4 cells/well), MDA-MB-157 (8.0×10^3 cells/well), and MDA-MB-453 (8.0×10^3 cells/well), and MCF-10A (1.5×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates. The cells were incubated at 37 °C for 24 h prior to treatments. The culture medium was then removed and replaced with 150 µL of each copper complexes, ligands, DOX, or DXT solution at different concentrations (in the range of 0 to 160 µM). All treatments were performed in appropriate culture media supplemented with 10% v/v FBS. After 24 or 48 h of incubation, MTT (0.5 mg/mL, Invitrogen) was added to the wells (4 hours, 37°C), followed by the removal of the MTT solution, and the addition of 200 µL/well of DMSO (Sigma-Aldrich) to solubilize the formazan. Absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader (Thermo Plate, TP-Reader). The percentage of cell viability was calculated relative to cells treated with the vehicle (0.5% DMSO), considered as 100% of viable cells.

4.4 Scratch Assay (Wound-Healing)

MDA-MB-231 cells were firstly seeded at 2.0×10^5 cells per well in 12-well plates in order to obtain 80 - 90% confluence. Then, a scratched area was created using a sterile 200 µL pipette tip on 90% confluence, the wells were

washed with PBS to remove undetached cells and photographed under an inverted microscope KXD204PH (KOZ-004). Then, the cells were incubated for 24 and 48 h in complete growth medium, and in the presence of Complex 2 at 3.35 or 6.7 μ M. The cell migration into the wound surface was photographed at the end of treatments. The wound area in the images was determined in ImageJ free software. The degree of scratch overgrowth was assessed by calculating the remaining cell-free area compared with the initial scratched area, in samples and in controls treatments, using the formula (F1):

F1: % migration = $(100 * (\Delta t_0 - t_A)) / MCtA$, in which:

$\Delta t_0 - t_A$ = Variation in wound width between initial time (t_0) and the final time analyzed (24 or 48h).

MCtA = average of the control (untreated cells) to $\Delta t_0 - t_A$.

4.5 Clonogenic assay

MDA-MB-231 cells were plated at a density of 5.0×10^2 cells per well in 6-well plates and incubated for 24 h prior to the treatments. Then, the cells were treated with Complex 2 at 3.35 or 6.7 μ M for 24 or 48 h. After treatments, the medium was changed, and the cells were cultured for 14 days. The colonies formed were then washed with PBS, fixed with formaldehyde 4% v/v and then in methanol for 20 min. The colonies were stained with crystal violet solution (0.5% v/v) and photographed using L-Pix (Loccus Biotecnologia). To quantify the number of colonies in each well, they were treated with 0.3 mL of acetic acid 33% and 0.1 mL of this solution was transferred to 96-well plates. The absorbance was determined at 570 nm in a microplate reader (Thermo Plate, TP-Reader). The quantitative determination of colony formation was calculated in relation to

the cells incubated with complete medium without treatment, considered as 100% of colony formation.

4.6 ATP, ADP, and AMP hydrolysis assay

Measurement of ATP, ADP, and AMP hydrolysis was performed as described previously in our work (DA SILVA; DE MELO NETO; MARTINS; DE SOUSA CARDOSO *et al.*, 2022). Briefly, MDA-MB-231 cells were plated at a density of 2.0×10^5 cells per well in 24-well plates and treated with Complex 2 at 2.7 or 1.35 μM for 12 or 24 or 48h. After, cells were washed three times with a reaction mix containing 2.0 mM CaCl_2 , 120.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 10.0 mM Glucose, and 20.0 mM Hepes, pH 7.4, at 37°C, and incubated with 20.0 mM ATP, ADP, or AMP prepared in the reaction mix. After 20 min, the reaction was stopped by transferring a 0.2 mL aliquot to a tube containing 0.2 mL of 10% m/v cold trichloroacetic acid (TCA), and then 1.0 mL of malachite reagent was added to each tube. Inorganic phosphate (P_i) released was measured at 630 nm. After reaction, cells were solubilized in 100 μL of NaOH (1.0 M), and subsequently frozen for 24 h. Finally, an aliquot was collected, and protein concentration was measured using the Bradford assay 1976 (BRADFORD, 1976). Enzyme activity was expressed in nmol of P_i released/minute/milligram of protein.

4.7 qPCR analysis

Total RNA was extracted from MDA-MB-231 cells treated Complex 2 at 2.7 or 1.35 μM for 48h using Trizol Reagent (Invitrogen), according to manufacturer instructions. The concentration, purity, and integrity of each sample was checked spectrophotometrically in a Nanodrop 1000 (ThermoFischer) and in 1.5% agarose gel. Then, cDNA was synthesized using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. qPCR

was performed in a StepOnePlus System (Applied Biosystems) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) also according to the supplier's protocols. The targeted genes analyzed were interleukin-1 (*IL-1*), interleukin-6 (*IL-6*), Transforming growth factor-beta (*TGF-β*), Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1 (*ENTPD1*), Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (*ENTPD2*), Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-3 (*ENTPD3*), Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-5 (*ENTPD5*), ecto-5'-nucleotidase (*NT5E*), which were normalized by β -2-microglobulin (β 2M) expression. Details of the primers used are described in **Table 3**. The gene expression was obtained using the comparative Cq method after optimization of the standard comparative curve.

Table 3: Primers used in the relative quantification of the evaluated genes.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>β2M</i>	5'CCTGCCGTGTGAACCATGT3'	5'GCGGCATCTTCAAACCTCC3'
<i>IL-1β</i>	5'ACAGGATATGGAGCAACAAGTGG3'	5'GGGCTTATCATCTTTCAACACGC3'
<i>IL-6</i>	5'GATTCCAAAGATGTAGCCGCC3'	5'ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC3'
<i>TGF-β</i>	5'GTACCTGAACCCGTGTTGCTC3'	5'CAGGAATTGTTGCTGTATTTCTGG3'
<i>ENTPD1</i>	5'TGTGGTGGAGAGGAGCCTCA3'	5'GCTGAACCACCTTGTTTTCTGAC3'
<i>ENTPD2</i>	5'TGCTGGAGAACTTCATCAAGTACG3'	5'CAAAGTGATCTGGGTAGAGGCAC3'
<i>ENTPD3</i>	5'CTCCCTCCAGGACTGAAGTATGG3'	5'GCATACACTCCTCAAAGGCTCTG3'
<i>ENTPD5</i>	5'CAAGGCTCTGCTCTTTGAGGTAA3'	5'CGTGATTTGGGTGGAGGCT3'
<i>NT5E</i>	5'CTCATCGCTCAGAAAGTGAGGG3'	5'TTGGAAGGTGGATTGCCTGT3'

4.8 Statistical analysis

All data were expressed as mean $\pm$ standard deviation obtained from the experiments. Data were analyzed by Student's t test or one-way ANOVA with a Tukey–Kramer or Dunnet post-tests. The statistical significance was considered

significant when $p < 0.05$. Half of the maximum inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated using non-linear regression and selectivity index was calculated by the ratio between the IC_{50} values corresponding to the non-tumor cell lineage (MCF-10A) and the IC_{50} values corresponding to the BC cell lines. GraphPad Prism (v. 7.0) (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used to perform all the statistical analyses.

References

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

CAMPOS-CONTRERAS, A. D. R.; DÍAZ-MUÑOZ, M.; VÁZQUEZ-CUEVAS, F. G. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. **Cells**, 9, n. 7, Jul 3 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>

CHEN, J.; WEI, Y.; YANG, W.; HUANG, Q. *et al.* IL-6: The Link Between Inflammation, Immunity and Breast Cancer. **Front Oncol**, 12, p. 903800, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.903800>

DA SILVA, F. C.; DE MELO NETO, A. B.; MARTINS, C. A.; DE SOUSA CARDOSO, T. C. *et al.* Is the regulation by miRNAs of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase genes involved with the different profiles of breast cancer subtypes? **Purinergic Signal**, 18, n. 1, p. 123-133, Mar 2022. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09824-4>

ESQUER, H.; ZHOU, Q.; ABRAHAM, A. D.; LABARBERA, D. V. Advanced High-Content-Screening Applications of Clonogenicity in Cancer. **SLAS Discov**, 25, n. 7, p. 734-743, Aug 2020. <https://doi.org/10.1177/2472555220926921>

FAMTA, P.; SHAH, S.; JAIN, N.; KUMAR, K. C. *et al.* Tumor-promoting aftermath post-chemotherapy: A focus on breast cancer. **Life Sci**, 310, p. 121125, Dec 1 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121125>

FANFONE, D.; WU, Z.; MAMMI, J.; BERTHENET, K. *et al.* Confined migration promotes cancer metastasis through resistance to anoikis and increased invasiveness. **Elife**, 11, Mar 8 2022. <https://doi.org/10.7554/eLife.73150>

FENG, L. L.; CAI, Y. Q.; ZHU, M. C.; XING, L. J. *et al.* The yin and yang functions of extracellular ATP and adenosine in tumor immunity. **Cancer Cell Int**, 20, p. 110, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01195-x>

HACKING, S. M.; YAKIREVICH, E.; WANG, Y. From Immunohistochemistry to New Digital Ecosystems: A State-of-the-Art Biomarker Review for Precision Breast Cancer Medicine. **Cancers (Basel)**, 14, n. 14, Jul 17 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14143469>

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M. *et al.* Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, 5, n. 1, p. 66, Sep 23 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

JAFARI, S. H.; SAADATPOUR, Z.; SALMANINEJAD, A.; MOMENI, F. *et al.* Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. 233, n. 7, p. 5200-5213, Jul 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.26379>

LEE, Z. Y.; LEONG, C. H.; LIM, K. U. L.; WONG, C. C. S. *et al.* Induction of Apoptosis and Autophagy by Ternary Copper Complex Towards Breast Cancer Cells. **Anticancer Agents Med Chem**, 22, n. 6, p. 1159-1170, 2022. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210726132543>

MACHADO, P. H. A.; PAIXÃO, D. A.; LINO, R. C.; DE SOUZA, T. R. *et al.* A selective Cu(II) complex with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phenanthroline displays DNA-cleaving and pro-apoptotic properties in cancer cells. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 24450, Dec 27 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03909-1>

MAZUREK, S.; MICHEL, A.; EIGENBRODT, E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. **J Biol Chem**, 272, n. 8, p. 4941-4952, Feb 21 1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.4941>

PAIXÃO, D. A.; MARZANO, I. M.; JAIMES, E. H. L.; PIVATTO, M. *et al.* Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **J Inorg Biochem**, 172, p. 138-146, Jul 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; DABBS, D. J. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**, 12, n. 4, p. 207, 2010. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>

ROMO, A. I. B.; CAREPO, M. P.; LEVÍN, P.; NASCIMENTO, O. R. *et al.* Synergy of DNA intercalation and catalytic activity of a copper complex towards improved polymerase inhibition and cancer cell cytotoxicity. **Dalton Trans**, 50, n. 34, p. 11931-11940, Sep 14 2021. <https://doi.org/10.1039/D1DT01358K>

RUIZ, M. C.; PERELMULTER, K.; LEVÍN, P.; ROMO, A. I. B. *et al.* Antiproliferative activity of two copper (II) complexes on colorectal cancer cell models: Impact on ROS production, apoptosis induction and NF-κB inhibition. **Eur J Pharm Sci**, 169, p. 106092, Feb 1 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106092>

SHAFEI, A.; EL-BAKLY, W.; SOBHAY, A.; WAGDY, O. *et al.* A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast

cancer. **Biomed Pharmacother**, 95, p. 1209-1218, Nov 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.059>

SHI, X.; CHEN, Z.; WANG, Y.; GUO, Z. *et al.* Hypotoxic copper complexes with potent anti-metastatic and anti-angiogenic activities against cancer cells. **Dalton Trans**, 47, n. 14, p. 5049-5054, Apr 3 2018. <https://doi.org/10.1039/C8DT00794B>

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 71, n. 3, p. 209-249, May 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

WHO. **Estimated number of new cases from 2020 to 2040**. 2023. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=20&populations=903_904_905_908_909_935&single_unit=500000. Acesso em: 03/01/2023.

XU, X.; ZHANG, L.; HE, X.; ZHANG, P. *et al.* TGF- β plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 502, n. 1, p. 160-165, Jul 7 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.139>

ZHANG, L.; WU, Z. Y.; LI, J.; LIN, Y. *et al.* Neoadjuvant docetaxel plus carboplatin vs epirubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel in triple-negative, early-stage breast cancer (NeoCART): Results from a multicenter, randomized controlled, open-label phase II trial. **Int J Cancer**, 150, n. 4, p. 654-662, Feb 15 2022. <https://doi.org/10.1002/ijc.33830>

ZHOU, Q.; ZHANG, Y.; LU, L.; ZHANG, H. *et al.* Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF- κ B pathway and mitophagy disorder. **Food Chem Toxicol**, 168, p. 113369, Oct 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113369>

ZOU, Y.; XIE, J.; ZHENG, S.; LIU, W. *et al.* Leveraging diverse cell-death patterns to predict the prognosis and drug sensitivity of triple-negative breast cancer patients after surgery. **International Journal of Surgery**, 107, p. 106936, Nov 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2022.106936>

Supplementary figure

MTT viability assay to determine cell viability of MCF-10A, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB453 and MDA-MB-157 cells after exposure to varying concentrations of compounds Complex 1-3, 1.25 –160 μ M, and the chemotherapy drugs Doxorubicin and Docetaxel, 0.002048 – 160 μ M, for 24 to 48 hours.

