

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

RAIANE APARECIDA DOS SANTOS MACHADO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CANDIDATOS A METALOFÁRMACOS
ASSOCIADOS À ZINCO(II) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE
MAMA**

PATOS DE MINAS – MG

2023

RAIANE APARECIDA DOS SANTOS MACHADO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CANDIDATOS A METALOFÁRMACOS
ASSOCIADOS À ZINCO(II) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE
MAMA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

**Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina Gonçalves
Oliveira**

PATOS DE MINAS-MG

2023

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

M149 Machado, Raiane Aparecida dos Santos, 1995-
2023 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CANDIDATOS A METALOFÁRMACOS ASSOCIADOS À ZINCO(II) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA [recurso eletrônico] / Raiane Aparecida dos Santos Machado. - 2023.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.
Coorientadora: Carolina Gonçalves Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.37>
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. I. Araújo, Thaise Gonçalves de , 1984-, (Orient.). II. Oliveira, Carolina Gonçalves, 1988-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico PPGBIOTEC				
Data:	25/10/2023	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	11:30
	42112BTC004				
Nome do Discente:	Raiane Aparecida dos Santos Machado				
Título do Trabalho:	Avaliação biológica de candidatos a metalofármacos associados a Zinco(II) em linhagens celulares de câncer de mama				
Área de concentração:	Biociências				
Linha de pesquisa:	Prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Prospecção de produtos bioativos naturais e sintéticos para o tratamento dos cânceres de próstata e mama				

Reuniu-se remotamente, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Professores Doutores: Gabriela Alves Moreira - Vaxxinova; Celso Oliveira Rezende Júnior - IQ/UFU; Thaise Gonçalves de Araújo - IBTEC/UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

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

Aprovada

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/02/2024, às 10:47, 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 **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/02/2024, às 16:45, 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 **Gabriela Alves Moreira, Usuário Externo**, em 03/02/2024, às 11:16, 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 **5147753** e o código CRC **08B26C5B**.

RAIANE APARECIDA DOS SANTOS MACHADO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CANDIDATOS A METALOFÁRMACOS
ASSOCIADOS À ZINCO(II) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER MAMA**

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

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU

Dra. Gabriela Alves Moreira - Vaxxinova

Prof. Dr. Celso Oliveira Rezende Júnior - UFU

PATOS DE MINAS – MG

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus pela saúde, força e coragem que me foram dadas para superar os obstáculos encontrados ao longo dessa jornada acadêmica. Houve incontáveis momentos em que pensei em desistir, mas persisti com determinação até o fim.

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Zélia, e meu irmão Roldinei, por seu apoio constante em todas as minhas decisões, ajudando-me a alcançar meu título. Ao meu pai, que não está presente desde o início dessa jornada, tenho certeza, de onde estiver, está observando e torcendo por mim. Agradeço por sempre terem proporcionado tudo que estava ao alcance de vocês para que eu me tornasse quem sou hoje. Sem vocês absolutamente nada seria possível.

É inimaginável expressar minha gratidão sem mencionar meu melhor amigo, meu eterno namorado e meu noivo, Otávio. Agradeço de coração por nunca hesitar em fazer todo o possível para me auxiliar a concluir esta fase crucial da minha vida. Obrigada por estar ao meu lado, pelas inúmeras vezes que me levou, me buscou e pacientemente esperou nas incontáveis vezes que precisei ir ao laboratório. Sem a sua ajuda, definitivamente nada disso teria sido possível.

Agradeço aos colegas de laboratório, GBIO e LACCA, que de uma forma ou de outra, me apoiaram durante esta jornada. As conversas, as trocas de experiências e os momentos de descontração, com certeza, tornaram o percurso um pouco mais leve. Embora muitas pessoas tenham me ajudado, é impossível não expressar um agradecimento especial a Raoni, Fernanda e Dayanne. Tudo que aprendi e tudo que realizei, foi graças a vocês.

À Thaise que foi minha orientadora durante a graduação e agora compartilhamos essa fase juntas, sempre foi e continuará sendo uma fonte inesgotável de inspiração para mim. Agradeço por ter aceitado me orientar, pela paciência, pelos ensinamentos e pelos preciosos momentos que compartilhamos juntas novamente. Sempre sentirei um imenso orgulho em afirmar que você é minha orientadora.

Agradeço a Dra. Gabriela e ao Prof. Dr. Celso, por terem aceitado participar da banca de defesa e colaborar com a melhoria desse trabalho.

Agradeço a UFU, CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio e fomento.

RESUMO

O câncer de mama (CAM) é a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada no mundo. Apesar dos avanços nas estratégias terapêuticas, o número de óbitos permanece crescente, associados, especialmente, à resistência das células tumorais aos medicamentos utilizados. Nesse contexto, metalofármacos têm se destacado, sendo o Zinco(II) um dos conjugados mais utilizados para quelação de compostos-divalentes, com promissora atividade antitumoral. O objetivo do presente estudo foi avaliar as atividades biológicas dos compostos hidrazona, semicarbazona, tiossemicarbazona complexados à Zinco(II) em células de CAM. Para isso, foram cultivadas as linhagens tumorais MCF7 (CAM luminal), MDA-MB453 (CAM positivo para HER2) e MDA-MB231 (CAM triplo-negativo), além das não tumorais MCF-10A (mama), HUVEC (endotelial de cordão umbilical) e HFF (fibroblasto). Ensaios de citotoxicidade foram conduzidos em todas as linhagens e os experimentos de clonogenicidade, migração, quantificação de transcritos, quimiossensibilização e de sinergismo com Vitamina D foram conduzidos nas células MDA-MB231. Complexo 4 demonstrou ser menos citotóxico às linhagens não tumorais e a complexação com o Zinco(II) aumentou a citotoxicidade dos ligantes, o que não foi observado para Complexo 1 Complexo 2 e Complexo 3. Nas células de CAM triplo-negativo, Complexo 4 inibiu a clonogenicidade, a migração e induziu à morte celular independentemente de caspase, diminuindo a atividade de caspase 8. Além disso, quimiossensibilizou essas células aos tratamentos com Doxorrubicina e Paclitaxel, de modo que o aumento dos transcritos de E-caderian (*CDH1*) sugere sua ação modulatória no mecanismo de transição epitélio-mesenquimal. Por fim, Complex 4 foi sinérgico com a Vitamina D, com redução de dose (DRI > 1,0). Espera-se validar, por meio de futuros ensaios *in vivo*, um novo agente antitumoral capaz de sensibilizar células agressivas de CAM ao tratamento com quimioterápicos, se mostrando uma estratégia promissora em casos de falha terapêutica.

Palavras- chave: Câncer de mama, complexos metálicos, zinco, sinergismo, vitamina D, câncer de mama triplo negativo.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most commonly diagnosed malignancy worldwide. Despite advances in therapeutic strategies, the number of deaths still increases, associated especially with the resistance of tumor cells to the drugs used. In this context, metallopharmaceuticals have stood out, with Zinc(II) being one of the most used conjugates for chelating divalent compounds, with promising antitumor activity. The objective of the present study was to evaluate the biological activities of the compounds hydrazone, semicarbazone, thiosemicarbazone complexed with Zinc (II) in BC cells. For this, the tumor cell lines MCF7 (luminal BC), MDA-MB453 (HER2-positive BC) and MDA-MB231 (triple-negative BC) were cultivated, in addition to the non-tumor MCF-10A (breast), HUVEC (umbilical vein endothelial) and HFF (fibroblast). Cytotoxicity, clonogenicity, migration, transcript quantification, chemosensitization and synergism with Vitamin D assays were conducted on MDA-MB231 cells. Complex 4 demonstrated to be less cytotoxic to non-tumor cell lines and complexation with the metal increased the cytotoxicity of the ligands, which was not observed for Complex 1, Complex 2 and Complex 3. In triple-negative BC cells, Complex 4 inhibited clonogenicity, migration and induced caspase-independent cell death, decreasing caspase 8 activity. Furthermore, Complex 4 chemosensitized these cells to treatments with Doxorubicin and Paclitaxel, so upregulation of CDH1 (E-cadherin) transcripts suggests the modulatory action of Complex 4 on epithelial-mesenchymal transition mechanism. Finally, Complex 4 was synergistic with Vitamin D, with dose reduction (DRI > 1.0). It is expected to validate, through future in vivo assay, a new antitumor agent capable of sensitizing aggressive BC cells to treatment with chemotherapy, proving to be a promising strategy in cases of therapeutic failure.

Keywords: Breast cancer, metallic compounds, zinc, synergism, D vitamin, triple negative breast cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	do inglês, <i>The American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteína Quinase B
B7 – 1	Proteína de Membrana B7
BRCA 1	Câncer de Mama Tipo 1
BRCA 2	Câncer de Mama Tipo 2
Ca	Cálcio
CAM	Câncer de Mama
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
Co	Cobalto
Cu	Cobre
CYP27B1	Enzima 1 α -hidroxilase
DBM	Doença Benigna da Mama
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ERBB2	Tirosina Quinase 2 do Receptor erb-b2
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESR1	Receptor de Estrogênio 1
ESR2	Receptor de Estrogênio 2
Fe	Ferro
gDNA	DNA genômico
GRB7	Proteína Ligada ao Receptor do Fator de Crescimento 7
HER2	Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HER2 – E	Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano-Enriquecido
Hz	Hidrazona
IA	Inibidor de Aromatase

IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK	Janus Quinase
K	Potássio
Ki67	Marcador Nuclear de Proliferação Celular
MCF7	Célula Tumoral Derivada de Adenocarcinoma Mamário
MEK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
mtDNA	DNA mitochondrial
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
Na	Sódio
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
Ni	Níquel
NQSC	Naftoquinona Semicarbazona
NQTs	<i>orto</i> - Naftoquinona tiossemicarbazona
P53	Proteína Supressora Tumoral
PARP	poli (ADP – ribose) polimerase
PARP1	poli (ADP – ribose) polimerase 1
PD-1	Proteína de Morte Programada 1
PD-L1	Ligante de morte programada 1
PD–L2	Ligante de morte programada 2
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PGAP3	Anexo pós-GPI à Proteína Fosfolipase 3
Pol II	RNA Polimerase II
Pt	Platina
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
RPMI–1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RXR	Receptor Retinóide X
SCs	Semicarbazona

SFB	Soro fetal bovino
SPECT	Tomografia por Emissão de Fóton Único
STARD3	Domínio de Transferência Lipídica Relacionado a StAR contendo 3
TF	Fatores de Transcrição
TH	Terapia Hormonal
TNM	do inglês <i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TSCs	Tiosemicarbazona
VD	Vitamina D
VDR	Receptor de Vitamina D
VDRE	Elementos de Resposta à Vitamina D
ZF	Dedos de Zinco
ZIP7	Transportador de Zinco 7
Zn	Zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1.INTRODUÇÃO	11
1.1 Problema.....	11
1.2 Hipótese.....	13
1.3 Objetivos	13
1.3.2 Objetivos específicos.....	13
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1 A mama e suas patologias	15
2.2 Câncer de mama: etiologia e classificação	17
2.3 Câncer de mama: tratamento	22
2.4 Metalofármacos no tratamento de tumores	26
2.5 O potencial da vitamina D.....	29
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2	46
BIOLOGICAL EVALUATION OF CANDIDATES FOR METALLODRUGS ASSOCIATED WITH ZINC(II) IN BREAST CANCER CELL LINES	46
2. Materials and Methods	50
2.1. Chemicals, drugs, and reagents.....	50
2.2 Synthesis of the compounds	50
2.3 Cell culture	51
2.4 MTT assay	52
2.5 Clonogenic assay	53
2.6 Scratch wound healing assay.....	53
2.7 Enzymatic activity of Caspases 3 and 8	53
2.8 qPCR assay.....	54
2.9 Chemosensitization	55
2.10 Chou-Talalay	55
2.11 Statistical analysis	55
3 Results.....	56
3.1 Cytotoxicity of Zn(II) complexes to cell lines	56
3.2 Colony formation and migration of MDA-MB231 cells.....	60
3.4 Enzymatic activity of CAS3 and CAS8	61
3.5 Transcriptional modulation mediated by treatment with Complex 4.....	62
3.6 Complex 4 sensitizes MDA-MB231 cells to treatment with Doxorubicin and Paclitaxel	63
3.7 Synergism of Complex 4 and Vitamin D	63

4. Discussion	64
5. Conclusion	67
Supplementary Figure 1.....	68
Supplementary Table 1	69
References.....	72

CAPÍTULO 1

1.INTRODUÇÃO

1.1 Problema

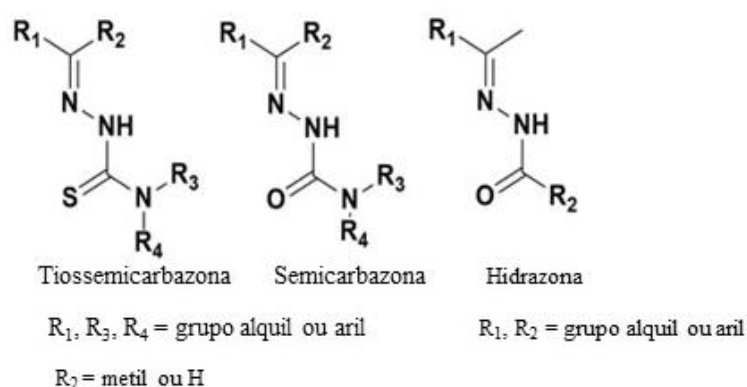
O câncer é uma das causas de maior mortalidade e morbidade no mundo, com mais de 10 milhões de novos casos e mais de seis milhões de mortes por ano (INCA, 2020). Devido às mudanças estruturais na dieta, estilo de vida, fatores ambientais e aspectos bioquímicos e moleculares, sua incidência tem aumentado nos últimos anos (ZHENG, 2016). Segundo o INCA, para o triênio 2023-2025, são estimados para cada 100 mil habitantes, 52,38 novos casos na região Sudeste; 47,31 no Centro-Oeste; 42,11 na região Nordeste; 41,06 na região Sul e 27,73 no Norte do país (INCA, 2023).

O câncer de mama (CAM) é o mais incidente e responsável por cerca de 30% de todos os diagnósticos da doença em mulheres americanas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). No Brasil foi responsável 11,84 mortes/100.000 habitantes em 2020, com os maiores valores nas regiões Sudeste e Sul (INCA 2023). Embora os avanços na triagem, na detecção precoce e no tratamento adjuvante sejam os principais responsáveis pelo declínio da mortalidade em países de alta renda, a maioria dos novos casos vem sendo registrado em países de baixa e média rendas, onde as taxas de morte por CAM estão aumentando (BARRIOS; REINERT; WERUTSKY, 2018). Quando localizada ou regionalmente avançada, a doença é potencialmente curável com terapia local e sistêmica. A recorrência a distância é comum e é a principal causa de morte pela doença (ANAMPA; MAKOWER; SPARANO, 2015).

O desenvolvimento de novos tratamentos exige múltiplas abordagens e diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas e testadas, com especial destaque à química medicinal. Compostos orgânicos como semicarbazonas (SCs), hidrazonas (Hzs) e tiossemicarbazonas (TSCs) (Figura 1), e seus complexos metálicos, já demonstraram atividades antitumorais (dos SANTOS, 2016; DEMORO et al., 2019; LI et al., 2018). Bases de Schiff, ou seja, compostos com ligações C=N preparados pela condensação de um aldeído com uma amina primária, quando ligadas à íons metálicos, interagem diretamente com a membrana celular e causam danos por estresse oxidativo (MILOSAVLJEVIC, 2016). Nesse contexto, metais de transição como cobre - Cu(II) e zinco - Zn(II) têm se mostrado promissores. Zn(II) intracelular é importante para células cancerígenas que se dividem rapidamente e diferentes vias ativadas em células normais são desreguladas nas células cancerígenas. Vogel-González e colaboradores

avaliariam diferentes marcadores metastáticos e observaram que a concentração de Zn(II) era essencial para regular o microambiente de células metastáticas cerebrais de CMTN, o que também melhorou a atividade de SerpinB2, que permite que células malignas escapem do sistema imune (SULLIVAN et al., 2021; VOGEL-GONZÁLEZ et al., 2021), assim como níveis elevados de zinco foram encontrados em cânceres de mama, colorretal e de cabeça e pescoço, enquanto cânceres como próstata, fígado e estômago esses níveis se encontraram reduzidos (GRATTAN; FREAKER, 2012; GUMULEC, 2011). Esse íon é responsável por manter a integridade do DNA, inibe a oxidação e suprime a atividade do fator nuclear kB (NF-kB), considerado um mediador central do processo inflamatório e da imunidade inata (HOANG, 2016).

Figura 1. Estrutura geral das tiossemicarbazonas (TSC), semicarbazonas (SC) e hidrazonas (Hz).



Fonte: Adaptado Costa (2020) e Soares (2012)

Cui e colaboradores identificaram uma correlação entre altos níveis de zinco no tecido mamário e o início da carcinogênese (CUI et al., 2007). Também foi identificado um aumento de zinco em tumores que expressavam receptores hormonais (FARQUHARSON et al., 2009). Além disso, células cancerígenas de mama resistentes à terapia hormonal (TH) com tamoxifeno apresentaram aumento do zinco intracelular (TAYLOR et al., 2007). Assim, o influxo de zinco é favorecido em células tumorais mamárias, metabolicamente mais ativas e, portanto, propensas à ação farmacológica de complexos metálicos, com menor toxicidade (HOANG, 2016).

A vitamina D (VD), por sua vez, é uma vitamina lipossolúvel que desempenha um papel importante na homeostase do cálcio e do fósforo. Recentemente, uma extensa pesquisa sobre suas ações extra esqueléticas associou sua deficiência a um risco aumentado de infecção, diabetes *mellitus* tipos 1 e 2, doenças cardiovasculares, obesidade, asma, doença inflamatória

intestinal e cânceres de cólon, mama, próstata e ovário. De fato, a VD induz a apoptose, estimula a diferenciação celular, é anti-inflamatória e antiproliferativa e inibe a angiogênese, invasão e metástase (DE LA PUENTE-YAGÜE et al., 2018). Portanto, seu potencial anticarcinogênico é evidente (SHAO; KLEIN; GROSSBARD, 2012; VOUTSADAKIS, 2021). Além disso, a associação da VD com diferentes compostos vem sendo estudada, como sua combinação com Talazoparibe (inibidor de poli (ADP – ribose) polimerase, PARP) para o tratamento de câncer de mama triplo negativo (CMTN) e com metalofármacos como cisplatina ou carboplatina para o tratamento do câncer de próstata (MOFFATT; JOHANNES; MILLER, 1999; WONG et al., 2022).

1.2 Hipótese

Novos metalofármacos associados a Zn(II) são ativos em células de CAM, sendo passíveis de serem combinados à VD para o tratamento desses tumores.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar, por meio de ensaios *in vitro*, a ação de complexos metálicos de Zn(II) conjugados à base de Schiff em modelos celulares representativos de CAM.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos complexos mistos de Zn(II) e seus ligantes em linhagens tumorais mamárias;
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos mistos de Zn(II) em linhagens não tumorais;
- Determinar o IC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% a viabilidade celular) e a seletividade de cada complexo misto de Zn(II);
- Determinar o potencial do complexo mais seletivo em inibir mecanismos tumorais e modular a expressão gênica em células de CMTN;

- Avaliar interações entre o complexo mais seletivo e a VD e o potencial do tratamento combinado em reverter a resistência das células de CMTN ao tratamento com Doxorubicina e Paclitaxel.

1.4 Justificativa

Os avanços científicos têm viabilizado uma melhora no prognóstico de pacientes com CAM. Contudo, o número de mortes permanece expressivo, o que se agrava em um cenário crescentes de casos (LIANG et al., 2020). Novas terapias devem ser desenvolvidas para tratar e prevenir essa doença e o sucesso dos complexos metálicos abriu promissores caminhos nos desenhos de estratégias terapêuticas assertivas (LI et al., 2021). Nesse contexto, a utilização do zinco em fármacos é interessante, pois este é associado a uma menor cardiotoxicidade e hepatotoxicidade, quando comparados às drogas à base de platina (ALAJMI, 2018), uma vez que participa naturalmente de diferentes processos celulares. O transportador de zinco ZIP7, presente na membrana do retículo endoplasmático, é responsável pelo seu transporte para o citoplasma, controlando a homeostase intracelular do íon. Portanto, metalofármacos associados a Zn(II), em especial semicarbazona, hidrazona e tiosemicarbazonas podem conduzir à morte de células tumorais. Além disso, são passíveis de serem combinados a outros compostos, de modo que a VD se destaca diante de seu potencial anticancerígeno ao inibir a proliferação, induzir a apoptose e autofagia, além de ser capaz de suprimir a angiogênese (FLEET et al., 2012).

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

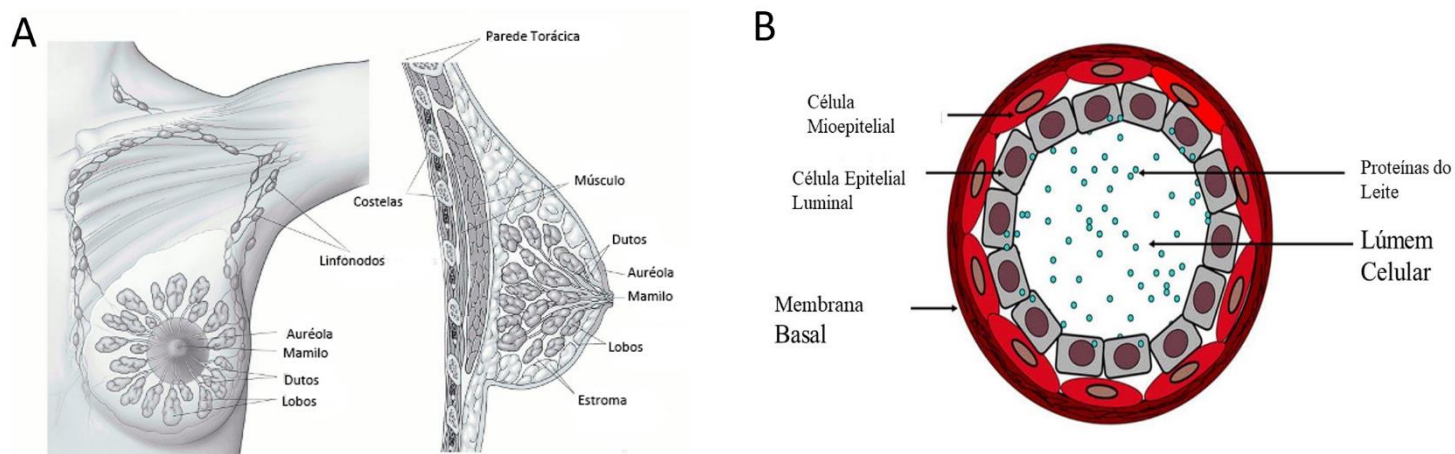
2.1 A mama e suas patologias

A glândula mamária se encontra sobrejacente ao músculo peitoral maior, formada por tecido glandular, camadas de gordura e pele. Anatomicamente, é constituída por cerca de 12 a 20 lobos que são divididos em lóbulos menores responsáveis pela produção do leite. Os lóbulos se conectam através de pequenos canais denominados ductos, os quais transportam o leite até o mamilo (Figura 2A) (AKRAM et al., 2017; BODINE, 2017). Essa porção glandular possui um parênquima epitelial embutido em uma matriz de células estromais, que regulam sua proliferação, diferenciação e sobrevivência (ARENDT et al., 2010). O compartimento estromal é composto por células mesenquimais (fibroblastos, células sanguíneas e leucócitos) e matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágenos, proteoglicanos, por exemplo) (KASS et al., 2007).

O epitélio mamário consiste em duas linhagens de células diferenciadas dispostas concêntricamente: uma camada interna de células epiteliais lumbais e uma camada externa de células mioepiteliais, ambas cercadas pela membrana basal (STINGL et al., 2006) (Figura 2B). As células mioepiteliais formam uma camada protetora semi-contínua que separa o epitélio da mama do estroma circundante (PANDEY, 2010). Contudo, a integração dos sinais promovidos pelas interações célula-célula e célula-matriz é necessária para regular muitos aspectos do comportamento celular, incluindo polaridade, proliferação, adesão e sobrevivência, essenciais à homeostase (SHAW; WROBEL; BRUGGE, 2004).

Os fibroblastos são componentes importantes do estroma mamário, sendo responsáveis pela síntese de fatores de crescimento, produção de metaloproteinase e deposição de matriz extracelular (ARANDA; GUTIERREZ, 2021). Já o sistema linfático forma uma extensa e complexa rede de vasos periductais e perilobulares que drenam, principalmente, para os linfonodos axilares (GIULIANO et al., 2017; SUAMI et al., 2008). Finalmente, o tecido adiposo cobre desde a clavícula até a axila e se estende ao redor do centro da caixa torácica. Sua principal função é armazenar o excesso de energia e liberá-lo quando exigido pelo organismo (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020).

Figura 2: Representação da anatomia mamária e seus ductos. Em (A) glândula mamária em plano sagital e em plano coronal. Em (B) corte transversal de um ducto da glândula mamaria normal.



Fonte: American Cancer Society e adaptado de Pandey, 2010.

Alterações na mama são, em sua maioria, benignas, as quais correspondem a 50% dos diagnósticos, sendo mais comuns em mulheres em idade fértil, com pico entre 30 e 50 anos. As Doenças Benignas da Mama (DBMs) englobam um espectro de características histológicas, sendo subdividas em não proliferativas, proliferativas sem atipias e hiperplasias atípicas (HARTMANN, 2005). Estão incluídos os casos de fibroadenoma, papilomatose, doença fibrocística, adenoma lactante, ginecomastia, tumor filodes, ectasia do ducto mamário, mastite e mastalgia. As proliferativas ou atípicas apresentam um risco aumentado ao CAM e o tumor filóides é potencialmente maligno (ARANDA, GUTIERREZ, 2021). O diagnóstico de DBMs inclui a análise clínica, procedimentos radiológicos e, se necessário, histológicos, além do acompanhamento de pacientes (STACHS et al., 2019).

As neoplasias malignas geralmente começam a se desenvolver a partir da hiperproliferação ductal, sendo essas as lesões mais comumente identificadas, denominadas de carcinoma ductal. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é definido como uma proliferação de células epiteliais neoplásicas que estão contidas no lúmen dos ductos mamários. Ao atravessar a membrana basal, o câncer se torna invasivo (AKRAM et al., 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; BODINE, 2017; DE BOER et al., 2021; LIU et al., 2021; LOPEZ:GARCIA et al., 2010). O CAM também pode acometer os lóbulos mamários e permanecer *in situ* ou invadir tecidos adjacentes. Além disso, o microambiente tumoral, constituído por células estromais, macrófagos, linfócitos e/ou fibroblastos, desempenha papel vital no surgimento e progressão da doença (GARDEZI et al., 2019; SUN, 2017).

A incidência do CAM é maior durante a pós menopausa (STACHS et al., 2019) e sua identificação tornou-se mais comum com a mamografia, evidenciando a importância de

políticas públicas dedicadas ao diagnóstico precoce de doenças crônicas (HARTMANN, 2005). À medida que os tumores se desenvolvem, estes se tornam progressivamente menos organizados com a perda das estruturas ductais e lobulares (MILLER, 2003). Os processos que envolvem a disseminação de células transformadas de uma lesão primária para órgãos distantes é a principal causa de letalidade por câncer (SUHAIL, 2019). Os linfonodos axilares adjacentes ao tumor primário são frequentemente o primeiro local de metástase, seguido do fígado, pulmões e ossos. O CAM metastático permanece incurável (WANG, 2018) e a taxa de sobrevida em cinco anos de pacientes com a doença localizada na mama é de 98,8%. Esse valor cai para 85,8% para pacientes com metástases nos linfonodos axilares regionais (CHANG et al., 2020).

2.2 Câncer de mama: etiologia e classificação

De acordo com o *American Cancer Society*, estima-se que, para o ano de 2023, serão diagnosticados 1,9 milhão de novos casos de câncer e 600 mil óbitos serão registrados devido à doença nos Estados Unidos. Para o mesmo período são esperados 297.790 diagnósticos de CAM e, destes, 43.170 irão à óbito (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

Em 2020, foram registradas 2,3 milhões de mulheres com CAM e 685 mil mortes em decorrência da doença em todo mundo. Nos Estados Unidos, o CAM é a segunda maior causa de morte entre as mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pulmão. No final de 2020, havia 7,8 milhões de mulheres vivas diagnosticadas com CAM, tornando-o o câncer mais prevalente no mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY; WHO, 2022). No Brasil, de acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), para cada ano do triênio 2023-2025, serão contabilizados 704 mil novos casos de câncer. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CAM feminino ocupa a primeira posição como o mais frequente em todas as regiões brasileiras (GOV, 2023).

O CAM é multifatorial. Diversos fatores de risco são conhecidos atualmente e são divididos em não modificáveis e modificáveis. Nos primeiros estão idade, sexo, características genéticas (5-7%), histórico familiar, menarca precoce e menopausa tardia. Os modificáveis geralmente estão associados a fatores reprodutivos, exposição à radiação, terapia de reposição hormonal, estilo de vida, dieta rica em gordura, exposição a produtos químicos como organoclorados e tabaco e infecções recorrentes e crônicas (CLEMONS, 2001; YOUN; HAN, 2020).

O CAM, acomete, principalmente, mulheres com idade entre 40 e 49 anos. Quando identificado em indivíduos mais jovens (abaixo dos 40 anos – 10% dos casos), tendem a se apresentar em estágios mais avançados e mais agressivos, evidenciando um pior prognóstico (SHOEMAKER et al., 2018). O histórico familiar também é importante, principalmente quando parentes de primeiro grau são diagnosticados com CAM, o que aumenta de 2 a 4 vezes a chance de desenvolver a doença, dependendo do número de familiares afetados e a idade em que forem diagnosticados (VAN DRIEL et al., 2016; ZHENG et al., 2021). Aproximadamente 15% dos casos estão incluídos nessa situação (LIU et al., 2021). De fato, alguns genes têm se mostrado relevantes em famílias com CAM ou câncer de ovário, como os genes Câncer de Mama Tipo 1 e Tipo 2 (*BRCA1* e *BRCA2*). Localizados no cromossomo 17q e 13q, respectivamente, esses genes codificam para fatores que inibem a proliferação celular, controlando o ciclo celular, a transcrição gênica, o reparo do DNA e a apoptose (WANG, 2012). As mutações possuem características hereditárias autossômicas dominantes, são altamente penetrantes (HALL, 1990; WOOSTER, 1994) e correlacionadas com tumores avançados (TURNER, 2012; LAKHANI, 1998; MAVADDAT 2012; BYRSKI, 2010). Finalmente, a exposição prolongada ao estrogênio aumenta o risco da doença, uma vez que o CAM está positivamente associado aos níveis circulantes de estrogênios endógenos (FOLKERD; LØNNING; DOWSETT, 2014). Esta é uma situação vivenciada por mulheres com menarca precoce e/ou menopausa tardia (UNLU et al., 2017).

Finalmente, diferentes fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo obesidade (mulheres na pós-menopausa), consumo excessivo de álcool, sedentarismo e tabagismo, associados a um padrão alimentar não saudável foram correlacionados ao desenvolvimento de tumores mamários. Evidências demonstraram que até 50% dos casos de CAM podem ser prevenidos por práticas saudáveis ao longo da vida (ARTHUR et al., 2020). De fato, a taxa de sobrevivência das pacientes com CAM aumentou significativamente no mundo ocidental nas últimas décadas, devido a mudanças de comportamento das mulheres em relação à saúde, maior e melhor acesso a ferramentas de diagnósticos, triagem populacional bem-organizada e tratamento apropriado. Na Austrália, a sobrevida relativa de cinco anos da doença melhorou de 74% em 1985/1989 para 91% em 2011/2015 (BASU et al., 2020). Nesse contexto, o diagnóstico precoce continua sendo uma estratégia crucial para o seu controle. A detecção em estágio inicial contribui para um melhor prognóstico das pacientes, pois pequenos eventos não metastáticos podem ser tratados de forma eficaz (CEDOLINI et al., 2014). Diferentes tecnologias estão disponíveis, como mamografia, ultrassonografia, ressonância magnética e biópsia. Os métodos

de imagens baseados em radionucleotídeos, incluindo SPECT (Tomografia por emissão de fóton único) e PET (Tomografia por emissão de pósitrons) também têm contribuído significativamente nas decisões clínicas relacionadas à doença (SHAMSI, 2017).

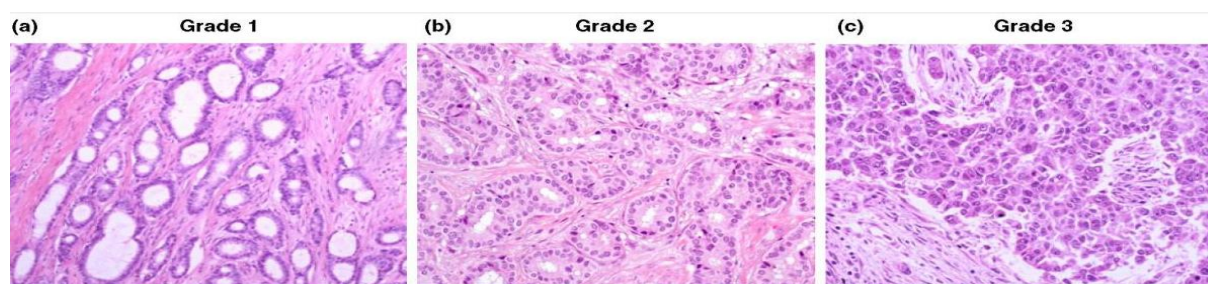
A mamografia utiliza imagens de raio X e é amplamente difundida entre a população (GÖTZSCHE; JØRGENSEN, 2013). Associada a uma redução na mortalidade, tem sido o método com maior custo/benefício no rastreamento do CAM até o momento. No entanto, os resultados falsos-negativos variam de 10 a 30%, sua sensibilidade diminui acentuadamente quando o tecido mamário é denso e para pequenas lesões sua eficiência ainda é discutível (CHEN et al., 2021; KO; MORRIS, 2019). A ultrassonografia pode superar as limitações da mamografia em alguns pacientes, sendo uma ferramenta de rastreamento adicional. É utilizada rotineiramente como medida para distinguir lesões benignas de malignas, pois pode diferenciar entre cistos e tumores sólidos (GARTLEHNER et al., 2013; LERMAN et al., 2006).

A ressonância magnética engloba um espectro de técnicas que permitem que processos fisiológicos e moleculares prévios às alterações morfológicas sejam visíveis. É amplamente utilizada para o diagnóstico médico, estadiamento e acompanhamento da doença. A ressonância magnética dinâmica com contraste é considerada um dos principais métodos, sendo capaz de distinguir lesões benignas das malignas (DONG et al., 2021; O'FLYNN; DESOUZA, 2011). Contudo, resultados falsos-positivos podem levar a mastectomias desnecessárias (CHEN et al., 2021; LEITHNER et al., 2018; PAVIC et al., 2004). Já o SPECT utiliza radionucleotídeos capazes de identificar, sistemicamente, cânceres primários e metastáticos. Estudos demonstraram que a utilização do SPECT-CT pode melhorar a localização de linfonodos pré-operatórios em pacientes com CAM, detectar nódulos que antes não eram encontrados, excluir falsos-positivos e localizar com precisão nódulos axilares (HUSARIK; STEINERT, 2007).

Para a confirmação diagnóstica, a biópsia é realizada e o tumor estadiado (AKRAM et al., 2017). O estadiamento para classificação de tumores malignos (TNM), publicado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), utiliza informações clínicas e patológicas do tamanho do tumor (T), o *status* dos linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M). A classificação T descreve o tamanho da lesão principal (primária) e se esta se espalhou para a pele ou para a parede torácica sob a mama. Portanto, valores elevados de T denotam um tumor maior e ou uma disseminação mais ampla para os tecidos próximos à glândula. Para N são utilizados valores de 0 a 3, os quais indicam se o câncer atingiu os linfonodos próximos à mama e, em caso afirmativo, quantos estão envolvidos. Já o critério M, seguido por 0 ou 1, indica se há metástases em órgãos distantes (AMERICAN CANCER SOCIETY)

O grau histológico também é avaliado de acordo com o sistema de classificação de Nottingham. Para o CAM, o Grau 1 caracteriza o tecido com elevada homologia com a unidade lobular do ducto terminal mamário normal, baixo pleomorfismo nuclear e baixa contagem mitótica. O Grau 2 é definido como intermediário e, no Grau 3, o tumor se encontra pouco diferenciado, com grau acentuado de pleomorfismo celular e mitoses frequentes, sem formação tubular (RAKHA et al., 2010) (Figura 3). Na última edição (AJCC/TNM8), as informações referentes ao TNM, grau e expressão de receptores nas células malignas foram reunidas, estratificando a doença em 4 estágios (0, I, II, III e IV) (TSANG; TSE, 2020).

Figura 3: Grau histológico do câncer de mama avaliado pelo sistema de gradação de Nottingham A. Grau 1. B. Grau 2 e C. Grau 3.



Fonte: Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade, RAKHA *et al.* (2010).

O CAM é classificado molecularmente, sendo estabelecidos quatro subtipos principais: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido (HER2E) e triplo-negativo (MOHAMMED, 2021). Nestes, são considerados os padrões de expressão do receptor de estrogênio α (RE), do receptor de progesterona (RP) e do receptor de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) (KOBOLT, 2012). O estrogênio interage com o RE e o dímero resultante se liga a elementos responsivos ao hormônio no DNA, recrutando cofatores de transcrição e coordenando a expressão de genes que regulam a proliferação e diferenciação de células mamárias (SALVADOR; LLORENTE; GOMIS, 2019). As duas formas do RE, α e β , são codificadas por dois genes diferentes, o receptor de estrogênio 1 e 2 (*ESR1* e *ESR2*), respectivamente. O RE α é utilizado na rotina clínica e as funções desempenhadas pelo RE β é amplamente discutida na literatura científica (YIP; RHODES, 2014). A progesterona, por sua vez, se liga de maneira semelhante ao estrogênio aos receptores nucleares, sendo expressa em duas isoformas diferentes, PRA e PRB. Estas se ligam ao RP, dimerizam e interagem com os elementos responsivos à progesterona, regulando, também, a expressão gênica. Na mama, sugere-se que a progesterona estimula o epitélio mamário humano normal por meio de um mecanismo

parácrino e é um fator de risco para o CAM, já que promove a progressão pré-neoplásica (TRABERT et al., 2020). Finalmente, o HER2 é uma proteína presente na superfície das células do epitélio da glândula mamária normal. Sua superexpressão é identificada em aproximadamente 20% dos CAMs, demonstrando seu papel na instabilidade genômica e proliferação excessiva. Atualmente, o HER2 é considerado um fator de prognóstico importante (DRĂGĂNESCU; CARMOCAN, 2017), uma vez que sua amplificação ativa constitutivamente sua atividade tirosina quinase e estimula a via da proteína quinase ativada por AKT/mitógeno. A amplificação do HER2 aumenta a hipersensibilidade celular à família fator de crescimento epidérmico (EGF) e contribui para a progressão tumoral (SALVADOR; LLORENTE; GOMIS, 2019).

Os cânceres de mama luminal são RE positivos e são divididos em dois subgrupos. O luminal A é o mais comum, de baixo grau e com melhor prognóstico. É positivo para o RE e RP, e negativo para HER2. Os cânceres luminais B tendem a possuir grau mais alto e pior prognóstico, quando comparado ao luminal A. Expressam, em geral, níveis menores de RE e superexpressam genes relacionados à proliferação, com $ki67 > 14\%$. Além disso, podem expressar HER2 juntamente com um dos receptores hormonais, sendo, nesse caso, definidos como híbridos (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018; TSANG; TSE, 2020; VUONG et al., 2014; HARBECK 2019).

O subtipo HER2E compreende aproximadamente 15% de todos os cânceres de mama invasivos sendo negativos para RE e RP (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018; TSANG; TSE, 2020; VUONG et al., 2014). Também expressam altos níveis de tirosina quinase 2 do receptor *erb-b2 (ERBB2)*, (*GRB7*, *PNMT*, *STARD3*, *PGAP3* e *MGC1483*) (HONGISTO, 2014). Os tumores HER2E estão associados a um fenótipo agressivo de células tumorais, resistência a terapias citotóxicas anti-hormonais e baixa sobrevida global (GÜLBEN et al., 2014).

Os tumores que não apresentam RE, RP e HER2 são classificados como CAM triplo negativo (CMTN) e correspondem a 15-20% dos casos (GARRIDO, STRO; LIN; POLYAK, 2019). São lesões invasivas e aproximadamente 46% dos pacientes irão apresentar quadro de metástase, a qual atinge órgãos viscerais e o cérebro. O tempo médio de sobrevida após o primeiro evento metastático é de apenas 13,3 meses e a taxa de recorrência pós-cirúrgica chega a 25%. Após esta, a taxa de mortalidade atinge 75% (YIN et al., 2020).

Diversos estudos demonstraram que diferentes subtipos biológicos estão associados a respostas diversas ao tratamento, e, conseqüentemente, a distintos desfechos da doença.

Atualmente, a decisão terapêutica considera a classificação do tumor, seu grau, estágio e subtipo molecular (FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

2.3 Câncer de mama: tratamento

A terapia do CAM envolve múltiplas abordagens, incluindo cirurgia de lesões operáveis, radioterapia, terapia endócrina e/ou terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia neoadjuvante (antes da cirurgia) ou adjuvante (após a cirurgia) (FISUSI; AKALA, 2019). A decisão é baseada nas necessidades e preferências de cada paciente, objetivando a cura e preservando a segurança (HEIL, 2020). A terapia neoadjuvante foi inicialmente desenvolvida como tratamento de resgate em CAM não metastático, mas inoperável. Posteriormente, foi utilizada em pacientes antes da cirurgia que possuem tumores grandes e operáveis, a fim de reduzir a extensão da cirurgia. Mais recentemente, essa abordagem foi estendida a pacientes com tumores menores para monitorar a resposta e adaptar os tratamentos (MONTEMURRO; NUZZOLESE; PONZONE, 2020).

A mastectomia foi o procedimento padrão para o tratamento do CAM no início do século 20, uma vez que se acreditava que a doença metastatizava de forma ordenada via disseminação loco-regional, o que tornava a cirurgia curativa (COTLAR; DUBOSE; ROSE, 2003). Estudos subsequentes não demonstraram os benefícios da mastectomia radical em comparação com procedimentos cirúrgicos menos agressivos e evidenciaram que a recorrência à distância permaneceu preocupante, independente do procedimento cirúrgico primário (FISHER et al., 2002; FISHER et al., 2002). Nesse sentido, as técnicas cirúrgicas têm priorizado as práticas conservadoras e o tratamento padrão para CAM em estágio inicial é a terapia de conservação da mama, seguida de radioterapia com ou sem agentes sistêmicos adjuvantes (CAVALCANTE et al., 2020).

Gupta e colaboradores (2018) apontaram que o tratamento adjuvante com radiação reduz significativamente a recorrência loco-regional após a cirurgia conservadora, resultando em um melhor prognóstico (GUPTA; OHRI; HAFFTY, 2018). Além disso, as diretrizes mais recentes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomendam a radioterapia fracionada convencional, que consiste em uma dose total de 45,0 Gy e 50,4 Gy administrada em 25 a 28 frações ao longo de 5 semanas ou mais (LIU et al., 2020). No entanto, os benefícios da radioterapia precisam ser equilibrados com os riscos. Após a terapia com radiação, foram

identificadas algumas doenças que podem aumentar o risco de mortalidade do paciente, como doenças cardíacas, câncer de pulmão e de esôfago (TAYLOR et al., 2017).

Nas estratégias sistêmicas, os medicamentos utilizados são classificados em hormonioterapia, terapia-alvo e quimioterapia, os quais podem ser administrados separadamente ou em combinação (SHIEN; IWATA, 2020). A terapia hormonal (TH) é um tratamento que suprime a produção de hormônios ou interfere na sinalização do receptor hormonal para prevenir o desenvolvimento tumoral. A grande parte dos tumores na mama é positiva para receptores hormonais e é tratável com TH. Os medicamentos mais comumente prescritos para a terapia endócrina adjuvante são os moduladores seletivos do receptor de estrogênio, como o Tamoxifeno, e inibidores de aromatase (IAs), como Letrozol, Anastrozol e Exemestano (PEDDIE et al., 2021).

O tamoxifeno combinado com quimioterapia reduz o risco de recorrência da doença, particularmente em mulheres na pré-menopausa. No entanto, o tamoxifeno não deve ser utilizado em mulheres com tumores negativos para o RE (AAPRO, 2001). Por muitos anos, esse fármaco vem sendo utilizado como terapia adjuvante endócrina padrão para o CAM. Contudo, cerca de 63% das pacientes apresentam eventos adversos como ondas de calor, sangramento e corrimento vaginal, câncer do endométrio, histerectomia, distúrbios cerebrovasculares isquêmicos e tromboembolia venosa (PEREZ, 2006). A Aromatase é uma enzima que converte o anel de enona dos precursores de andrógenos, como a testosterona, em um fenol para a síntese de estrogênio. Os IAs são utilizados para bloquear a produção de estrogênio ou bloquear a sua ação nos receptores, ou seja, aplicáveis a mulheres que expressam RE (KHARB et al., 2020). Pacientes tratados com IAs, comparados com aqueles tratados com tamoxifeno, desenvolvem, mais frequentemente, hiperlipidemia, hipercolesterolemia e hipertensão, que são fatores de risco para doenças cardiovasculares (FOGLIETTA et al., 2017).

O trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular do HER2, é a terapia-alvo mais antiga adotada para o controle do CAM. Lesões HER2E possuem baixa resposta à TH e um elevado risco de metástase, recorrência e óbito. Portanto, a inibição da sinalização de HER2 melhorou o prognóstico dessas pacientes e naquelas com CAM metastático, quando utilizado em conjunto com outros quimioterápicos (BRADLEY et al., 2021; NICOLAZZI et al., 2018). No entanto, não está claro como o nível de amplificação de HER2, as características do tumor (em particular o *status* de expressão de RE ou RP) ou outros fatores de risco a que a paciente está exposta podem influenciar na magnitude e no benefício do tratamento. O trastuzumabe é um medicamento caro e associado a toxicidade cardíaca,

principalmente quando administrado com antraciclina (BRADLEY et al., 2021). De acordo com a literatura científica, pacientes que recebem trastuzumabe apresentam um risco 9,54 vezes maior de insuficiência cardíaca quando comparado àqueles que não fizeram uso do medicamento (LONG et al., 2016).

Para o CMTN, recentemente, os inibidores de poli (ADP:ribose) polimerase (PARP) Olaparibe e Talazoparibe foram aprovados para pacientes com mutação germinativa de *BRCA* (LYONS, 2019). *BRCA1* e *BRCA2* codificam para proteínas que reparam danos no DNA e, no CAM, mutações germinativas e inativação bialélica comprometem esse sistema. PARPs são reguladores críticos da resposta celular a danos no DNA e da estabilidade da forquilha de replicação. Em células tumorais mutadas para *BRCA* e tratadas com inibidores de PARP, há um aumento exacerbado do estresse de replicação e desestabilidade da forquilha, sem possibilidade de restauração mediada pelos supressores tumorais, pois estão mutados. Assim, as células morrem por apoptose (SLADE, 2020). A deficiência de recombinação homóloga e a inibição da PARP demonstraram letalidade sintética por diferentes mecanismos relacionados à inibição catalítica da enzima e aprisionamento de complexos PARP-DNA (PANTELIDOU et al., 2019; TUTT et al., 2021). No estudo EMBRACA, foi realizado um ensaio clínico controlado de fase 3 envolvendo pacientes com CAM avançado com mutação germinativa *BRCA1/2* e, para aqueles tratados com Talazoparibe, o risco de progressão da doença ou morte foi 46% menor (LITTON et al., 2018). O estudo OlympiA demonstrou que um ano de terapia adjuvante com Olaparibe pode reduzir significativamente o risco de recorrência e prevenir a progressão para metástase para pacientes portadoras dessas mutações (TUTT et al., 2021).

Para CMTN, atualmente, também se encontra disponível a imunoterapia utilizando Atezolizumabe, um inibidor do ligante de morte programada 1 (PD-L1) que impede sua interação com a proteína de morte programada 1 (PD-1) e B7-1 (uma proteína de superfície celular coestimuladora), revertendo a supressão de células T. O receptor de PD-1 é regulado positivamente em células T ativadas e se liga a dois ligantes conhecidos, PD-L1 e PD-L2. Por meio de interações PD-L1 e PD-1 ocorre a inativação de células T, comprometendo a resposta imunológica contra as células tumorais (PARDOLL, 2012). O bloqueio por anticorpos monoclonais direcionados ao PD-L1, PD-1 e ao antígeno:4 associado a linfócitos T citotóxicos pode restaurar a imunidade anti-câncer pré existente e obter uma resposta clínica duradora em vários tipos de tumores (SUGIE, 2018).

Um estudo randomizado de fase 3 (Impassion 130), avaliou a atividade de nab-paclitaxel combinado com o atezolizumab como terapia de primeira linha para o CMTN avançado

localmente ou inoperável. A combinação levou a uma sobrevida livre de progressão significativamente maior do que o grupo controle (KWAPISZ, 2021; SCHMID, 2020). Pembrolizumab (Keytruda, Merck Sharp & Dohme), um anticorpo monoclonal anti PD-1, demonstrou atividade antitumoral com efeitos adversos de baixo impacto em pacientes com CMTN metastático, especialmente quando utilizado como tratamento de primeira linha. Quando combinado com quimioterapia neoadjuvante, com ou sem carboplatina, apresentou atividade antitumoral promissora, sem grandes alterações nos efeitos adversos graves nos pacientes (SCHMID et al., 2020).

Finalmente, a quimioterapia visa eliminar células transformadas que escaparam do tumor primário antes ou após o procedimento cirúrgico. Dados demonstraram que a quimioterapia adjuvante melhora a sobrevida livre da doença e a sobrevida global em pacientes com CAM (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG), 2005). As antraciclinas se destacam nessa estratégia, sobretudo para o CAM em estágio inicial. A doxorrubicina (Adriamycina, Laboratório Bedford) e a epirrubicina (Ellence, Pfizer Pharmaceuticals) são as mais utilizadas na prática clínica (KHASRAW; BELL; DANG, 2012). A doxorrubicina intercala com o DNA e inibe a topoisomerase II estabilizando-a e impedindo que a dupla hélice do DNA seja reestabelecida, o que interrompe a replicação e interfere nos mecanismos moleculares. Também é capaz de gerar radicais livres que induzem danos ao DNA e à membrana celular, conduzindo à apoptose (RIVANKAR, 2014). A epirrubicina é um análogo da doxorrubicina, com maior permeabilidade da membrana celular e alta eficácia no tratamento do CAM, linfoma não Hodgkin, câncer de ovário e sarcomas de tecidos moles, por exemplo (KHALESEH et al., 2021). Apesar da sua eficácia comprovada, as antraciclinas geralmente causam alopecia, mielossupressão e reações gastrointestinais. Além disso, a cardiotoxicidade foi relatada como associada à dose cumulativa do fármaco, podendo ser aguda, crônica e tardia. São frequentemente progressivas e irreversíveis, levando a disfunção ventricular, insuficiência cardíaca e arritmia (ZHANG et al., 2021).

A adição de um taxano no tratamento contendo antraciclina, seja após ou concomitante ao tratamento, reduz ainda mais o risco de recorrência (SPARANO et al., 2008). São exemplos: Paclitaxel e Docetaxel. Essa classe de medicamento estabiliza os microtúbulos, inibindo sua despolimerização e conduzindo à parada da divisão celular e à degradação cromossômica em fusos multipolares anormais (HORWITZ, 2004; SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979; WEAVER, 2014; ZASADIL et al., 2014). No entanto, o paclitaxel contém uma combinação de óleo de rícino polietilado e etanol como solventes para aumentar sua solubilidade, o que o torna

tóxico e responsável por reação de hipersensibilidade e neuropatia periférica prolongada (ZONG; WU; SHEN, 2017).

Apesar das diferentes estratégias, indivíduos não reagem às terapias, o tumor primário aumenta e metástases linfonodais ou novas metástases à distância são passíveis de ocorrer durante a quimioterapia (JIANG et al., 2021). A progressão metastática depende de etapas biológicas específicas que precisam ser direcionadas para melhorar as estratégias terapêuticas atuais (MASSAGUE, 2016). Embora os avanços na detecção precoce e na terapia tenha resultado na redução de 38% na taxa de mortalidade por CAM, os óbitos são crescentes. Portanto, há uma crítica necessidade de abordagens inovadoras para a terapia do CAM.

2.4 Metalofármacos no tratamento de tumores

Os metais e seus compostos têm sido explorados na medicina desde o início da história. De fato, complexos metálicos exibem uma série de propriedades únicas em comparação com as substâncias puramente orgânicas. Esses complexos decorrem da presença do átomo metálico e do arranjo variável de ligantes em torno desse átomo central (HABALA, 2018), o que determina seu estado de oxidação e sua geometria de coordenação (LAZEREVIC, 2017).

Metalofármacos se destacam na oncologia (HABALA, 2020). A cisplatina [cis-diaminodicloridoplatina (II)], aprovada para uso clínico em 1978, é um dos complexos mais amplamente utilizados no tratamento de câncer de testículo, ovário, bexiga, pulmão, cervical, cabeça e pescoço, gástricos, próstata e mama. Contudo, efeitos colaterais adversos são descritos, como problemas renais graves, reações alérgicas, diminuição da imunidade, distúrbios gastrointestinais, hemorragia e perda auditiva, principalmente em pacientes mais jovens. Atualmente, encontram-se disponíveis drogas de platina (Pt) de segunda geração, como carboplatina [cis-diamina (1,1 – ciclobutanodicarboxilato) platina (II)], aprovada em 1993, ou oxaliplatina [trans-R, R-ciclohexano – (1, 2 – diamina) oxalatoplatina (II)], aprovada em 2002, utilizadas para superar a resistência aos medicamentos e reduzir a toxicidade (DASARI, 2014). No entanto, também estão associadas a efeitos colaterais graves, como por exemplo, ototoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e mielosupressão, bem como desenvolvimento de resistência (MATOS, 2012).

Embora a quimioterapia à base de platina seja o tratamento quimioterápico de primeira linha para a maioria dos cânceres, a resistência a estes medicamentos ainda é um grande obstáculo na obtenção de um tratamento bem-sucedido. Essa resistência é atribuída

principalmente a três mecanismos: (1) diminuição do acúmulo do fármaco nas células, (2) inativação da droga e (3) aumento da capacidade de reparo do DNA (SPIRA, 2004; AMABLE, 2016). Inicialmente, a maioria dos pacientes responde muito bem, no entanto, a recorrência de tumores resistentes à platina representa um evento comum, geralmente associado à disseminação tumoral e metástase (SONEGO, 2019).

Composto metálicos geralmente se ligam ao DNA genômico (gDNA) ou DNA mitocondrial (mtDNA) promovendo lesões e bloqueando a síntese de ácidos nucleicos, a transcrição e tradução. Por conseguinte, são ativados mecanismos de morte como necrose ou apoptose (GHOSH, 2019). A instabilidade genômica é uma das marcas do câncer e o reparo de quebras da dupla fita em células normais é mediado por recombinação homóloga e união de extremidade não homóloga propensa a erros. Já foi descrito que o Receptor de Andrógeno regula genes de resposta a danos no DNA (RYAN et al., 2013), o que sugere um papel interessante de complexos metálicos no tratamento do câncer de próstata avançado. Além disso, esses compostos induzem estresse oxidativo, com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e peroxidação lipídica, ativam a cascata de p53 e a parada do ciclo celular, e regulam negativamente os proto-oncogenes e proteínas anti-apoptóticas (DASARI, 2014)

Os metais da primeira série de transição Mn, Fe, Co, Cu, Zn e Mo, juntamente com os metais alcalinos e alcalinos terrosos como Na, K, Mg e Ca, são essenciais para a fisiologia humana. No corpo humano, o Zinco - Zn (II), depois do ferro, é o segundo oligoelemento mais abundante (PORCHIA, 2020). O Zn(II) atua não apenas como cofator para as funções enzimáticas, mas também como um componente essencial para os fatores de transcrição (TFs) contendo dedos de zinco (ZF) e para enzimas envolvidas no estresse oxidativo e no reparo do DNA (LI, 2021). Todas as células mantêm a concentração de zinco e sua distribuição intracelular ideal para suas atividades, variando em diferentes órgãos (COSTELLO; FRANKLIN, 2016). De fato, o íon Z (II) é um dos conjugados mais comumente usados para quelação de compostos divalentes metálicos (MACDONALD, 2000). Previamente, foi demonstrado que um novo complexo Zn(II) contendo um ligante de rutina (Rutina:zinco (II)) foi citotóxico a células de leucemia, mieloma múltiplo e melanoma, sem efeito significativo sobre células normais *in vitro* (IKEDA, 2015).

Para transportar a carga dos íons metálicos, as bases de Schiff são compostos orgânicos com propriedades biológicas versáteis, amplamente utilizados e sintetizados pela reação de condensação de diferentes compostos amino com aldeídos ou cetonas, conhecidas como imina. O tipo de metal e a complexidade da base de Schiff desempenham um papel importante na

potência desses compostos como agentes quimioterápicos. As bases de Schiff complexadas a íons metálicos interagem diretamente com a membrana celular e causam danos por estresse oxidativo (MILOSAVLJEVIC, 2016, MORE, 2019; OLIVEIRA, 2019).

As semicarbazonas (SCs) são um derivado de imina, geralmente obtido pela condensação da semicarbazida com aldeído e cetona adequados (MORE, 2019). A presença de átomos de nitrogênio e oxigênio como átomos doadores na estrutura central das semicarbazonas confere a este composto uma importância especial na química orgânica e medicinal devido a sua capacidade de se coordenar com muitos íons metálicos (AL:WABLI, 2019). Têm sido amplamente estudadas por suas atividades anticonvulsiva, antimicrobiana, pesticida, sedativa, anti-protozoário e anticâncer (QAZI, 2018). Seus mecanismos de ação envolvem a inibição enzimática, alteração das reações redox, interações no DNA ou inibição da síntese de ácidos nucleicos (BERALDO, 2004). Derivados de semicarbazona foram previamente sintetizados contendo a porção fenil e demonstraram atividades anticâncer *in vitro* nas linhagens HT29, SK-N-SH, MDA-MB231 e MKN45 (MA, 2019).

As tiossemicarbazonas (TSCs) são uma classe de bases de Schiff geralmente obtidas pela condensação da tiosemicarbazida com um aldeído ou cetona adequados. A síntese e desenvolvimento desses derivados têm se destacado devido à grande variedade de atividades farmacológicas que exibem (SÓLIMO, 2018). Possuem ações antibacteriana, antiviral, antiparasitária, antifúngica, antimalárica e, particularmente, anticâncer. Atualmente, existem diversos candidatos a medicamentos baseados em TSC relatados para terapia oncológica (ZHANG, 2020). De fato, as TSCs apresentam um amplo espectro antitumoral, com eficácia em leucemia, câncer de pâncreas, de mama, de pulmão, câncer cervical, câncer de próstata e câncer de bexiga (SHAKYA, 2020). Além do amplo perfil farmacológico das tiossemicarbazonas, esta classe de compostos também apresenta alta versatilidade química, permitindo inúmeras modificações estruturais. Essas estruturas também podem atuar como ligantes de complexos metálicos, podendo se coordenar via átomos de enxofre e/ou nitrogênio, dependendo dos diferentes substituintes da sua estrutura, que trazem uma gama de possibilidades de variações sistemáticas (OLIVEIRA et al., 2023). Sua atividade é relacionada à quelação de íons metálicos, perturbando a homeostase intracelular de metais, formando complexos redox ativos com a geração de ERO e interferindo na ação de diferentes proteínas PARP, proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR) (HAGER, 2016). Além disso, quelantes de TSC atuam na síntese de DNA através da estabilização dos complexos cliváveis formados pela ação entre a

topoisomerase II e o DNA. Essa estabilização ocorre devido à alquilação de tiol no complexo topo II-DNA, o que demonstra seu potencial antiproliferativo (HE, 2020; SIQUEIRA, 2019). Pesquisas evidenciaram que o átomo de oxigênio / enxofre e os átomos de nitrogênio das SCs/TSCS podem interagir com quinases por meio de ligações de hidrogênio, inibindo-as (LIU, 2014). Além disso, complexos de paládium (II) com tiossemicarbazonas inibiram topoisomerase I, sendo este, também, um possível mecanismo de ação (OLIVEIRA et al., 2019).

In vitro, orto-Naftoquinona tiossemicarbazona (NQTS), bem como naftoquinona semicarbazona (NQSC) e seus diferentes complexos de Ni(II) foram investigados por sua atividade anticâncer em células de câncer de mama MCF-7. Observou-se que o complexo de níquel com NQTS e NQSC possuem maior atividade inibitória da proliferação celular do que os ligantes livres, sugerindo propriedades anticâncer desses compostos (AFRASIABI, 2005; MORE, 2019). Majzoub e colaboradores (2019) também relataram um potente efeito anticancerígeno do derivado 4 da cisplatina com tiossemicarbazona, contra células de CMTN (MDA-MB 231), ao modular a atividade e expressão de diferentes elementos celulares (p53, Bax, Bcl2, PARP e miRNAs) e desencadear apoptose celular (MAJZOUN, 2019).

Ao avaliar a atividade de três complexos de Zn(II)-criptolepina glicosada, dois dos três complexos foram ativos contra células de câncer de ovário resistentes à platina, os complexos foram capazes de desencadear a apoptose através de vias de mitofagia (ZHOU et al., 2022).

Derivados de hidrazona e acilhidrazona, produzidos a partir de um aldeído reagente com hidrazina ou acilhidrazina, também apresentam efeitos interessantes como antiinflamatório, anticonvulsivo e antitumoral. No entanto, os mecanismos exatos permanecem incertos. Trabalhos anteriores demonstraram que derivados de piridoxal hidrazona ou acilhidrazona podem inibir a proliferação celular *in vitro* (CHEN, 2019).

2.5 O potencial da vitamina D

A vitamina D₃ (VD), também chamada de Calcitriol, é um hormônio esteroide essencial ao equilíbrio funcional, obtida através de alimentos ricos em cálcio, incluindo produtos lácteos e peixes, ou pela ação da luz UV-B na pele (DELUCA, 2004; GARLAND et al., 2006). A VD é primeiramente convertida em 25 – hidroxivitamina D (25(OH)D), seu principal metabólito circulante, pela enzima 25-hidroxilase no fígado. A 25(OH) D sofre, então, uma segunda hidroxilação no rim pela enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1), formando 1 α ,25-di-

hidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), a forma biologicamente mais ativa da vitamina D (BANDERA, 2017; GIOVANNUCCI, 2008). A principal função da VD é manter a homeostase de cálcio e fósforo no organismo, atuar no metabolismo ósseo, e regular a resposta imunológica e o crescimento, a diferenciação e a morte celulares (HOLICK, 2003; HOLICK, 2007).

A VD exerce sua função através do Receptor de Vitamina D (VDR), um receptor nuclear que modula a transcrição de genes alvos. Uma vez dentro da célula, 1,25 – dihidroxivitamina D₃, pode ser inativada pela 24-hidroxilase mitocondrial ou pode ligar-se ao VDR. Essa ligação ativa o receptor que transloca do citosol para o núcleo, onde se heterodimeriza com o receptor retinóide X (RXR). O complexo VDR/RXR se liga a sequências específicas na região promotora dos genes alvos, chamados de elementos de resposta à Vitamina D (VDRE), recruta fatores de transcrição basais e moléculas co-reguladoras para aumentar ou inibir a taxa de transcrição gênica (DUSSO, 2003).

A expressão de VDR tem sido correlacionado ao prognóstico de pacientes com CAM (BERGER et al., 1988; FRIEDRICH et al., 2002; HAUSSLER et al., 1998; HUSS et al., 2019; NARBAITZ et al., 1981). Além disso, diante de seus benefícios, terapias combinadas de VD com agentes anticancerígenos para inibir múltiplas vias oncogênicas têm sido exploradas (LIM et al., 2018). De fato, o calcitriol vêm apresentando efeitos sinérgicos ou aditivos com drogas antineoplásicas (SEGOVIA-MENDOZA et al., 2021).

Ao avaliar os efeitos do tratamento combinado de ruxolitinibe, um inibidor da via Janus quinase (JAK), e calcitriol em linhagens de CM ER e HER-2 positivos, foi observado um efeito sinérgico entre os compostos (LIM et al., 2018). Uma revisão de Negri et al., também relatou que a VD possui capacidade de aumentar a eficácia da terapia convencional e combater a resistência a medicamentos, ampliando seu potencial clínico na área oncológica (NEGRI et al., 2020). Portanto, explorar novos compostos e novos desenhos terapêuticos é essencial na busca de alternativas para o tratamento de tumores agressivos, resistentes e responsáveis por um expressivo número de mortes.

REFERÊNCIAS

AAPRO, M. S. Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer: A Review of Key Findings from the 7th International Conference, St. Gallen, February 2001. **The Oncologist**, v. 6, n. 4, p. 376–385, 1 ago. 2001. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-4-376>

AFRASIABI, Zahra; SINN, Ekk; LIN, Weisheng; *et al.* Nickel (II) complexes of naphthaquinone thiosemicarbazone and semicarbazone: synthesis, structure, spectroscopy, and biological activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 7, p. 1526–1531, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.04.012>

AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 33, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>

ALAJMI, M. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Benzimidazole:Derived Biocompatible Copper(II) and Zinc(II) Complexes as Anticancer Chemotherapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1492, 16 maio 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19051492>

AL:WABLI, Reem I.; AL:GHAMDI, Alwah R.; GHABBOUR, Hazem A.; *et al.* Synthesis and Spectroscopic Identification of Certain Imidazole:Semicarbazone Conjugates Bearing Benzodioxole Moieties: New Antifungal Agents. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 200, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24010200>

AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 27–36, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2021. Atlanta: American Cancer Society; 2021.

ANAMPA, J.; MAKOWER, D.; SPARANO, J. A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 195, dez. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0439-8>

ARANDA:GUTIERREZ, Alejandro; DIAZ:PEREZ, Hector M. Histology, Mammary Glands. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547732/>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

ARENDT, L. M. et al. Stroma in breast development and disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 11–18, fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.10.003>

ARTHUR, R. S. et al. Genetic Factors, Adherence to Healthy Lifestyle Behavior, and Risk of Invasive Breast Cancer Among Women in the UK Biobank. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, n. 9, p. 893–901, 1 set. 2020. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz241>

BANDERA MERCHAN, B. et al. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 167, p. 203–218, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.11.020>

BARRIOS, C. H.; REINERT, T.; WERUTSKY, G. Global Breast Cancer Research: Moving Forward. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 38, p. 441–450, maio 2018. https://doi.org/10.1200/EDBK_209183

BASU, P. et al. A pragmatic approach to tackle the rising burden of breast cancer through prevention & early detection in countries “in transition”. **Indian Journal of Medical Research**, v. 152, n. 4, p. 343, 2020. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1868_19

BERALDO H, GAMBINO D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31–39, 1 jan. 2004. <https://doi.org/10.2174/1389557043487484>

BERGER, U. et al. Immunocytochemical Detection of 1,25-Dihydroxyvitamin D Receptors in Normal Human Tissues*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67, n. 3, p. 607–613, set. 1988. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-3-607>

BODINE, A. M.; HOLAHAN, B.; MIXON, A. Benign Breast Conditions. **Journal of Osteopathic Medicine**, v. 117, n. 12, p. 755–760, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.7556/jaoa.2017.147>

BRADLEY, R. et al. Trastuzumab for early-stage, HER2:positive breast cancer: a meta-analysis of 13 864 women in seven randomised trials. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1139–1150, ago. 2021.

BYRSKI, T. et al. Pathologic Complete Response Rates in Young Women With *BRCA1*:Positive Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 375–379, 20 jan. 2010. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7019>

CAVALCANTE, F. P. et al. Progress in Local Treatment of Breast Cancer: A Narrative Review. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 42, n. 06, p. 356–364, jun. 2020. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1712125>

CEDOLINI, C. et al. Type of Breast Cancer Diagnosis, Screening, and Survival. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 4, p. 235–240, ago. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2014.02.004>

CHANG, J. M. et al. Axillary Nodal Evaluation in Breast Cancer: State of the Art. **Radiology**, v. 295, n. 3, p. 500–515, jun. 2020. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020192534>

CHEN, H. et al. Comparison of the sensitivity of mammography, ultrasound, magnetic resonance imaging and combinations of these imaging modalities for the detection of small (≤ 2 cm) breast cancer. **Medicine**, v. 100, n. 26, p. e26531, 2 jul. 2021. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026531>

CHEN, X., LI, H., LUO, H., LIN, Z., & LUO, W. Synthesis and Evaluation of Pyridoxal Hydrazone and Acylhydrazone Compounds as Potential Angiogenesis Inhibitors. **Pharmacology**, p. 1–14, 2019.

CLEMONS, Mark; GOSS, Paul. Estrogen and the Risk of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 4, p. 276–285, 2001.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440407>

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, p. 100–112, dez. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.014>

COTLAR, A. M.; DUBOSE, J. J.; ROSE, D. M. History of surgery for breast cancer: radical to the sublime. **Current Surgery**, v. 60, n. 3, p. 329–337, maio 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7944\(02\)00777-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7944(02)00777-8)

CUI, Y. et al. Levels of Zinc, Selenium, Calcium, and Iron in Benign Breast Tissue and Risk of Subsequent Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 8, p. 1682–1685, 1 ago. 2007. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0187>

DASARI S, TCHOUNWOU PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**. 2014; Vol.740, p: 364:378, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DE BOER, L. L. et al. Optical tissue measurements of invasive carcinoma and ductal carcinoma in situ for surgical guidance. **Breast Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 59, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01436-5>

DE LA PUENTE-YAGÜE, M. et al. Vitamin D: And its role in breast cancer. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 34, n. 8, p. 423–427, ago. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.03.004>

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1689S-1696S, dez. 2004.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1689S>

DEMORO, B. et al. Interaction with Blood Proteins of a Ruthenium(II) Nitrofuryl Semicarbazone Complex: Effect on the Antitumoral Activity. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2861, 7 ago. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24162861>

DE SIQUEIRA, L. R. P. et al. Multi:target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 170, p. 237–260, maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.024>

DONG, H. et al. Diagnostic performance of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging for breast cancer detection: An update meta-analysis. **Thoracic Cancer**, v. 12, n. 23, p. 3201–3207, dez. 2021. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14187>

DRĂGĂNESCU, M.; CARMOCAN, C. Hormone Therapy in Breast Cancer. **Chirurgia**, v. 112, n. 4, p. 413, 2017. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.112.4.413>

DUSSO, A. S. Vitamin D receptor: Mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. **Kidney International**, v. 63, p. S6–S9, jun. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s85.3.x>

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**. 2005

EL MAJZOUN, R. et al. A thiosemicarbazone derivative induces triple negative breast cancer cell apoptosis: possible role of miRNA:125a:5p and miRNA:181a:5p. **Genes & Genomics**, v. 41, n. 12, p. 1431–1443, dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00866-y>

FARQUHARSON, M. J. et al. Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, n. 13, p. 4213–4223, 7 jul. 2009. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/54/13/016>

FISHER, B. et al. Twenty-Five-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Radical Mastectomy, Total Mastectomy, and Total Mastectomy Followed by Irradiation. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 8, p. 567–575, 22 ago. 2002. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020128>

FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 3–23, 10 maio 2019. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>

FLEET, J. C. et al. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. **The Biochemical Journal**, v. 441, n. 1, p. 61–76, 1 jan. 2012. <https://doi.org/10.1042/BJ20110744>

FOGLIETTA, J. et al. Cardiotoxicity of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer Patients. **Clinical Breast Cancer**, v. 17, n. 1, p. 11–17, fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.07.003>

FOLKERD, E. J.; LØNNING, P. E.; DOWSETT, M. Interpreting Plasma Estrogen Levels in Breast Cancer: Caution Needed. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 14, p. 1396–1400, 10 maio 2014. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.9411>

FRAGOMENI, S. M.; SCIALLI, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local:Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

FRIEDRICH, M. et al. Analysis of Vitamin D-receptor (VDR) and Retinoid X-receptor α in Breast Cancer. **The Histochemical Journal**, v. 34, n. 1/2, p. 35–40, 2002.

GARDEZI, S. J. S. et al. Breast Cancer Detection and Diagnosis Using Mammographic Data: Systematic Review. **Journal of Medical Internet Research**, v. 21, n. 7, p. e14464, 26 jul. 2019. <https://doi.org/10.2196/14464>

GARLAND, C. F. et al. The role of vitamin D in cancer prevention. **American Journal of Public Health**, v. 96, n. 2, p. 252–261, fev. 2006. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.045260>

GARRIDO:CASTRO, A. C.; LIN, N. U.; POLYAK, K. Insights into Molecular Classifications of Triple:Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 2, p. 176–198, fev. 2019. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1177>

GARTLEHNER, G. et al. Mammography in combination with breast ultrasonography versus mammography for breast cancer screening in women at average risk. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 30 abr. 2013. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009632.pub2>

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>

GIOVANNUCCI, E. 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Myocardial Infarction in MenA Prospective Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 11, p. 1174, 9 jun. 2008. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.11.1174>

GIULIANO, A. E. et al. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10:Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 318, n. 10, p. 918, 12 set. 2017. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11470>

GØTZSCHE, P. C.; JØRGENSEN, K. J. Screening for breast cancer with mammography. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 4 jun. 2013. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001877.pub5>

GRATTAN, B. J.; FREAKE, H. C. Zinc and Cancer: Implications for LIV:1 in Breast Cancer. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 648–675, 4 jul. 2012. <https://doi.org/10.3390/nu4070648>

GÜLBEN, K., BERBEROĞLU, U., AYDOĞAN, O.; *et al.* Subtype Is a Predictive Factor of Nonsentinel Lymph Node Involvement in Sentinel Node:Positive Breast Cancer Patients. **Journal of Breast Cancer**, v. 17, n. 4, p. 370, 2014.

GUMULEC, J. et al. [Molecular mechanisms of zinc in prostate cancer]. **Klinicka Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti**, v. 24, n. 4, p. 249–255, 2011.

GUPTA, A.; OHRI, N.; HAFFTY, B. G. Hypofractionated radiation treatment in the management of breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 18, n. 8, p. 793–803, 3 ago. 2018. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1489245>

HABALA L, VALENTOVÁ J. Metal complexes in medicine and pharmacy : the past and the present I. **Ceska Slov Farm**. Vol.67, n. 5:6, p:182:191, 2018.

HABALA L, VALENTOVÁ J. Metal complexes in medicine and pharmacy : the past and the present II. **Ceska Slov Farm**. Vol.69, n.1, p:3:16, 2020.

HAGER, S; ACKERMANN, C, J; JOERGER, M; GILLESSEN, S; OMLIN, A. Anti:tumor activity of platinum compounds in advanced prostate:cancer – a systematic literature review. **Annals of Oncology**. Vol. 27, n. 6, p: 975:984. 2016 <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw156>

HALL, Jeff M.; LEE, Ming K.; NEWMAN, Beth; *et al.* Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1684–1689, 1990. <https://doi.org/10.1126/science.2270482>

HARTMANN, L. C. *et al.* Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 3, p. 229–237, 21 jul. 2005.

HAUSSLER, M. R. *et al.* The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 3, p. 325–349, 1 mar. 1998. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.3.325>

HE, Z, X; HUO, J, L; GONG, Y, P; AN, Q; ZHANG, X; QIAO, H; YANG, F,F; ZHANG, X,H; JIAO, L,M; LIU, H,M; MA, L,Y; ZHAO, W. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiosemicarbazone:indole derivatives targeting prostate cancer cells. **Eur J Med Chem**. 2021 Jan Vol.15, p: 210:112970, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112970>

HE, Z.:X. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel thiosemicarbazone:indole derivatives targeting prostate cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 112970, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112970>

HEIL, J.; KUERER, H. M.; PFOB, A.; *et al.* Eliminating the breast cancer surgery paradigm after neoadjuvant systemic therapy: current evidence and future challenges. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 31, n. 1, p. 61–71, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.10.012>

HOANG, B. X. *et al.* Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 5, p. 457–461, set. 2016. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194>

HOLICK, M. F. Evolution and Function of Vitamin D. Em: REICHRATH, J.; TILGEN, W.; FRIEDRICH, M. (Eds.). **Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy**. Recent Results in Cancer Research. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. v. 164p. 3–28.

HOLICK, M. F. Vitamin D Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–281, 19 jul. 2007. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>

HONGISTO, Vesa; AURE, Miriam Ragle; MÄKELÄ, Rami; *et al.* The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells — A data description. **Genomics Data**, v. 2, p. 249–253, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2014.06.025>

HORWITZ, S. B. Personal Recollections on the Early Development of Taxol. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 136–138, 1 fev. 2004. <https://doi.org/10.1021/np0304464>

HUSARIK, D. B.; STEINERT, H. C. Single-Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography for Sentinel Node Mapping in Breast Cancer. **Seminars**

in **Nuclear Medicine**, v. 37, n. 1, p. 29–33, jan. 2007.

<https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2006.08.001>

HUSS, L. et al. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 84, dez. 2019.

<https://doi.org/10.1186/s13058-019-1169-1>

IKEDA, N, E, A; NOVAK, E, M; MARIA, D, A; VELOSA, A, S; & PEREIRA, R, M, S. Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc (II) flavonoid: metal complex. **Chemico:Biological Interactions**, Vol. 239, p: 184–191. 2015

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.011>

GOV – Ministério da Saúde (Brasil). **Estimativa**. I 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: 15 janeiro 2023

JIANG, B. et al. Analysis of Adjuvant Chemotherapy on Pathological Remission of Breast Cancer. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2021, p. 1–8, 15 nov. 2021.

<https://doi.org/10.1155/2021/5440154>

KASS, L. et al. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 11, p. 1987–1994, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>

KHARB, R. et al. Aromatase inhibitors: Role in postmenopausal breast cancer. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 8, p. 2000081, ago. 2020.

<https://doi.org/10.1002/ardp.202000081>

KHALESEH, F. et al. Enhancement of in vitro antitumour activity of epirubicin in HER2+ breast cancer cells using immunoliposome formulation. **IET Nanobiotechnology**, v. 15, n. 3, p. 257–265, maio 2021.

<https://doi.org/10.1049/nbt2.12012>

KHASRAW, M.; BELL, R.; DANG, C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. **The Breast**, v. 21, n. 2, p. 142–149, abr. 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.12.012>

KO, E. S.; MORRIS, E. A. Abbreviated Magnetic Resonance Imaging for Breast Cancer Screening: Concept, Early Results, and Considerations. **Korean Journal of Radiology**, v. 20, n. 4, p. 533, 2019.

<https://doi.org/10.3348/kjr.2018.0722>

KOBOLT, D.C, FULTON, R. S., McLELLAN, M. D., SCHMIDT, H., KALICKI:VEIZER, J., McMICHAEL, J., F., FULTON, L. L., DOOLING, D. J., DING, L., MARDIS, E. R. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61:70, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nature11412>

KOTHARI, C.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5760, 11 ago. 2020.

<https://doi.org/10.3390/ijms21165760>

KWAPISZ, D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple:negative breast cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 70, n. 3, p. 607–617, mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02736-z>

LAKHANI, S. R. et al. Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 15, p. 1138–1145, 5 ago. 1998. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.1.90a>

LEITHNER, D. et al. Clinical role of breast MRI now and going forward. **Clinical Radiology**, v. 73, n. 8, p. 700–714, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2017.10.021>

LERMAN, H. et al. Lymphoscintigraphic sentinel node identification in patients with breast cancer: the role of SPECT:CT. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 33, n. 3, p. 329–337, mar. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1927-4>

LI, L.-Y. et al. Potent hydrazone derivatives targeting esophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 148, p. 359–371, mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.033>

LI, Y. et al. Metal complexes against breast cancer stem cells. **Dalton Transactions**, v. 50, n. 41, p. 14498–14512, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1DT02909F>

LI, Y.:Q. et al. Copper efflux transporters ATP7A and ATP7B: Novel biomarkers for platinum drug resistance and targets for therapy: ATP7A/7B AND PLATINUM DRUG RESISTANCE. **IUBMB Life**, v. 70, n. 3, p. 183–191, mar. 2018. <https://doi.org/10.1002/iub.1722>

LIANG, Y. et al. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 60, p. 14–27, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>

LIM, S. T. et al. Synergistic anticancer effects of ruxolitinib and calcitriol in estrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p. 5581–5588, abr. 2018. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8580>

LIU, Z. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno[3,2-d] pyrimidine derivatives possessing diaryl semicarbazone scaffolds as potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 782–793, nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.022>

LITTON, J. K. et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline *BRCA* Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 8, p. 753–763, 23 ago. 2018. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802905>

LIU, L. et al. Comparing hypofractionated to conventional fractionated radiotherapy in postmastectomy breast cancer: a meta:analysis and systematic review. **Radiation Oncology**, v. 15, n. 1, p. 17, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13014-020-1463-1>

LIU, L. et al. Correlation between family history and characteristics of breast cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6360, dez. 2021 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85899-8>

LIU, M. et al. Zinc-Dependent Regulation of ZEB1 and YAP1 Coactivation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Plasticity and Metastasis in Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v. 160, n. 5, p. 1771- 1783.e1, abr. 2021. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.12.077>

LIU, S. et al. Zinc(ii) complexes containing bis:benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers that trigger DNA damage:mediated p53 phosphorylation in cancer cells. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 16, p. 5932, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3dt33077j>

LONG, H.:D. et al. Risk of Congestive Heart Failure in Early Breast Cancer Patients Undergoing Adjuvant Treatment with Trastuzumab: A Meta:Analysis. **The Oncologist**, v. 21, n. 5, p. 547–554, 1 Maio 2016. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0424>

LOPEZ:GARCIA, M. A. et al. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways: Molecular evolution of breast cancer. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p. 171–192, ago. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03568.x>

LYONS, T. G. Targeted Therapies for Triple:Negative Breast Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 20, n. 11, p. 82, nov. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0682-x>

MA, J., NI, X., GAO, Y., HUANG, K., WANG, Y., LIU, J., & GONG, G. Semicarbazone derivatives bearing phenyl moiety: synthesis, anticancer activity, cell cycle, apoptosis:inducing and metabolic stability study. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 2019 <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00738>

MacDONALD R, S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **Journal of Nutrition**. Vol. 130, p: 1500S–1508S 2000. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298–306, jan. 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17038>

MAVADDAT, N. et al. Pathology of Breast and Ovarian Cancers among *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1* / 2 (CIMBA). **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 21, n. 1, p. 134–147, 1 jan. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.yobg.2012.05.049>

MILOSAVLJEVIC, V. et al. The Zinc:Schiff Base:Novicidin Complex as a Potential Prostate Cancer Therapy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163983, 11 out. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163983>

MOFFATT, K. A.; JOHANNES, W. U.; MILLER, G. J. 1Alpha,25dihydroxyvitamin D3 and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 3, p. 695–703, mar. 1999.

MOHAMMED, A. A. The clinical behavior of different molecular subtypes of breast cancer. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 29, p. 100469, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100469>

MONTEMURRO, F.; NUZZOLESE, I.; PONZONE, R. Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 9, p. 1071–1082, 12 jun. 2020. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1746273>

MORE, M. S. et al. Metal complexes driven from Schiff bases and semicarbazones for biomedical and allied applications: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 14, p. 100195, dez. 2019. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1746273>

NARBAITZ, R. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Target Cells in Rat Mammary Gland. **Hormone Research**, v. 15, n. 4, p. 263–269, 1981. <https://doi.org/10.1159/000179465>

NEGRI, M. et al. Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1798, 17 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12061798>

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

O'FLYNN, E. A.; DESOUZA, N. M. Functional magnetic resonance: biomarkers of response in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 204, fev. 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr2815>

OLIVEIRA, C. G. et al. Palladium (II) complexes with thiosemicarbazones derived from pyrene as topoisomerase IB inhibitors. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 44, p. 16509–16517, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9DT02570G>

OLIVEIRA, D. et al. Advances in Breast Cancer Drug Discovery: A Review of Therapeutic Strategies and Studies Involving Photosensitizers, Caged Xanthenes and Thiosemicarbazones Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2023. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230128>

PANDEY, P. R. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, n. 1, p. 226, 2010. <https://doi.org/10.2741/3617>

PANTELIDOU, C. et al. PARP Inhibitor Efficacy Depends on CD8⁺ T-cell Recruitment via Intratumoral STING Pathway Activation in BRCA-Deficient Models of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 6, p. 722–737, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1218>

RYAN, C. J. et al. Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 2, p. 138–148, 10 jan. 2013.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252–264, abr. 2012. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

PAVIC, D. et al. The Role of Magnetic Resonance Imaging in Diagnosis and Management of Breast Cancer. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 3, n. 6, p. 527–541, dez. 2004. <https://doi.org/10.1177/153303460400300602>

PEDDIE, N. et al. The impact of medication side effects on adherence and persistence to hormone therapy in breast cancer survivors: A qualitative systematic review and thematic synthesis. **The Breast**, v. 58, p. 147–159, ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.05.005>

PEREZ, E. A. Appraising Adjuvant Aromatase Inhibitor Therapy. **The Oncologist**, v. 11, n. 10, p. 1058–1069, 1 nov. 2006. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-10-1058>

PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, S.:F. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 325–338, jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>

QAZI, S. U., RAHMAN, S. U., AWAN, A. N., AL:RASHIDA, M., ALHARTHY, R. D., ASARI, A., ... IQBAL, J. Semicarbazone derivatives as urease inhibitors: Synthesis, biological evaluation, molecular docking studies and in:silico ADME evaluation. **Bioorganic Chemistry**, Vol.79, p: 19: 26, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.029>

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 207, ago. 2010. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 853, 2014. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>

SALVADOR, F.; LLORENTE, A.; GOMIS, R. R. From latency to overt bone metastasis in breast cancer: potential for treatment and prevention. **The Journal of Pathology**, v. 249, n. 1, p. 6–18, set. 2019. <https://doi.org/10.1002/path.5292>

Dos SANTOS, T.A; da SILVA, A.C; SILVA, E.B, GOMES, P.A, ESPÍNDOLA, J.W; CARDOSO, M. V; MOREIRA, D.R; LEITE, A. C. PEREIRA, V. R. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomed Pharmacother**. 2016 v.82, p. 555-60. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 277, n. 5698, p. 665–667, fev. 1979. <https://doi.org/10.1038/277665a0>

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

SEGOVIA-MENDOZA, M. et al. Combinations of Calcitriol with Anticancer Treatments for Breast Cancer: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12741, 25 nov. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222312741>

SHAKYA B, YADAV PN. Thiosemicarbazones as Potent Anticancer Agents and their Modes of Action. **Mini Rev Med Chem**. Vol.20, n.8, p:638:661, 2020. <https://doi.org/10.2174/1389557519666191029130310>

SHAMSI, M.; PIRAYESH ISLAMIAN, J. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. **Nuclear Medicine Review**, v. 20, n. 1, p. 45–48, 31 jan. 2017. <https://doi.org/10.5603/NMR.2017.0002>

SHAW, K. R. M.; WROBEL, C. N.; BRUGGE, J. S. Use of Three:Dimensional Basement Membrane Cultures to Model Oncogene:Induced Changes in Mammary Epithelial Morphogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 4, p. 297–310, out. 2004. <https://doi.org/10.1007/s10911-004-1402-z>

SHIEN, T.; IWATA, H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 50, n. 3, p. 225–229, 9 mar. 2020. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz213>

SHAO, T.; KLEIN, P.; GROSSBARD, M. L. Vitamin D and Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 17, n. 1, p. 36–45, 1 jan. 2012. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0278>

SHOEMAKER, M. L. et al. Differences in breast cancer incidence among young women aged 20–49 years by stage and tumor characteristics, age, race, and ethnicity, 2004–2013. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 169, n. 3, p. 595–606, jun. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4699-9>

SLADE, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes & Development**, v. 34, n. 5–6, p. 360–394, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1101/gad.334516.119>

SÓLIMO, A. et al. N^4 :aryl substituted thiosemicarbazones derived from 1:indanones as potential anti:tumor agents for breast cancer treatment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 6, p. 4677–4687, jun. 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.26240>

SONEGO, M. et al. USP1 links platinum resistance to cancer cell dissemination by regulating Snail stability. **Science Advances**, v. 5, n. 5, p. eaav3235, 3 maio 2019.

SPARANO, J. A. et al. Weekly Paclitaxel in the Adjuvant Treatment of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 16, p. 1663–1671, 17 abr. 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707056>

SPIRA, A.; ETTINGER, D. S. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 4, p. 379–392, 22 jan. 2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMra035536>

STACHS, A. et al. Benign Breast Disease in Women. **Deutsches Ärzteblatt international**, 19 ago. 2019. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0565>

STINGL, J. et al. Deciphering the Mammary Epithelial Cell Hierarchy. **Cell Cycle**, v. 5, n. 14, p. 1519–1522, 15 jul. 2006. <https://doi.org/10.4161/cc.5.14.2983>

- SUAMI, H. et al. The Lymphatic Anatomy of the Breast and its Implications for Sentinel Lymph Node Biopsy: A Human Cadaver Study. **Annals of Surgical Oncology**, v. 15, n. 3, p. 863–871, mar. 2008. <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9709-9>
- SUGIE, T. Immunotherapy for metastatic breast cancer. **Chinese Clinical Oncology**, v. 7, n. 3, p. 28–28, jun. 2018. <https://doi.org/10.21037/cco.2018.05.05>
- SUHAIL, Y. et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, v. 9, n. 2, p. 109–127, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- SULLIVAN, K. V. et al. Zinc stable isotope analysis reveals Zn dyshomeostasis in benign tumours, breast cancer, and adjacent histologically normal tissue. **Metallomics**, v. 13, n. 6, p. mfab027, 31 maio 2021. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab027>
- SUN, Y.:S. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- TAYLOR, C. et al. Estimating the Risks of Breast Cancer Radiotherapy: Evidence from Modern Radiation Doses to the Lungs and Heart and From Previous Randomized Trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 15, p. 1641–1649, 20 maio 2017. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.72.0722>
- TAYLOR, K. M. et al. The Emerging Role of the LIV:1 Subfamily of Zinc Transporters in Breast Cancer. **Molecular Medicine**, v. 13, n. 7–8, p. 396–406, jul. 2007. <https://doi.org/10.2119/2007-00040.Taylor>
- THILL, M. Benign Breast Diseases. **Breast Care**, v. 13, n. 6, p. 400–401, 2018. <https://doi.org/10.1159/000495918>
- TRABERT, B. et al. Progesterone and Breast Cancer. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 2, p. 320–344, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnz001>
- TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, jan. 2020. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- TURNER, N. C.; TUTT, A. N. Platinum chemotherapy for BRCA1:related breast cancer: do we need more evidence? **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. 115, bcr3332, dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/bcr3332>
- TUTT, A. N. J. et al. Adjuvant Olaparib for Patients with *BRCA1* : or *BRCA2* :Mutated Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 25, p. 2394–2405, 24 jun. 2021.
- UNLU, O. et al. Risk factors and histopathological features of breast cancer among women with different menopausal status and age at diagnosis. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 22, n. 1, p. 184–191, fev. 2017.
- VAN DRIEL, C. M. G. et al. Psychological factors associated with the intention to choose for risk:reducing mastectomy in family cancer clinic attendees. **The Breast**, v. 30, p. 66–72, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.08.016>

VOGEL-GONZÁLEZ, M. et al. Zinc Favors Triple-Negative Breast Cancer's Microenvironment Modulation and Cell Plasticity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9188, 25 ago. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22179188>

VOUTSADAKIS, I. A. Vitamin D baseline levels at diagnosis of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 14, n. 1, p. 16–26, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.005>

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, jul. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>

WANG, Furu; FANG, Qiaoqiao; GE, Zhen; *et al.* Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 3, p. 2109–2118, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0958-0>

WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development**, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 15 set. 2014. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>

WONG, F. H. et al. Combination of Talazoparib and Calcitriol Enhanced Anticancer Effect in Triple–Negative Breast Cancer Cell Lines. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1075, 29 ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15091075>

WOOSTER, Richard; NEUHAUSEN, Susan L.; MANGION, Jonathan; *et al.* Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, *BRCA2*, to Chromosome 13q12:13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088–2090, 1994. <https://doi.org/10.1126/science.8091231>

YIN, L. et al. Triple:negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 61, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

YIP, C.: H.; RHODES, A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Future Oncology**, v. 10, n. 14, p. 2293–2301, nov. 2014. <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>

YOUN, H. J.; HAN, W. A Review of the Epidemiology of Breast Cancer in Asia: Focus on Risk Factors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 4, p. 867–880, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.4.867>

ZASADIL, L. M. et al. Cytotoxicity of Paclitaxel in Breast Cancer Is due to Chromosome Missegregation on Multipolar Spindles. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 229, 26 mar. 2014. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007965>

ZHANG, J. et al. Effectiveness and safety of pegylated liposomal doxorubicin versus epirubicin as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast cancer: a real-world study. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1301, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09050-6>

ZHANG, X.: H. et al. Thiosemicarbazone:based lead optimization to discover high:efficiency and low:toxicity anti:gastric cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112349, ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112349>

ZHENG, G. et al. Family history of breast cancer as a second primary malignancy in relatives: a nationwide cohort study. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1210, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08925-y>

ZHENG, M; SUN, X; LI, Y; ZUO, W. MicroRNA:145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. **Tumour Biology**, v.37, p.8189–96, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4722-2>

ZONG, Y.; WU, J.; SHEN, K. Nanoparticle albumin:bound paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: a systematic review and meta:analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 10, p. 17360–17372, 7 mar. 2017 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14477>

ZHOU, Z. et al. Novel glycosylation zinc(II)–cryptolepine complexes perturb mitophagy pathways and trigger cancer cell apoptosis and autophagy in SK-OV-3/DDP cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 243, p. 114743, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114743>

CAPÍTULO 2

BIOLOGICAL EVALUATION OF CANDIDATES FOR METALLODRUGS ASSOCIATED WITH ZINC(II) IN BREAST CANCER CELL LINES

Biological Evaluation of candidates for metallodrugs associated with Zinc(II) in Breast Cancer cell lines

Authorship

Raiane Aparecida dos Santos Machado¹, Raoni Pais Siqueira¹, Fernanda Cardoso da Silva¹, André Carlos Pereira de Matos¹, Dayanne Silva Borges¹, Carolina Gonçalves Oliveira²; Thaise Gonçalves Araújo^{1,3*}

Affiliation

¹Laboratory of Genetics and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas-MG 38700-002, Brazil; machado.raiane@hotmail.com (R.A.S.M.); raoni.siqueira@ufu.br (R.P.S.); fernanda.cardoso95@yahoo.com (F.C.S.); andre3ptm@gmail.com (A.C.P.M.); daaysborges@gmail.com (D.S.B.); tgaraujo@ufu.br (T.G.A.).

²Institute of Chemistry, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 38400-902, Brazil; carolina@ufu.br (C.G.O.).

³Laboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Institute of Biotechnology, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlandia-MG, 38405-302, Brazil.

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

Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the molecular subtype of breast cancer (BC) that has most challenged clinical practice, with a worse prognosis associated with restricted treatment strategies and insensitivity to conventional drugs. Zinc is an important trace element for homeostasis and Schiff base metal complexes have been promise in the treatment of advanced tumors. Herein, four new Zn(II) complexes (**1–4**) with Schiff bases made by semicarbazones, hydrazones, and thiosemicarbazones were designed, synthesized and evaluated for their *in vitro* activity in BC cells. The four complexes were cytotoxic to MCF-7 (luminal BC), MDA-MB-453 (HER2-positive BC), and MDA-MB-231 (TNBC) cell lines, with IC₅₀ values ranging from 0.01 to 20 μ M. However, Complex **4** demonstrated to be less cytotoxic to non-tumor cell lines and complexation with Zn(II) increased the cytotoxicity of the ligands, which was not observed for Complexes **1–3**. Complex **4** was therefore selected for subsequent assays, and inhibited colony formation and cell migration of TNBC cells in a dose-dependent manner. Furthermore, this compound induced cell-death independently of caspase, decreasing the activity of caspase 8. Interestingly, Complex **4** sensitized TBNC cells to Doxorubicin and Paclitaxel, possibly modulating the epithelial-mesenchymal transition mechanism, as it increased *CDH1* expression. Finally, Complex **4** was synergistic in combination with vitamin D. Thus, our results suggest the potential of Complex **4** in sensitizing aggressive BC cells to chemotherapy treatment, proving to be a promising strategy in cases of therapeutic failure.

Keywords Zinc(II), MDA-MB-231, breast cancer, chemotherapy

1. Introduction

Cancer is one of the main causes of death worldwide, being an important barrier to increasing life expectancy in all countries. Breast cancer (BC) is the most prevalent, with an estimated 2.3 million cases in 2020 and 685,000 deaths [1]. The incidence of BC has an increasing profile, and epidemiological data were severely impacted by the COVID-19 pandemic, so many women opted to delay healthcare treatment, which suggests the occurrence of severe cases of the disease in the coming years [2].

BC is a heterogeneous disease with a complex of molecular alterations that drive its development and progression. In this context, breast tumors are classified molecularly, which has guided the clinical management to biology- centered approaches. Currently, five subtypes

are adopted and those that express estrogen receptor (ER) and/or progesterone receptor (PR) are considered hormone receptor- positive BCs, whereas triple negative breast cancer (TNBC) are those that do not express ER, PR or human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [3]. Unfortunately, therapeutic strategies for triple-negative tumors are restricted and still focused on surgery and chemotherapy or radiotherapy. Despite presenting a higher pathological complete response (pCR) rate to taxanes, anthracyclines-based or platinum-based systemic therapy, TNBC are often poorly differentiated, highly aggressive and with the worst prognosis [4]. About 46% of patients present distant metastases, mainly in the third year after diagnosis. In these cases, the tumor can affect the brain and visceral organs, and the mortality rate reaches 75% within three months after recurrence [5]. Therapeutic resistance contributes to this scenario, with 50% of patients with TNBC not responding to the drugs routinely used and progressing to a fatal disease [6]. Therefore, the development of new treatment strategies is necessary, especially to improve these patient's prognosis and the quality of life.

Zinc (Zn) is a necessary trace element that regulates normal cellular activity, being a cofactor for more than 300 enzymes regulating gene expression, enzymatic activity and protein structure [7]. Therefore, different cellular mechanisms are responsive to Zn homeostasis, such as apoptosis, autophagy, metabolism, cell proliferation and differentiation, immune response and cell signaling [8]. In BC, Chandler and colleagues [9] noted abnormal Zn levels associated with molecular subtypes, grade, invasiveness, metastatic potential and response to therapy. Although the results are contrasting, high levels of Zn have already been described in tissues from patients with BC [10]. Therefore, the demand of tumor cells for Zn highlights a new path to be followed from a therapeutic point of view, in which structural designs and different ligands can be potentially explored. Zn(II) ions have favored influx into tumor cells, in addition to having Lewis acidity, innocent redox characteristics, easy exchange of ligands, adaptable coordination surroundings, and substantial physiological profusion [11].

In fact, the chemistry of coordination compounds has gained significant attention in oncology with novel metal center and ligands being explored to perform desired biological functions. Complexes containing Zn(II) have already been shown to be potentially cytotoxic to lung (A549) [12], ovarian (HeLa) and breast (MCF-7) [13] cancer lines, including TNBC (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC1937 and Hs 578T) [14]. Schiff bases are organic chelates prepared through the condensation between the carbonyl group and primary amine with anti-inflammatory and antitumor activities [15]. In previous studies, Schiff base Zn(II)

complexes were synthesized and shown to be cytotoxic, cytostatic and genotoxic to mammary tumor cells, including in the MCF7, T47-D and MDA-MB-231 breast cancer lineages [16-17].

Herein, we evaluated the *in vitro* effects of four novel Zn(II) complexes of Schiff base made by semicarbazones, hydrazones, and thiosemicarbazones, investigating whether these complexes could impact cell viability, gene expression and the sensitivity of TNBC cells to the commonly used chemotherapeutics.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals, drugs, and reagents

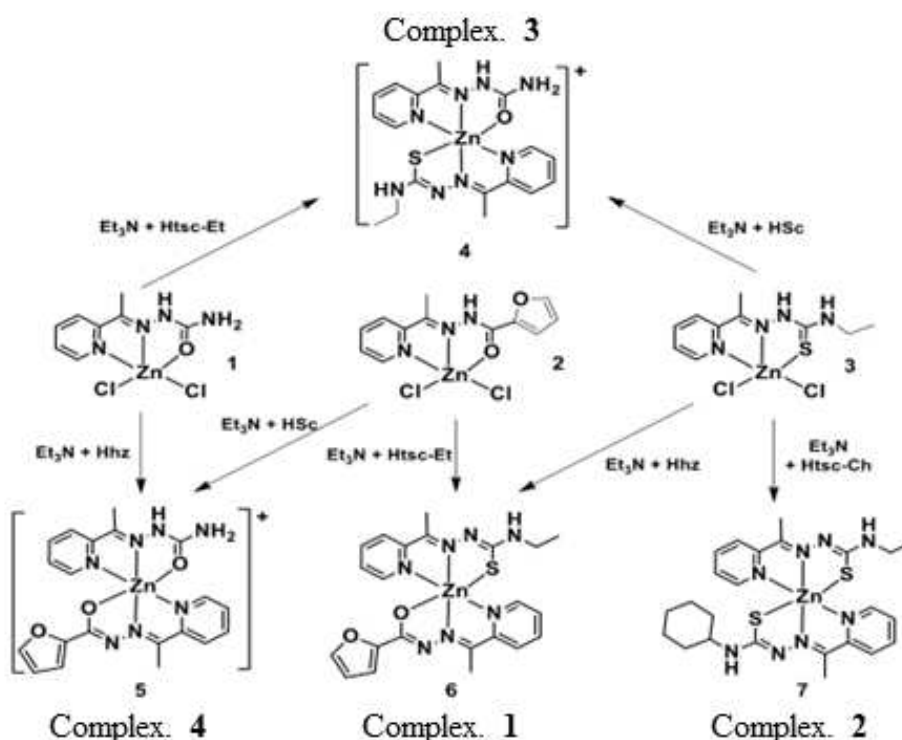
Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Sigma-Aldrich®. 3–4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was purchased from Life Technologies®. Vitamin D (VD) was purchased from Purifarma®. Paclitaxel and Doxorubicin were purchased from Sigma-Aldrich®. Crystal Violet was purchased from ACS Científica®. Methanol and Acetic Acid were purchased from Vetec®.

2.2 Synthesis of the compounds

The Zn(II) complexes were obtained in collaboration with Profa. Dr. Carolina Gonçalves Oliveira from the Chemistry Institute (IQ-UFU). For the synthesis of the desired chelating agents, acetylpyridine, semicarbazide and thiosemicarbazide were used as starting materials, prepared from an equimolar mixture with acetylpyridine, as previously described [18]. The syntheses were carried out in methanol solution under reflux for 2 hours.

Mixed Zn(II) complexes were synthesized from pentacoordinated metal precursor [ZnCl₂] by adding 0.1 mmol ZnCl₂·7H₂O to solutions containing the same equivalence of the desired ligands in EtOH. In complexes, [ZnCl₂] chloride ligands are easily labialized allowing substitution reactions. In this way, it is possible to obtain mixed complexes by reacting the precursor [ZnCl₂] with an equivalent of the second ligand in the presence of Et₃N under reflux in MeCN. These reactions allow the obtaining of four novel mixed zinc complexes (Fig. 1)

Fig. 1: Reactions for the preparation of mixed Zinc(II) complexes



The ligands and their complexes were characterized in solution by nuclear magnetic resonance (NMR), conductivity measurement and absorption spectroscopy in the ultraviolet-visible (UV:vis) region. The solid samples were also characterized by spectroscopy in the infrared (IR) region, melting point measurement, elemental analysis (CHNS) and determination of crystalline structure by X-ray diffraction, for which suitable single crystals were obtained. The complexes were soluble and stable in DMSO.

For the following assays, four mixed zinc complexes were used: $[\text{Zn}(\text{Hz})(\text{atc-Et})]$ (Complex 1), $[\text{Zn}(\text{atc-Et})(\text{atc-Ch})]$ (Complex 2), $[\text{Zn}(\text{atc-Et})(\text{Hsc})]\text{Cl}$ (Complex 3) and $[\text{Zn}(\text{Hz})(\text{Hsc})]\text{Cl}$ (Complex 4), four ligands: Hact-Et, Hhz, Hhsc, Hatc-Ch and the metal precursor ZnCl_2 .

2.3 Cell culture

For *in vitro* assays, three tumor cell lines were used: MCF7 (ER-positive BC), passage 29, maintained in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, Gibco®); MDA-MB-453 (HER2-positive BC), passage 31, grown in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco®); and MDA-MB-231 (TNBC), passage 18, grown in Leibovitz's L-15 Medium (L15, Gibco®). Additionally, three non-tumor cell lines were used: HUVEC (human umbilical vein

endothelial), passage 35, cultured in (RPMI-1640); HFF (human fibroblast), passage 73, cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium: Nutrient Mixture – High Glucose (DMEM/F12- High Glucose, Gibco®), and MCF10A (human mammary epithelial cell line), passage 49, also cultured in DMEM/F12 supplemented with 10 µg/mL insulin (Gibco®), 0.25 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich®) and 10 µg/mL Epidermal Growth Factor (EGF) (Gibco®). All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®) and 50 µg/mL gentamicin (Cultilab®). The culture flasks were kept in an incubator at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂, except for the MDA-MB 231 lineage, which was grown without CO₂ gas exchange. All cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA).

2.4 MTT assay

To analyze cell viability, the test based on the reduction of tetrazoline 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide (MTT) was used. HUVEC cell lines (1.0 x 10⁴ cells/well); HFF (8.0 x 10³ cells/well); MCF10A (1.2 x 10⁴ cells/well); MDA-MB-453 and MCF7 (5.0 x 10³ cells/well) and MDA-MB-231 (1.5 x 10⁴ cells/well) were seeded in 96-well plates in complete culture medium. The treatments were carried out with the four Zn(II) complexes and the five ligands (0.01; 0.05; 0.25; 1.25; 6.25; 31.25 and 156.25 µM) for 48 hours. All assays were performed in triplicate and wells containing only cells and medium (untreated cells) and wells containing cells treated with DMSO diluent were used as experimental controls.

After incubation, MTT (5 mg/mL - diluted in phosphate-buffered saline – PBS) was added together with complete culture medium at 10% v/v, maintained for 4 hours. Then, 200 µL of DMSO was added to each well and the reading was carried out at 560 nm on the Multiskan FC Microplate Photometer reader (Thermo Fisher Scientific®). Cell viability was calculated using the following formula:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(AT - AB) * 100}{(AC - AB)}$$

AT = absorbance of treated cells

AC = absorbance of untreated cells

AB= absorbance of cells treated with DMSO

2.5 Clonogenic assay

Subsequent assays were carried out with Complex 4 on the MDA-MB231 lineage, representative of TNBC, known to be more heterogeneous and with a worse prognosis [19]. For the experiment, MDA-MB231 cells were seeded in 12-well plates (5.0×10^3 per well), treated with 0.5 or 8.0 μM of Complex 4 for 48 hours. Afterwards, the treatments were removed, and new complete medium was added to the wells. The cells were then cultured for 15 days, and the medium was changed every three days. For cell fixation, formaldehyde (4% v/v) and methanol were used. The cells were finally stained with a solution of crystal violet (0.5% m/v) in methanol (25% v/v). Colonies were photographed using iBright Imaging Systems equipment (Thermo Fisher Scientific®). Finally, acetic acid (33% v/v) was added and 100 μL of the solution was collected and transferred to a 96-well plate for reading at 560 nm on a Multiskan TM FC Microplate Photometer reader (Thermo Fisher Scientific®),

2.6 Scratch wound healing assay

To evaluate the effect of Complex 4 on cell migration, the TNBC cells MDA-MB-231 was seeded in 12-well plates (2.0×10^5 cells per well). Once they reached confluence, a sterile 200 μL pipette tip was held vertically to create a scratch in the cell monolayer, and cells were treated with 0.5 μM and 8.0 μM of Complex 4. Untreated cells were used as controls. Photos were captured at times of 0, 24, 48 and 72 hours using the inverted-microscope EVOS XL Core Imaging System (Invitrogen®). Analysis of the results was conducted using the Image J software, measuring the scratch closure. The percentage of open wound area was plotted over the time.

2.7 Enzymatic activity of Caspases 3 and 8

The evaluation of the pro-apoptotic effect of Complex 4 was carried out by colorimetric assay of the activity of caspase (CAS) 3 and 8. MDA-MB-231 cells were treated with 0.5 μM and 8.0 μM of Complex 4 for 48 hours. Protein extraction was performed using the NE-PERTM kit (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's recommendations. Then, the selective substrates of CAS3 (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide, Sigma-Aldrich®) and CAS8 (N-acetyl-IleGlu-Thr-Asp p-nitroanilide, Sigma-Aldrich®) were added at 2 nM to 100 μg of protein in a final volume of 100 μL . After incubation for 16 hours, absorbance was measured at 504 nm with a Multiskan TM FC Microplate Photometer reader (Thermo Fisher Scientific®).

2.8 qPCR assay

MDA-MB231 cells were treated with 0.5 μ M Complex 4 for 48 hours and total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen®), according to the manufacturer's protocol. Samples were analyzed for integrity on a 1.5% agarose gel and quantified and qualified by spectrophotometry using Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific®). For reverse transcription, the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen®) was used and the procedures were carried out according to the supplier's recommendation. The qPCR assays were conducted using the StepOnePlus equipment (Applied Biosystems®) and the reactions were prepared with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Melting curves were monitored and quantification was established based on normalization with the reference gene Beta-2-microglobulin (β 2M). The comparative Cq method was applied to the relative expression of the genes E-Cadherin (*CDH1*), Vimetin (*VIM*), Cytokeratin 18 (*CK18*), Annexin 1 (*ANXA1*), Interleukin 6 (*IL6*), Transforming Growth Factor beta 1 (*TGF β 1*), and Interleukin 1 beta (*IL1 β*). The sequences of the primers used are described in Table 1.

Table 1: Sequence of primers used for each target. E-Cadherin (*CDH1*), Vimetin (*VIM*), Cytokeratin 18 (*CK18*), Annexin 1 (*ANXA1*), Interleukin 6 (*IL6*), Transforming Growth Factor beta 1 (*TGF β 1*), Interleukin 1 beta (*IL1 β*) [20].

Gene	Sequence (Forward – Reverse) 5' – 3'	Amplicon (pb)
<i>CDH1</i>	F:CTGGCGTCTGTAGGAAGGC R:GCTGGCTCAAGTCAAAGTCCTG	240
<i>VIM</i>	F:GAGACGCATTGTCAACATCCTG R:CAAGAACACCCGCACCAAC	356
<i>CK18</i>	F:GCTCTGGGTTGACCGTGG R:GTGGTGCTCTCCTCAATCTGC	151
<i>ANXA1</i>	F:GATTCAGATGCCAGGGCCT R:CACTCTGCGAAGTTGTGGAT	111
<i>IL6</i>	F:GATTCCAAAGATGTAGCCGCC R:ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC	
<i>TGFβ1</i>	F:GTACCTGAACCCGTGTTGCTC R:CAGGAATTGTTGCTGTATTTCTGG	107
<i>IL1β</i>	F:ACAGGATATGGAGCAACAAGTGG R:GGGCTTATCATCTTTCAACACGC	136
<i>β2M</i>	F: CCTGCCGTGTGAAC-CATGT R: CGGCATCTTCAAACCTCC	94

2.9 Chemosensitization

The ability of Complex 4 to sensitize TNBC cells to treatment with Doxorubicin and Paclitaxel was also evaluated. For these assays, MDA-MB-231 cells were plated in t-25 tissue culture flasks to reach 80-85% confluence. Then, the cells were pre-treated with Complex 4 at 0.5 μM for 48 hours. Afterwards, the treatments were removed, cells were counted and re-plated in 96 or 24-well plates with a density of 1.5×10^4 and 5.0×10^2 cell/well, respectively. After adhesion, cells were treated with Doxorubicin (at 2.8, 5.6 and 11.2 μM) or Paclitaxel (at 0.45, 0.9 and 1.81 μM) for 48 hours. The effects of these treatments on cell viability or colony formation was determined by using MTT and clonogenic assays as previous described. The concentrations of Doxorubicin and Paclitaxel used was based on IC_{50} values that were previously determined by our group (data not shown).

2.10 Chou-Talalay

The Combination Index Theorem (CI) and Dose Reduction Index Equation (DRI) method (Chou and Talalay) was used to evaluate possible interactions (synergism, antagonism or additivity) between Complex 4 and VD in MDA-MB231 cells. According to this method, CI is used to quantitatively describe synergism ($\text{CI} < 1$), additive effect ($\text{CI} = 1$) and antagonism ($\text{CI} > 1$) [21-22]. Furthermore, the DRI indicates how much dose reduction is allowed, with $\text{DRI} > 1$ favorable reduction, $\text{DRI} < 1$ unfavorable reduction and $\text{DRI} = 1$ indicates no dose reduction [23].

For the assay, MDA-MB-231 cells were seeded in 96 plates (1.5×10^4 cells per well). The treatment was carried out for 48 hours, using seven serial concentrations, starting from twice the IC_{50} value for each compound, totaling 49 different combinations, all in triplicate. The IC_{50} value for VD was previously determined by our group (data not shown). After incubation, the MTT test was performed as described above and data was entered into CompuSyn software (version 1.0, Ting Chao and Nick Martin, Paramus, NJ, USA, 2005) to calculate CI and DRI.

2.11 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using the GraphPad Prism 8.0 software. Three independent triplicate assays were conducted and mean, and standard deviations were calculated. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test and Student's t-test and one-way ANOVA test followed by Tukey's post-test were applied to compare treatments.

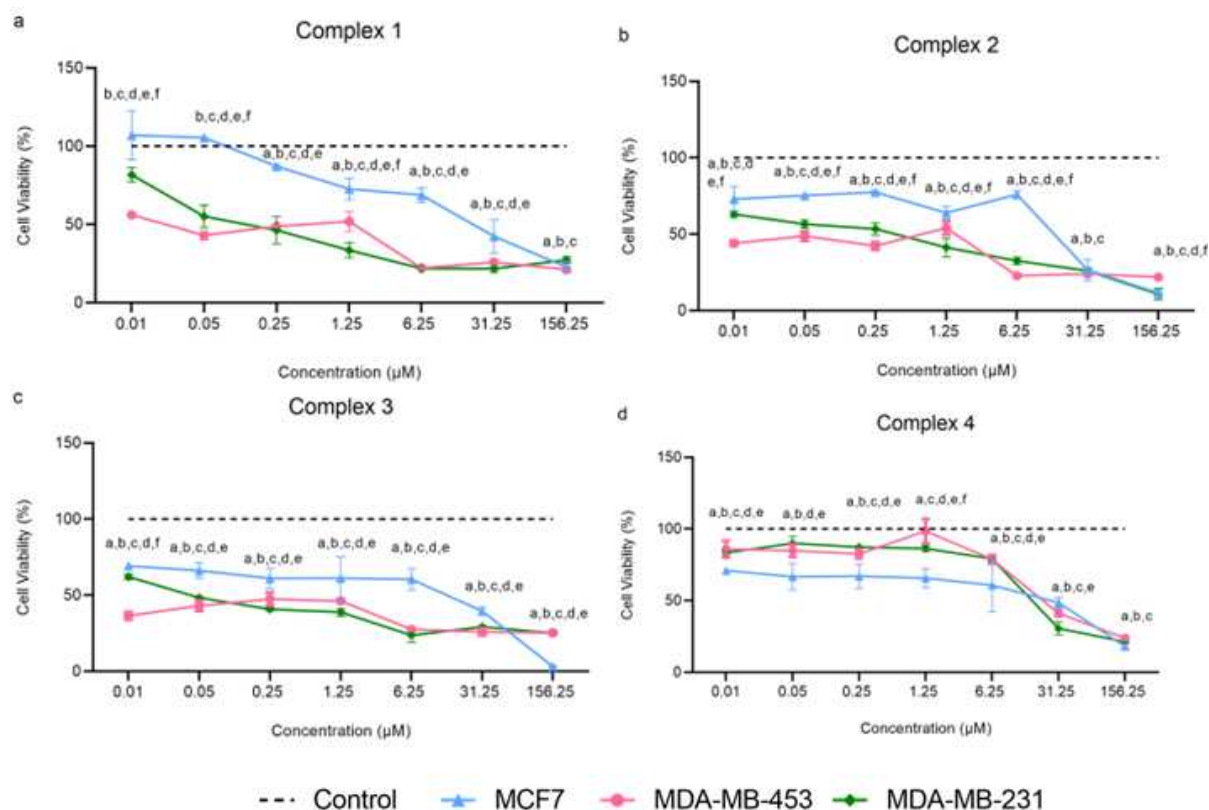
Differences were considered significant when $p < 0.05$. The IC_{50} was calculated by non-linear regression and the selectivity index (SI) was established for MDA-MB231 cells by the ratio between the IC_{50} of each of the non-tumor cell lines and the IC_{50} of MDA-MB231. SI values ≥ 2 were considered significant [24].

3 Results

3.1 Cytotoxicity of Zn(II) complexes to cell lines

Initially, the cytotoxicity of the four Zn(II) complexes and the five ligands individually was evaluated. In Fig. 2, the percentage of cell viability of the three tumor lines is observed after 48 hours of treatment with Complex 1, Complex 2, Complex 3 and Complex 4. The ER-positive BC cell line MCF7 proliferated after treatment with the lowest concentrations of Complex 1 (Fig. 2a) and cell viability decreased when the compound was added at 0.25 μ M or in higher concentrations. Complex 1 was cytotoxic to MDA-MB-453 and MDA-MB-231 lineages, especially to the TNBC cells. The cells' responses to Complex 2 (Fig. 2b) and Complex 3 (Fig. 2c) differed from Complex 1 mainly for MCF7 cells, being active to the ER-positive lineage at the first concentration tested. Finally, for Complex 4 (Fig. 2d), a slight cytotoxicity to the MDA-MB-231 cells was observed from 0.05 μ M, being more active at the higher concentrations evaluated.

Fig. 2: Cytotoxicity of mixed Zn(II) complexes in human breast cancer cell lines MCF7 (ER-positive BC), MDA-MB-453 (HER2-positive BC) e MDA-MB-231 (triple-negative). The treatments were carried out for 48 hours. (a) Complex 1 - $[Zn(Hz)(atc - Et)]$. (b) Complex 2 - $[Zn(atc - Et)(atc - Ch)]$. (c) Complex 3 - $[Zn(atc - Et)(Hsc)]Cl$. (d) Complex 4 - $[Zn(Hz)(Hsc)]Cl$. The experiment was carried out in triplicate and the results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significance was calculated by ANOVA and Tukey post-hoc test. The letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between cell lines. a) Control x MCF7, b) Control x MDA-MB-453, c) Control x MDA-MB-231, d) MCF7 x MDA-MB-453, e) MCF7 x MDA-MB-231 e f) MDA-MB-453 x MDA-MB-231.



The cytotoxicity of the ligands individually was also analyzed in order to determine their activities on cell lines and to confirm the role of mixed complexes for the observed effects (Supplementary Fig. 1). For Hatc-Et (Supplementary Fig. 1a), the most sensitive lineages were MDA-MB-453 and MDA-MB-231, with MCF7 being the most resistant. For this ligand, the dose-dependent profile in MDA-MB-231 was evident. The Hatc-Ch ligand (Supplementary Fig. 1b) proved to be more cytotoxic to the MDA-MB-231 cells when compared to the other lineages. Hhz (Supplementary Fig. 1c) decreased the viability of MCF7 and MDA-MB-453 cells only from 6.25 μM, being cytotoxic to MDA-MB-231 already at a concentration of 1.25 μM. For Hsc (Supplementary Fig. 1d) and ZnCl₂ (Supplementary Fig. 1e), only MDA-MB-453 cells were sensitive.

The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values for the mixed Zn(II) complexes and their ligands are shown in Table 2. For the representative TNBC MDA-MB231, the Complex 4 ligands were less active. In this case, the cytotoxicity is related to the complex and not to its ligands individually.

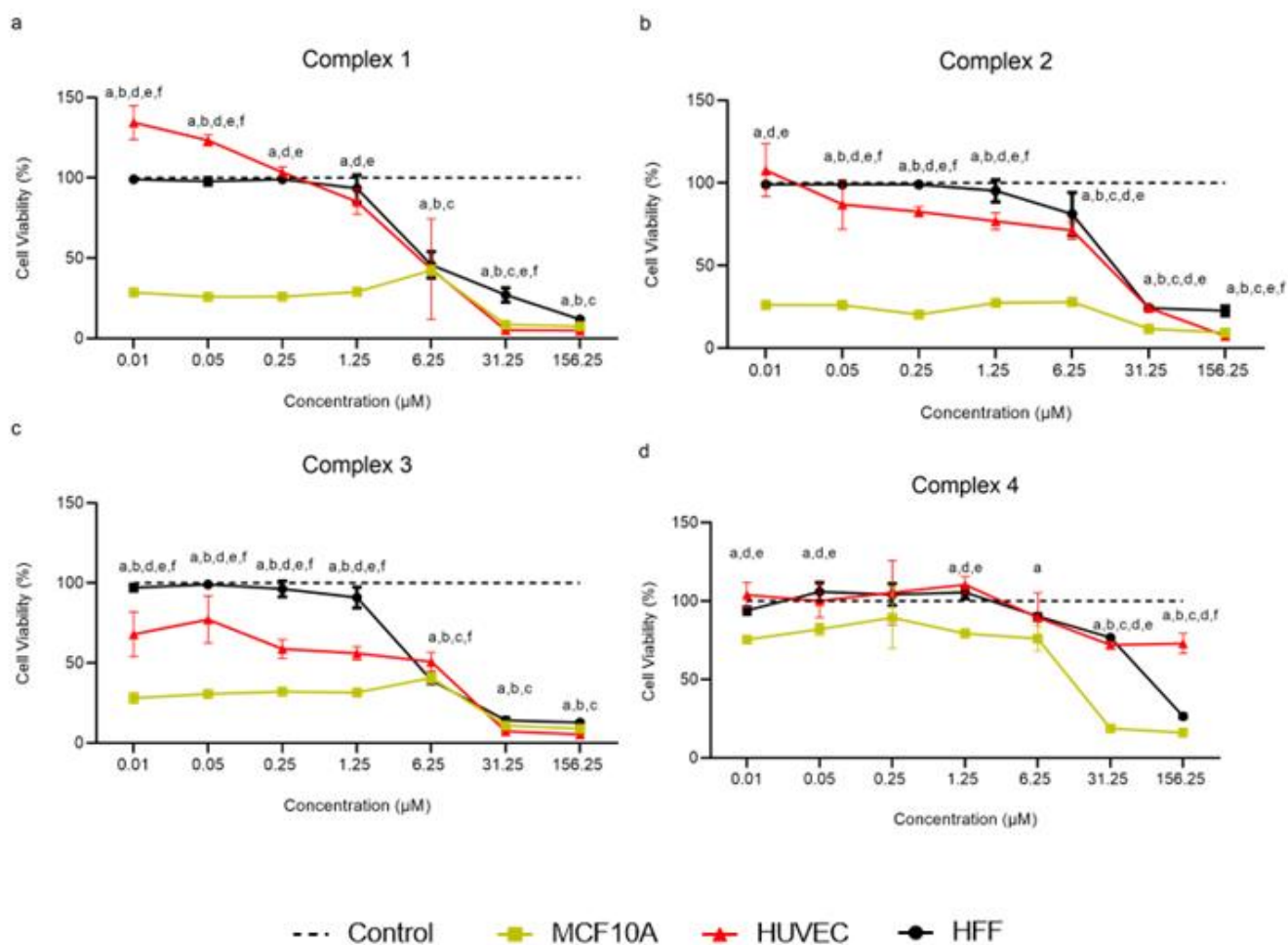
Table 2: Values of the concentration that inhibits 50% of cell viability (IC_{50}) after treatment of mammary tumor lines with mixed complexes of Zn(II) and its ligands for 48 hours.

	IC_{50} (μ M)		
	MCF7	MDA-MB-453	MDA-MB-231
Complex 1	9.43	0.32	0.24
Complex 2	18.49	< 0.01	0.92
Complex 3	19.34	< 0.01	0.16
Complex 4	10.41	12.82	16.3
Hatc – Et	NA	< 0.01	0.27
Hatc - Ch	NA	NA	6.25
Hhz	NA	4.11	30.3
Hhsc	NA	NA	NA
ZnCl₂	NA	< 0.01	NA

NA: $IC_{50} > 156.25 \mu$ M

Subsequently, the cytotoxicity of Complex 1, Complex 2, Complex 3, and Complex 4 was evaluated in the non-tumor cell lines MCF10A, HUVEC and HFF (Fig. 3). MCF10A cells were the most sensitive, especially when treated with Complex 1, Complex 2, and Complex 3. For HUVEC and HFF cells, a significant decrease in the viability was observed from 6.25μ M of Complex 1, (Fig. 3a), Complex 2 (Fig. 3b) and Complex 3 (Fig. 3c). However, for 6.25μ M of Complex 4, the viability of non-tumor cells remained above 50%.

Fig. 3: Cytotoxicity of mixed Zn(II) complexes in human non-tumor cell lines MCF10A (mammary epithelial cell line), HUVEC (umbilical vein endothelial) and HFF (fibroblast). The treatments were carried out for 48 hours. (a) Complex 1 - $[Zn(Hz)(atc - Et)]$. (b) Complex 2 - $[Zn(atc - Et)(atc - Ch)]$. (c) Complex 3 - $[Zn(atc - Et)(Hsc)]Cl$. (d) Complex 4 - $[Zn(Hz)(Hsc)]Cl$. The experiment was carried out in triplicate and the results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significance was calculated by ANOVA and Tukey post-hoc test. The letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between cell lines. a) Control x MCF10A, b) Control x HUVEC, c) Control HFF, d) MCF10A x HUVEC, e) MCF10A x HFF and f) HUVEC x HFF.



Complex 1, Complex 2, and Complex 3 presented IC_{50} values for MCF-10A cells lower than $0.01 \mu\text{M}$ (the lowest concentration tested, Table 3), and for HUVEC cells, Complex 4 was the most selective. Therefore, Complex 4 was selected for subsequent assays on the MDA-MB231 cell line, since it was active, selective, and its ligands individually did not alter cell viability. The concentrations were defined based on values proportional to the IC_{50} , precisely $\text{IC}_{50/2}$ ($8.0 \mu\text{M}$) and $\text{IC}_{50/32}$ ($0.5 \mu\text{M}$). The lowest concentration was defined based on cytotoxicity to non-tumor cells, so that the viability for these cells remained around 100% in treatments at $0.5 \mu\text{M}$.

Table 3: Concentration values that inhibit 50% of cell viability (IC_{50}) referring to the treatment of non-tumor cell lines with mixed Zn(II) complexes for 48 hours. The selectivity index (SI) is also presented. The SI was calculated by dividing the IC_{50} value of each complex on the respectively non-tumor cells by the IC_{50} of MDA-MB-231 cells.

	IC ₅₀ (μM)			SI (non-tumor/MDA-MB231)		
	MCF10A	HUVEC	HFF	MCF10A	HUVEC	HFF
Complex 1	< 0.01	2.52	4.57	NS	10.50	19.04
Complex 2	< 0.01	20,38	9.49	NS	22,15	10.31
Complex 3	< 0.01	10.09	4.22	NS	63.06	26.37
Complex 4	12,54	NA	131,25	0.77	HS	8,05

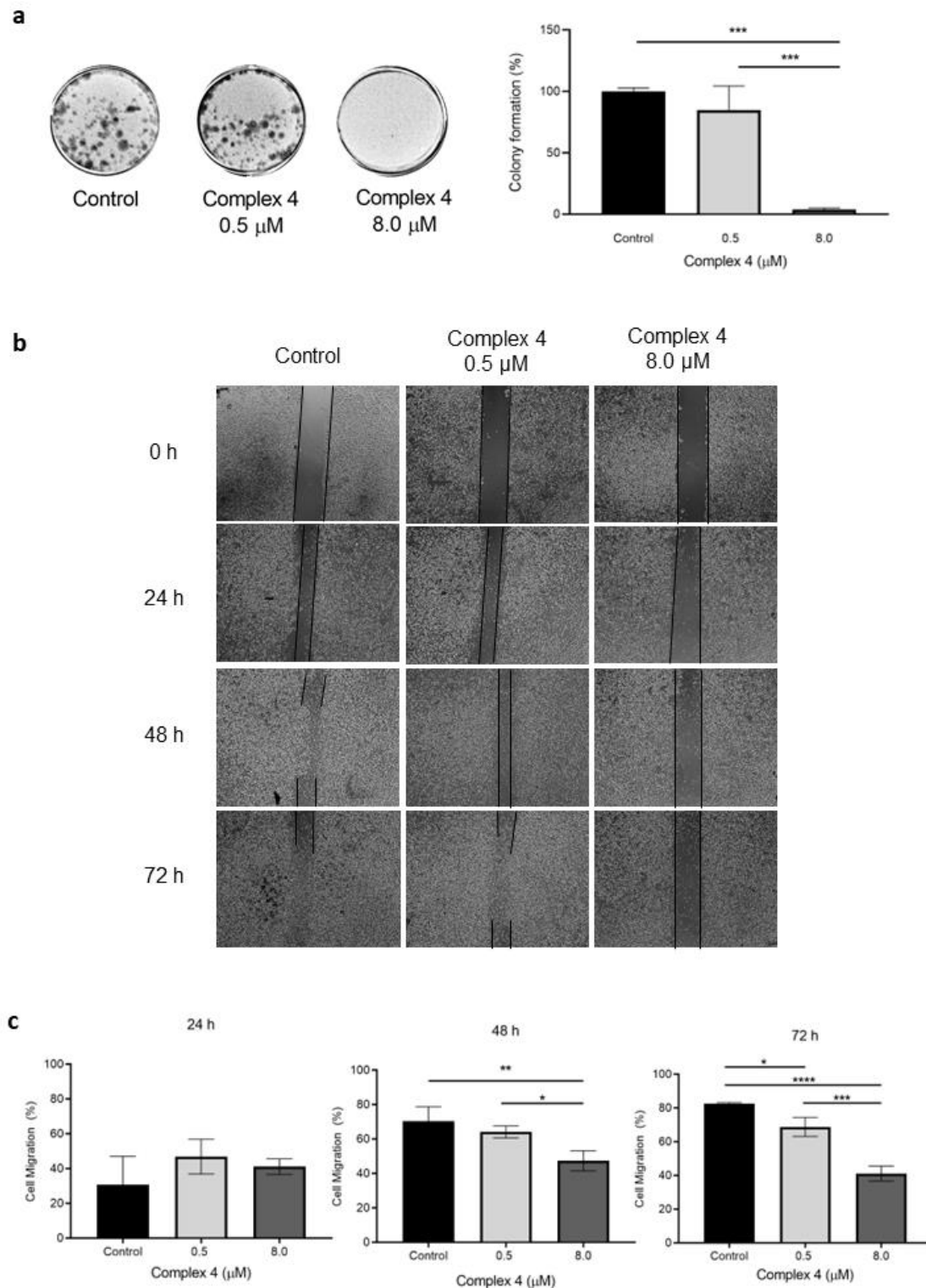
NA: IC₅₀ > 156.25 μM; NS: nonselective; HS: highly selective.

3.2 Colony formation and migration of MDA-MB231 cells

As MDA-MB231 cells are representative of aggressive breast tumors, the effects of Complex 4 in their clonogenicity was evaluated (Fig. 4). Clonogenicity refers to the potential for tumor cells to reach other tissues and initiate new colonization [25]. At the lowest concentration, a slight inhibition in colony formation was identified. However, when Complex 4 was added at 8.0 μM, there was a significative reduction in colony formation (Fig. 4a). It is important to note that 8.0 μM refers to IC_{50/2} of Complex 4.

The results observed in the wound healing assay (Fig. 4b and 4c) are consistent with those of clonogenicity, in which Complex 4 significantly inhibited the migration of MDA-MB231 cells. Interestingly, after 72 h of treatment, even at the lowest concentration of Complex 4 (0.5 μM), a significant inhibition of cell migration was observed, which was therefore time dependent.

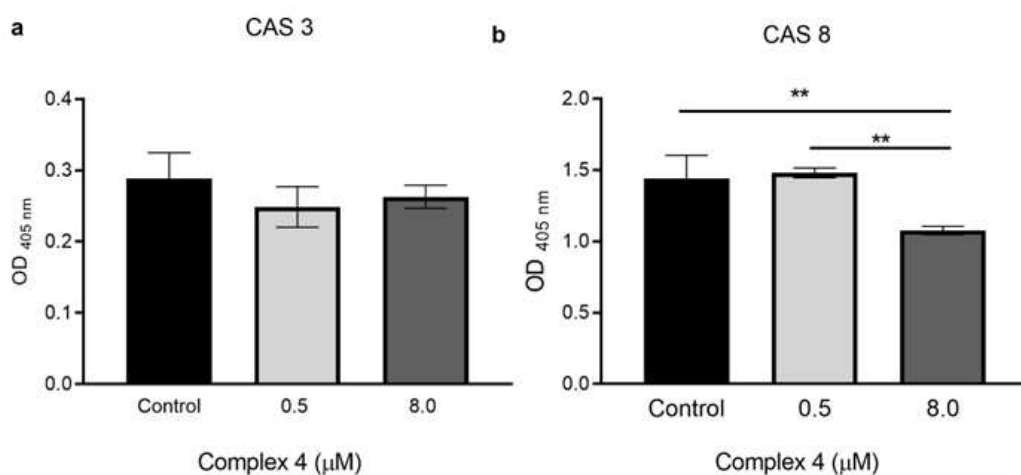
Fig. 4: Effect of Complex 4 on the clonogenicity and migration of MDA-MB-231 cell line (triple-negative breast cancer). Cells were treated with 0.5 μM and 8.0 μM Complex 4 - [Zn (Hz)(Hsc)]Cl. (a) Representative images of the colonies formed in the wells and quantification of colony formation of MDA-MB231 cells after 48 hours of treatment. (b) Representative images of cell migration and (c) quantification of wound closure after 24, 48 and 72 hours of treatment. The experiments were performed in triplicate and the results are expressed as mean ± standard deviation. Significance was calculated by ANOVA and Tukey's post-hoc test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.0001; ****p < 0.00001).



3.4 Enzymatic activity of CAS3 and CAS8

The activities of the CAS 3 and CAS 8 enzymes were also evaluated after treatments of MDA-MB-231 cells with Complex 4 (Fig. 5). No change was observed in the activity of CAS 3 (Fig. 5a). However, the activity of CAS 8 (Fig. 5b) was reduced when the cells were treated with 8.0 μ M of Complex 4.

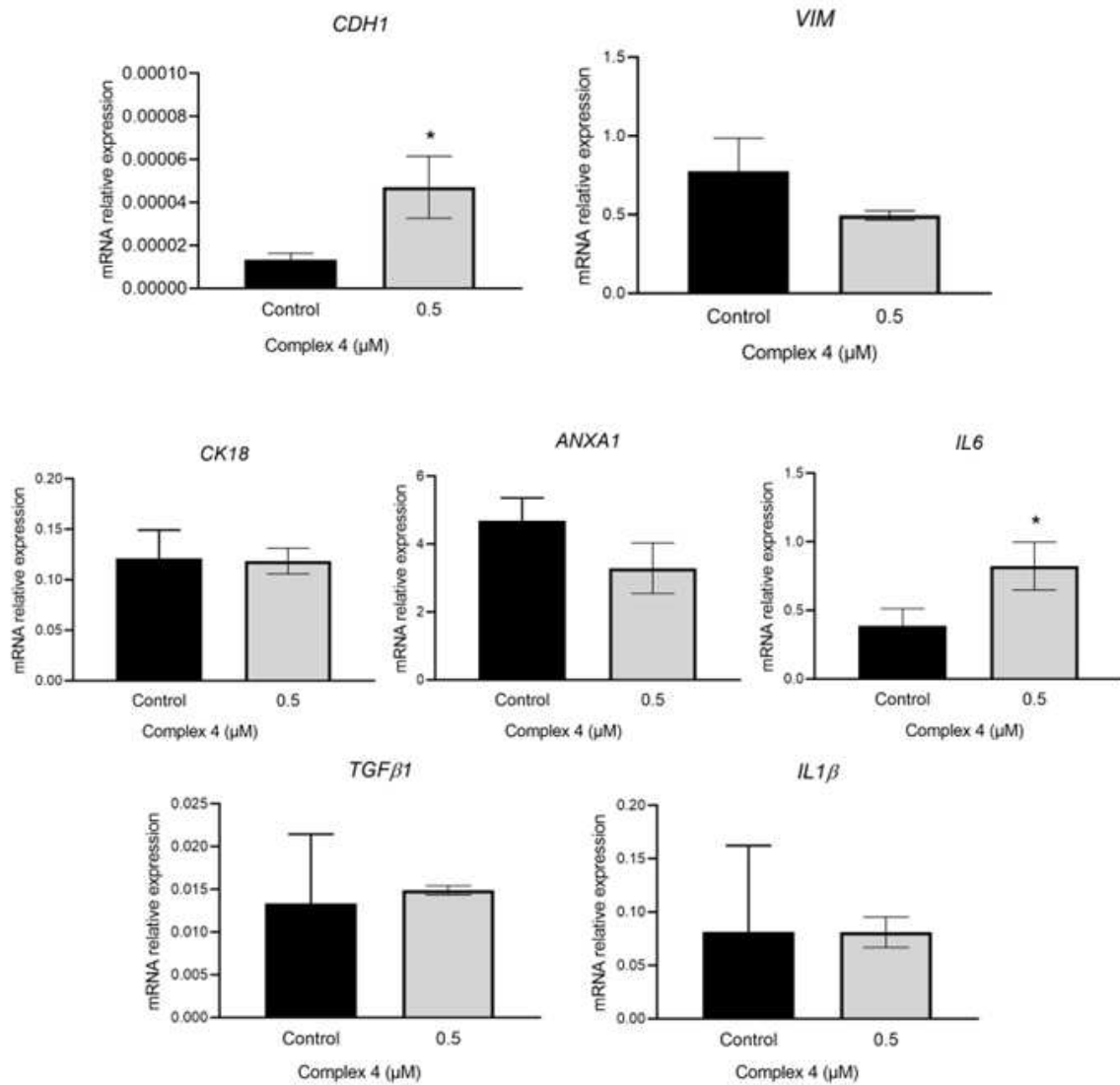
Fig. 5: Assessment of the activity of capases 3 (CAS 3) and 8 (CAS8) in the MDA-MB-231 cell line (triple-negative breast cancer). Cells were treated with 0.5 μ M and 8.0 μ M of Complex 4 - [Zn (Hz)(Hsc)] Cl. Quantification was performed by measuring the optical density (OD) at 405 nm. The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significance was calculated by ANOVA and Tukey's post-hoc test (** $p < 0.01$). (a) Quantification of CAS3 activity. (b) Quantification of CAS 8 activity.



3.5 Transcriptional modulation mediated by treatment with Complex 4

Transcriptional levels of *CDH1*, *VIM*, *CK18*, *ANXA1*, *IL6*, *TGF β 1* and *IL1 β* were quantified to evaluate the modulatory effects of Complex 4 on MDA-MB-231 cell transcripts (Fig. 6). Treatments with 0.5 μ M of the compound increased the gene expression of *CDH1* and *IL6*. For the other targets, no statistically significant differences were observed, despite a tendency towards a decrease in *VIM* and *ANXA1* transcripts.

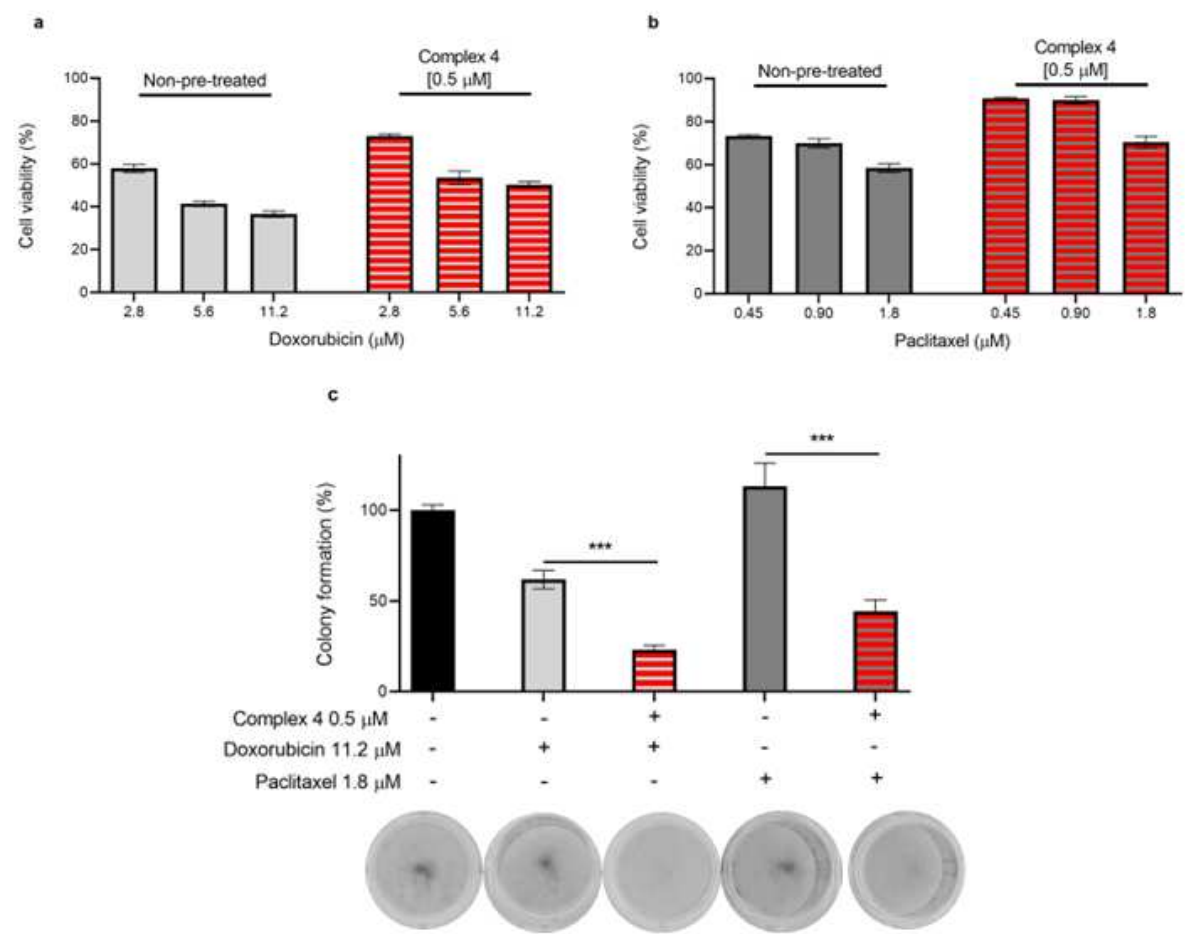
Fig. 6: Relative expression of transcriptional levels of E-Cadherin (*CDH1*), Vimentin (*VIM*), Cytokeratin 18 (*CK18*), Annexin A1 (*ANXA1*), Interleukin 6 (*IL6*), Transforming Growth Factor beta 1 (*TGFβ1*), Interleukin 1 beta (*IL1β*), after treating MDA-MB231 cells with 0.5 μM of Complex 4 - [Zn (Hz)(Hsc)] Cl for 48 hours. The results are expressed as mean ± standard deviation. Significance was calculated using Student's *t* test (**p* < 0.05).



3.6 Complex 4 sensitizes MDA-MB231 cells to treatment with Doxorubicin and Paclitaxel

Multidrug resistance is one of the main causes of chemotherapy failure [26]. Therefore, we evaluated whether Complex 4 sensitizes MDA-MB231 cells to the chemotherapy drugs Doxorubicin and Paclitaxel (Fig. 7). Pretreatment with 0.5 μM Complex 4 for 48 hours did not significantly alter cell viability (Fig. 7a and 7b). However, when they were pretreated with Complex 4, the clonogenicity of the TNBC lineage was significantly reduced by both chemotherapeutics. This inhibition was more evident for Doxorubicin (Fig. 7c).

Fig. 7: Chemosensitization assay performed on MDA-MB231 cells (triple-negative breast cancer) pretreated with 0.5 μ M **Complex 4**. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. (a) Viability of cells pretreated with **Complex 4** and subsequently treated with Doxorubicin. (b) Viability of cells pretreated with **Complex 4** and subsequently treated with Paclitaxel. (c) Assessment of colony formation of cells pretreated with **Complex 4** and subsequently treated with Doxorubicin and Paclitaxel. Significance was calculated by ANOVA and Student's *t* test (***) $p < 0,0001$).

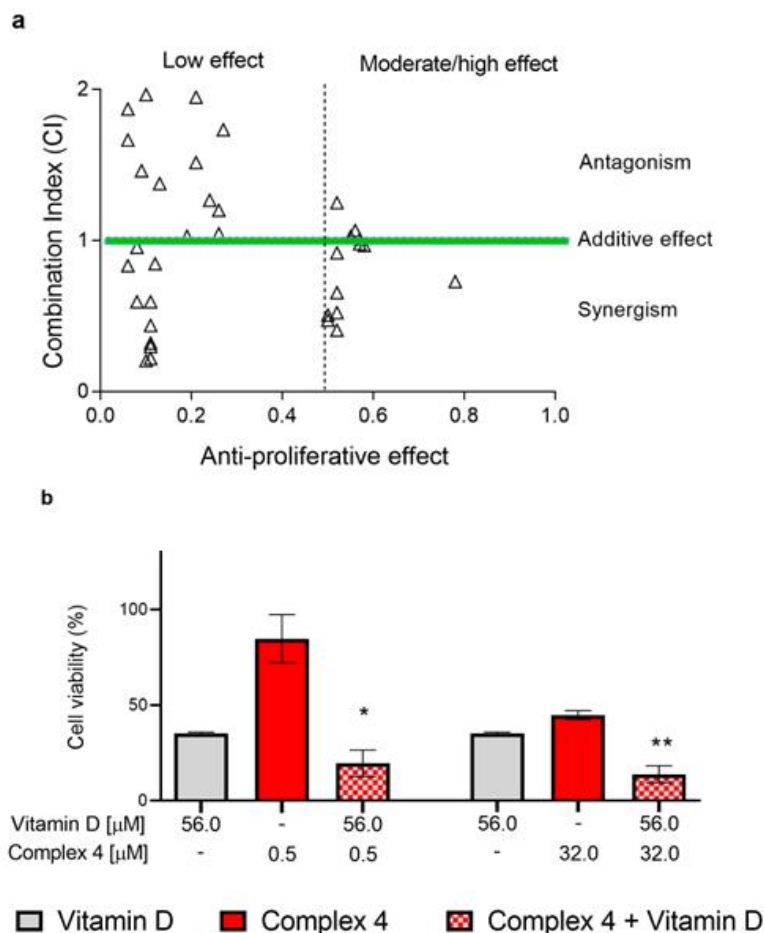


3.7 Synergism of Complex 4 and Vitamin D

Finally, we evaluated the synergism of Complex 4 with VD, applying the Chou-Talalay method (Fig. 8). The analysis of *in vitro* interactions was performed on non-constant ratio binary combinations in the MDA-MB-231 cell line. Fig. 8a shows the results of the combined treatment conducted for 48 hours. Synergistic combinations were observed, with a significant inhibition fraction and, therefore, promising for the control of TNBC cells.

In a detailed analysis, 15 synergistic combinations were identified, including 3 strong synergisms, 9 synergisms, 2 moderate synergisms and 1 weak synergism. Furthermore, 9 combinations were additive (Supplementary Table 1). Interestingly, strong synergism occurred at the lowest concentration of Complex 4 (0.5 μ M) with the lowest concentrations of VD, all favorable to dose reduction ($\text{DRI} > 1.0$). The concentration of 0.5 μ M of Complex 4 was one of those used in previous assays. Additionally, Fig. 8b shows that the combined treatment of VD (56 μ M) and Complex 4 was cytotoxic to MDA-MB-231 cells when this complex was added at low (0.5 μ M) or higher (32 μ M) concentrations.

Fig. 8: Evaluation of the synergism of Complex 4 - $[\text{Zn}(\text{Hz})(\text{Hsc})]\text{Cl}$ with Vitamin D (VD) in MDA-MB-231 cells (triple-negative breast cancer). (a) Combination Index values as a function of inhibition fraction calculated by the Chou-Talalay method. (b) Comparative cell viability of synergistic combinations of 32 μ M and 0.5 μ M Complex 4 with VD (56 μ M). The assay was conducted for 48 hours. The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significance was calculated by ANOVA and Tukey's post-hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).



4. Discussion

BC is a public health problem. Drug resistance, relapse and metastasis continue to impact patient survival, which demands dedicated efforts to discover new strategies for early diagnosis and effective treatment. TNBC is the most aggressive and has the lowest survival rate due to its heterogeneity, worse prognosis and limited therapeutic methods. Chemotherapy remains the standard treatment, however, with limited effectiveness given the resistance of malignant cells associated with the tumor microenvironment and the expression of drug efflux proteins [27]. In the present study, four new mixed Zn(II) complexes were synthesized and tested in MDA-MB231 cells (TNBC), including assays dedicated to evaluating the ability of these compounds to sensitize these cells to traditional chemotherapeutic agents.

Over the years, different classes of coordinated zinc complexes have been shown to be potentially antitumor [28]. In 2022, Chen and collaborators [29] evaluated the zinc 3,5 – di-tert-butyl complex ($\text{Zn}\{[\text{CH}_3)_3\text{C}]_2\text{Sal}\}22^-$) in the MDA-MB-231 cell line, with

IC₅₀ greater than 50 μ M. Our mixed Zn(II) complexes with Schiff base were more active, and significantly decreased the viability of BC cells with IC₅₀ < 20 μ M. Complex **4** was the most selective. Complex **1**, Complex **2** and Complex **3** significantly decreased the viability of non-tumor cells (IC₅₀ < 1.0 μ M) but did not show selectivity when compared to their ligands individually. For the MDA-MB-231 lineage, the thiosemicarbazone ligands derived from the ethyl and cyclohexyl groups showed cytotoxic activity of 0.27 and 6.25 μ M, respectively, while only the compound with the ethyl group was selective. Therefore, structural changes in our complexes could lead to distinct and even promising inhibitory effects in other tumor models.

Complex **4**, in turn, decreased the viability of MDA-MB-231 cells at the lowest concentration tested (< 0.01 μ M). For this compound, the ligands Hhz and Hhsc and the metallic precursor ZnCl₂, did not alter the viability of MCF7 and MDA-MB-231 cells, and for TNBC cells, the IC₅₀ of Hhz was higher than that observed for the complex. Thus, Complex **4** is much more active than purely organic molecules (free ligands), noting the action of the metal ion in the complex's activity. In this context, our data highlight the importance of complexing the Hhsc ligand to the Zn(II) center to obtain the desired biological results, especially in aggressive and advanced tumors.

Complex **4** was then chosen for subsequent assays on MDA-MB231 cells, representative of CMTN. The clonogenicity and migration of this lineage were significantly inhibited, events that play a crucial role in tumor progression and metastasis. [30]. Previously, hybrid complexes containing estrone-salicylaldehyde semicarbazone linked to metal ions Cu(II) and Ga(II) inhibited colony formation of colon cancer cells (SW480) [31]. Chen [29] also synthesized a Zn(II) complex capable of inhibiting the migration and invasion of murine mammary carcinoma cells (4T1) and other Zn complexes with the ligand benzimidazole inhibited adhesion and migration in hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2), melanoma (SK-MEL-1), colorectal (HT018), cervical (HeLa) and TNBC cells (MDA-MB-231) [32].

Zn(II)-dependent proteins, such as zinc fingers and matrix metalloproteinases, are involved in key events related to tumorigenesis such as epithelial-mesenchymal transition (EMT), angiogenesis, proliferation and migration. Furthermore, this ion can act as a second messenger, modulating the immune response by mimicking cytokines and hormones [33]. We observed an increase in *CDH1* transcripts after treating MDA-MB231 cells with Complex **4**, suggesting the compound's ability to modulate EMT. Furthermore, there was a decrease in the expression of *VIM* and *ANXA1*, with upregulation of *IL6*.

Interestingly, *ANXA1* regulates the expression of the metallothionein family genes, which modulate intracellular zinc homeostasis [34]. In this sense, we present a new possible signaling mechanism related to Zn(II) complexes with Schiff base, although additional studies are needed to prove the involvement of the *ANXA1/MT2A/zinc* axis in the response of TNBC cells to Zn(II) complexes. Finally, considering the crosstalk between AnxA1 and IL-6 in TNBC cells [35], the increase in *IL6* expression may have occurred in response to the decrease in *ANXA1* transcripts, in an attempt for the cells to restore the AnxA1 autocrine signaling in TNBC. Therefore, molecular assays explain the observed phenotypic results, such that reduced clonogenicity and migration may be associated with modulation of EMT via CDH1, VIM and ANXA1.

Our results for the enzymatic activity of CAS3 and CAS8 demonstrated cell death independent of these caspases. Megger and collaborators identified that proteins such as Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1 (AIFM1) and HtrA Serine Peptidase 2 (HTRA2) are associated with caspase-independent apoptosis pathways, based on the treatment of Cu(II) metal complex with hydrazone in cells of hepatocellular carcinoma (HepG2) [36-37]. Thus, Complex 4 can induce necroptosis of TNBC cells, which is a death mechanism that overcomes apoptosis resistance and triggers antitumor immunity [38].

Given the resistance of TNBC cells to conventional chemotherapy drugs, the ability of Complex 4 to sensitize MDA-MB-231 cells to treatment with Doxorubicin and Paclitaxel was observed. Recently, Rudolf and colleagues [39] showed that Zn intracellular content in hiPCS-CMs cells has pleiotropic effects on Doxorubicin toxicities. Furthermore, Xue et al [40] showed that Zn promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel through modulation of EMT markers, which reinforces the data from our study. Finally, it is known that AnxA1 has a profound implication in aggressiveness of TNBC and susceptibility to treatment [41]. Even given the complexity of the events related to therapeutic failure, our results expand the putative mechanisms behind the response of TNBC cells to Zn complexes, with Complex 4 being potentially promising.

In fact, for TNBC, chemotherapy remains the main therapeutic strategy, with the combination of drugs being a promising alternative, since the effect resulting from synergism overlaps with individual use and allows the reduction of doses used [42]. In recent years, VD has been associated with antineoplastic drugs such as cisplatin, carboplatin, doxorubicin, 5-fluorouracil [5-Fu], cytarabine, hydroxyquinoline,

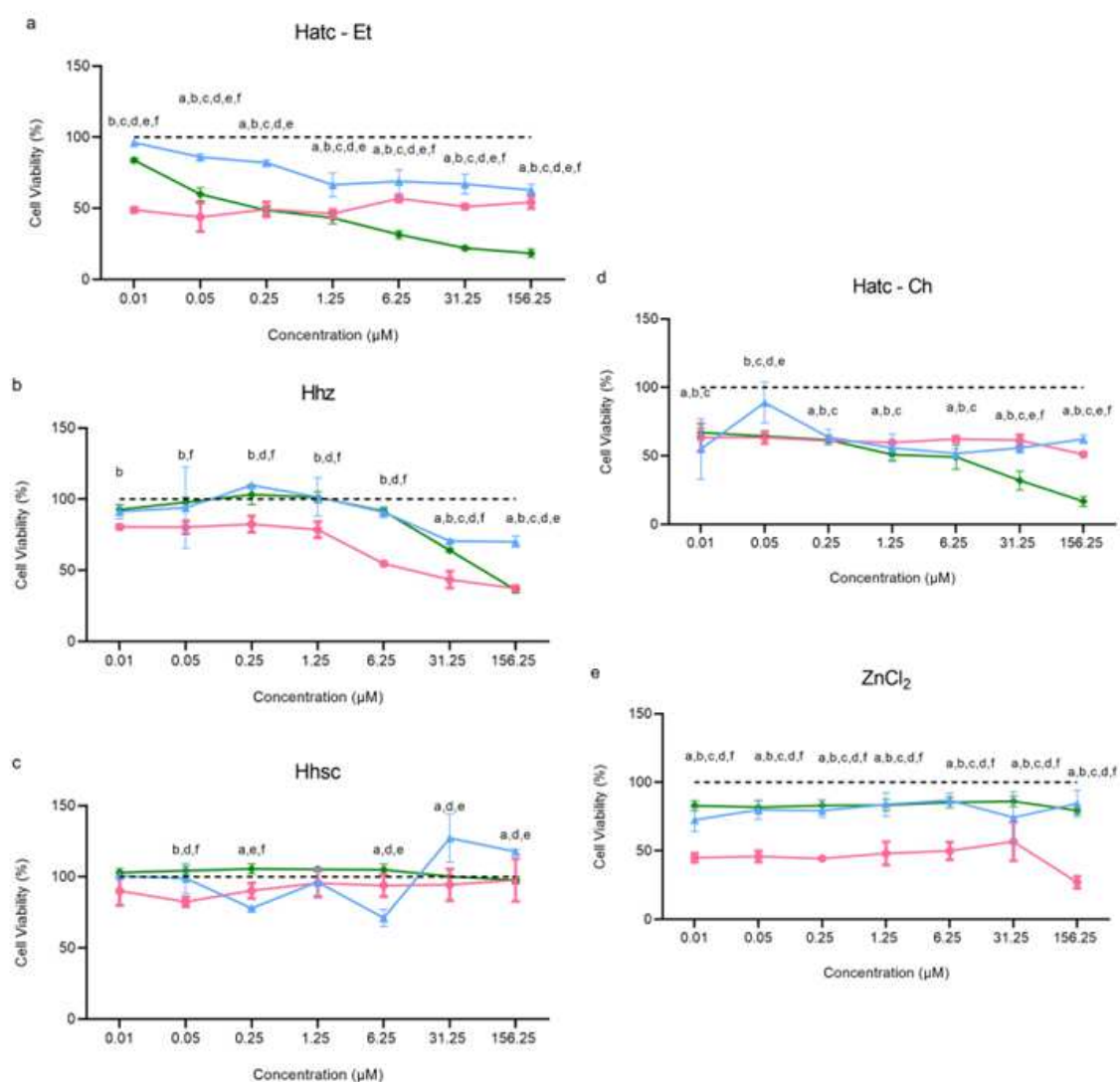
gemcitabine, paclitaxel and docetaxel, with relevant synergistic effects [43]. We found synergistic combinations of VD with Complex **4** at 0.5 μ M and with a favorable dose reduction. The combination of drugs that act synergistically reduces toxicity and enhances the desired effect by activating different signaling pathways, which is particularly interesting in the treatment of complex diseases such as TNBC.

5. Conclusion

Chemotherapy remains the main strategy for treating TNBC. However, these tumors tend to progress rapidly, since conventional chemotherapies are insufficient to suppress tumor-associated chemoresistance. New compounds are needed, so medicinal chemistry has stood out by proposing optimized structures. The present work reports a new Zn(II) complex with Schiff base, Complex **4**, as a promising agent for TNBC management. This compound was the most active and selective for TBNC cells, in addition to inhibiting colony formation and migration. Importantly, Complex **4** sensitized TBNC cells to Doxorubicin and Paclitaxel, upregulating CDH1 transcripts. This compound was also synergistic in combination with VD. Finally, given the molecular complexity of TNBC, we suggest that the ANXA1/MT2A/zinc axis be investigated in depth. According to the results presented here, this signaling pathway can potentially be modulated by Zn(II) complexes with Schiff base, altering EMT mechanism and therefore TNBC resistance phenotype.

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1: Cytotoxicity of ligands of mixed Zn(II) complexes in MCF7 (ER-positive breast cancer), MDA-MB-453 (HER2-positive breast cancer) and MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer) cell lines. The treatment was carried out for 48 hours. (a) Hatc – Et. (B) Hhz. (c) Hhsc. (d) Hatc - Ch. (e) ZnCl₂. The experiments were performed in triplicate and the results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significance was calculated by ANOVA and Tukey's post-hoc test. Letters represent significance ($p < 0.05$) between cell lines. a) Control x MCF7, b) Control x MDA-MB-453, c) Control x MDA-MB-231, d) MCF7 x MDA-MB-453, e) MCF7 x MDA-MB-231 and f) MDA-MB-453 x MDA-MB-231.



-- Control ▲ MCF7 ■ MDA-MB-453 ◆ MDA-MB-231

Supplementary Table 1

Supplementary Table 1: Summary of the results of the Chou- Talalay method combining Complex 4 - [Zn(Hz)(Hsc)]Cl (uM) and Vitamin D (VD – uM) in MDA-MB-231 (triple negative breast cancer line). Cells were treated for 48 hours .

Binary combinations		Fraction Affected	Paramters			Interactions		
		(fa)						
Vitamin D (μM)	Complex 4 (μM)		CI	DRI (Complex 4)	DRI (Vitmin D)	Synergism	Summation	Antagonism
56.0	32.0	0.78	0.72758	14.2248	1.52143	++		
28.0		0.52	0.91752	2.56338	1.89606		±	
14.0		0.52	0.65381	2.56338	3.79211	+++		
7.0		0.52	0.52196	2.56338	7.58422	+++		
3.5		0.50	0.50602	2.28333	14.6917	+++		
1.75		0.50	0.47199	2.28333	29.3834	+++		
0.875		0.52	0.40659	2.56338	60.6738	+++		
56.0	16.0	0.52	1.24988	5.12677	0.94803			--
28.0		0.27	1.73177	1.08458	1.23494			---
14.0		0.21	1.94810	0.67286	2.16494			---
7		0.26	1.19968	1.00700	4.83961			-
3.5		0.24	1.26646	0.86307	9.27578			--
1.75		0.26	1.04471	1.00700	19.3584		±	
0.875		0.21	1.51507	0.67286	34.6391			---
56.0	8.0	0.56	1.06642	12.9423	1.01097		±	
28.0		0.06	7.47404	0.17118	0.61268			----
14.0		0.06	6.65795	0.17118	1.22535			----
7		0.08	4.09722	0.26763	2.77245			----
3.5		0.01	84.3324	0.01192	2.34903			-----
1.75		0.02	30.5224	0.03294	6.21981			-----
0.875		0.30	16.7164	0.06007	14.6838			-----
56.0	4.0	0.57	1.00965	27.4525	1.02751		±	
28.0		1x10 ⁻⁴	33115.4	3.02 x 10 ⁻⁵	0.04657			-----
14.0		1x10 ⁻⁴	33.104	3.02 x 10 ⁻⁵	0.09315			-----
7		1x10 ⁻⁴	33099.3	3.02 x 10 ⁻⁵	0.18630			-----
3.5		1x10 ⁻⁴	33096.6	3.02 x 10 ⁻⁵	0.37260			-----
1.75		1x10 ⁻⁴	33095.2	3.02 x 10 ⁻⁵	0.74519			-----
0.875		1x10 ⁻⁴	33094.6	3.02 x 10 ⁻⁵	1.49038			-----
56.0	2.0	0.55	1.02574	48.8263	0.99477		±	
28.0		0.1	1.96381	1.52566	0.76432			-
14.0		0.09	1.46083	1.28939	1.45927			--

7		0.06	1.86851	0.68471	2.45071		---
3.5		0.06	1.66449	0.68471	4.90141		---
1.75		0.04	2.82628	0.36964	8.26893		---
0.875		0.04	2.76581	0.36964	16.5379		---
56.0	1.0	0.58	0.96605	116.501	1.04443	±	
28.0		0.13	1.37607	4.68230	0.86022		--
14.0		0.12	0.84661	4.10243	1.65878	+	
7		0.11	0.59446	3.55901	3.18996	+++	
3.5		0.11	0.43772	3.55901	6.37992	+++	
1.75		0.06	0.83224	1.36943	9.80282	++	
0.875		0.11	0.32016	3.55901	25.5197	+++	
56.0	0.5	0.57	0.97778	219.620	1.02751	±	
28.0		0.19	1.02673	17.9703	1.02978	±	
14.0		0.08	0.95492	4.28205	1.38622	±	
7		0.08	0.59423	4.28205	2.77245	+++	
3.5		0.11	0.29723	7.11803	6.37992	++++	
1.75		0.11	0.21886	7.11803	12.7598	++++	
0.875		0.1	0.20475	6.10265	24.4582	++++	

Description and symbols of synergism or antagonism in drug combination studies: Very Strong Synergism (+ + + + +); Strong Synergism (+ + + +); Synergism (+ + +); Moderate Synergism (+ +) and Slight Synergism (+); Nearly Additive (±); Very Strong Antagonism (- - - - -); Strong Antagonism (- - - -); Antagonism (- - -). Moderate Antagonism (- -) and Slight Antagonism (-) [23] CI: Combination Index; DRI: Dose Reduction Index

Author Contributions: Raiane A.S. Machado, Raoni P. Siqueira: Formal analysis, Writing – original draft, Investigation, Methodology, Writing - review & editing. Fernanda C. Silva; André C. P. Matos; Dayanne S. Borges: Investigation, Methodology. Thaise Gonçalves Araújo: Project administration, Conceptualization, Formal analysis, Writing – original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Acknowledgments: The authors would like to thank Professor Luiz Ricardo Goulart Filho (*in memoriam*), PhD, for all his teachings and for his dedication to science.

Funding: The authors would like to thank the financial support by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais FAPEMIG Project APQ-00760-18 and REMITRIBIC RED-00031-21), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology - INCT – Teranano.

Conflicts of Interest: The authors report no declarations of interest.

References

- [1] Sung, H., et al. (2021). "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." **71**(3): 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Alagoz, O. and K. P. Lowry (2021). "Impact of the COVID-19 Pandemic on Breast Cancer Mortality in the US: Estimates From Collaborative Simulation Modeling." **113**(11): 1484-1494. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab097>
- [3] Harbeck, N., et al. (2019). "Breast cancer." Nat Rev Dis Primers **5**(1): 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- [4] Bai, X., et al. (2021). "Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel?" Cancer Lett **497**: 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.016>
- [5] Yin, L., et al. (2020). "Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress." Breast Cancer Res **22**(1): 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

- [6] McGee, Sharon F (2023). Understanding metastasis: current paradigms and therapeutic challenges in breast cancer progression. Royal College of Surgeons in Ireland. Journal contribution. <https://hdl.handle.net/10779/rcsi.23216957.v1>. Accessed 30 September 2023.
- [7] Qu, Z., et al. (2023). "A Systematic Study on Zinc-Related Metabolism in Breast Cancer." Nutrients **15**(7). <https://doi.org/10.3390/nu15071703>
- [8] Rusch, P., et al. (2021). "Zinc distribution within breast cancer tissue of different intrinsic subtypes." Arch Gynecol Obstet **303**(1): 195-205. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05789-8>
- [9] Chandler, P., et al. (2016). "Subtype-specific accumulation of intracellular zinc pools is associated with the malignant phenotype in breast cancer." Mol Cancer **15**: 2. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0486-y>
- [10] Geraki, K., et al. (2002). "Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study." Phys Med Biol **47**(13): 2327-2339. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/47/13/310>
- [11] Fahmy, H. M., et al. (2023). "Novel palladium(II) and Zinc(II) Schiff base complexes: Synthesis, biophysical studies, and anticancer activity investigation." J Trace Elem Med Biol **79**: 127236. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127236>
- [12] Manikandamathavan, V. M., et al. (2014). "DNA/protein interaction and cytotoxic activity of imidazole terpyridine derived Cu(II)/Zn(II) metal complexes." Dalton Trans **43**(34): 13018-13031. <https://doi.org/10.1039/C4DT01378F>
- [13] Bhattacharyya, S., et al. (2014). "Effect of glucosamine conjugation to zinc(II) complexes of a bis-pyrazole ligand: syntheses, characterization and anticancer activity." J Inorg Biochem **140**: 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.009>.
- [14] Narwane, M., et al. (2021). "Tris-(2-pyridyl)-pyrazolyl Borate Zinc(II) Complexes: Synthesis, DNA/Protein Binding and In Vitro Cytotoxicity Studies." **26**(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237341>
- [15] Mahadevi, P. and S. Sumathi (2023). "Schiff base metal complexes: Synthesis, optoelectronic, biological studies, fabrication of zinc oxide nanoparticles and its photocatalytic activity." Results in Chemistry **6**: 101026. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101026>
- [16] Bashir, M., et al. (2023). "Syntheses, Structural Characterization, and Cytotoxicity Assessment of Novel Mn(II) and Zn(II) Complexes of Aroyl-Hydrazone Schiff Base Ligand." **8**(3): 3026-3042. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05927>
- [17] Çakmak, R., et al. (2023). "Synthesis, spectroscopic, thermal analysis and in vitro cytotoxicity, anticholinesterase and antioxidant activities of new Co(II), Ni(II), Cu(II),

Zn(II), and Ru(III) complexes of pyrazolone-based Schiff base ligand." *Journal of Molecular Structure* **1292**: 136225. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136225>

[18] Soares, M. A., et al. (2012). "N4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and investigation on the mechanism of action." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**(11): 3396-3409. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027>

[19] Huang, Z., et al. (2020). "Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model." *Onco Targets Ther* **13**: 5395-5405. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>

[20] Araujo, T., et al. (2014). "Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breast cancer: a transcriptional disequilibrium." *Acta Histochem.* **116**(7):1178-84. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.06.008>.

[21] Chou, T.-C. and P. Talalay (1983). "Analysis of Combined Drug Effects - a New Look at a Very Old Problem." *Trends in Pharmacological Sciences* **4**: 450-454. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(83\)90490-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(83)90490-X)

[22] Chou, T. C. and P. Talalay (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)

[23] Chou, T. C. (2008). "Preclinical versus clinical drug combination studies." *Leuk Lymphoma* **49**(11): 2059-2080. <https://doi.org/10.1080/10428190802353591>

[24] Badisa, R. B., et al. (2009). "Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells." *Anticancer Res* **29**(8): 2993-2996. PMID: 19661306; PMCID: PMC2885965

[25] Balakrishnan, N., et al. (2020). "Thiosemicarbazone(s)-anchored water soluble mono- and bimetallic Cu(ii) complexes: enzyme-like activities, biomolecular interactions, anticancer property and real-time live cytotoxicity." **49**(27): 9411-9424. <https://doi.org/10.1039/d0dt01309a>

[26] Abd-Ellatef, G. E. F., et al. (2022). "Glabratephrin reverses doxorubicin resistance in triple negative breast cancer by inhibiting P-glycoprotein." *Pharmacol Res* **175**: 105975. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105975>

[27] Nedeljković, M. and A. Damjanović (2019). "Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge." *Cells* **8**(9). <https://doi.org/10.3390/cells8090957>

[28] Porchia, M., et al. (2020). "Zinc Complexes with Nitrogen Donor Ligands as Anticancer Agents." *Molecules* **25**(24): 5814. <https://doi.org/10.3390/molecules25245814>

- [29] Chen, H., et al. (2022). "Zinc complex of 3,5-di-tert-butyl salicylate inhibits viability, migration, and invasion in triple-negative breast cancer cells." *Sci Rep* **12**(1): 4545. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08704-0>
- [30] Clark, A. G. and D. M. Vignjevic (2015). "Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment." *Curr Opin Cell Biol* **36**: 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.004>
- [31] Enyedy É, A., et al. (2021). "Complex formation of an estrone-salicylaldehyde semicarbazone hybrid with copper(II) and gallium(III): Solution equilibria and biological activity." *J Inorg Biochem* **220**: 111468. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111468>
- [32] AlAjmi MF, Hussain A, Rehman MT, Khan AA, Shaikh PA, Khan RA (2018). Design, "Synthesis, and Biological Evaluation of Benzimidazole-Derived Biocompatible Copper(II) and Zinc(II) Complexes as Anticancer Chemotherapeutics". *Int J Mol Sci* **19**(5):1492. <https://doi.org/10.3390/ijms19051492>.
- [33] Qu, Z., et al. (2023). "A Systematic Study on Zinc-Related Metabolism in Breast Cancer." *Nutrients* **15**(7): 1703. <https://doi.org/10.3390/nu15071703>
- [34] Irie, M., et al. (2023). "Annexin A1 is a cell-intrinsic metalloregulator of zinc in human ILC2s." *Cell Rep* **42**(6): 112610. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112610>
- [35] Vecchi, L., et al. (2022). "Interleukin-6 Signaling in Triple Negative Breast Cancer Cells Elicits the Annexin A1/Formyl Peptide Receptor 1 Axis and Affects the Tumor Microenvironment." **11**(10). <https://doi.org/10.3390/cells11101705>
- [36] Megger, D. A., et al. (2017). "Structurally related hydrazone-based metal complexes with different antitumor activities variably induce apoptotic cell death." *Dalton Transactions* **46**(14): 4759-4767. <https://doi.org/10.1039/C6DT04613D>
- [37] Tait, S. W. and D. R. Green (2008). "Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut." *Oncogene* **27**(50): 6452-6461. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.311>
- [38] Gong, Y., et al. (2019). "The role of necroptosis in cancer biology and therapy." *Mol Cancer* **18**(1): 100. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>
- [39] Rudolf, K. and E. Rudolf (2023). "Increased Intracellular Free Zinc Has Pleiotropic Effects on Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in hiPCS-CMs Cells." **24**(5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054518>
- [40] Xue, Y. N., et al. (2019). "Zinc promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis." *Prostate* **79**(6): 647-656. <https://doi.org/10.1002/pros.23772>
- [41] Pearanpan, L., et al. (2022). "A Cell-Based Systematic Review on the Role of Annexin A1 in Triple-Negative Breast Cancers." *Int J Mol Sci* **23**(15): 8256. <https://doi.org/10.3390/ijms23158256>

[42] Duarte, D. and N. Vale (2020). "New Trends for Antimalarial Drugs: Synergism between Antineoplastics and Antimalarials on Breast Cancer Cells." **10**(12). <https://doi.org/10.3390/biom10121623>

[43] Peng, J., et al. (2020). "Effects of vitamin D on drugs: Response and disposal." Nutrition **74**: 110734. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110734>