UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ISIONE OLIVEIRA CASTRO

Citotoxicidade e potencial efeito antitumoral *in vitro* da organotelurana RF07(4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) em células de adenocarcinoma mamário humano

João Pessoa, PB

2024

ISIONE OLIVEIRA CASTRO

Citotoxicidade e potencial efeito antitumoral *in vitro* da organotelurana RF07(4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) em células de adenocarcinoma mamário humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestra em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa, PB

2024

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação Classificação

C355c Castro, Isione Oliveira.
Citotoxicidade e potencial efeito antitumoral in vitro da organotelurana RF07(4- {2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) em células de adenocarcinoma mamário humano / Isione Oliveira Castro. - João Pessoa, 2024.
126 f. : il.
Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Câncer de mama - Atividade antitumoral. 2. Câncer de mama - Citotoxicidade. 3. Organoteluranas. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/B CDU 618.19-066(043)

Elaborado por ANNA REGINA DA SILVA RIBEIRO - CRB-15/24

ISIONE OLIVEIRA CASTRO

Citotoxicidade e potencial efeito antitumoral *in vitro* da organotelurana RF07(4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) em células de adenocarcinoma mamário humano

APROVADA EM: 24 / 09 / 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Marianna Vieira Sobral
Assinado de forma digital por Marianna Vieira Sobral
Dados: 2024.11.21 15:07:25 -03'00'

Profª. Drª. Marianna Vieira Sobral
Orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br
JUAN CARLOS RAMOS GONCALVES
Data: 21/11/2024 14:41:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves
Presidente da banca

Documento assinado digitalmente
gov.br
JOAO MARCELO DE CASTRO E SOUSA
Data: 21/11/2024 13:34:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa
Examinador externo

Documento assinado digitalmente
gov.br
MIRIAN GRACIELA DA SILVA STIEBBE SALVADOF
Data: 21/11/2024 23:23:55-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Drª. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Examinador interno

Dedico esse trabalho a minha avó Senhorinha, minha mãe Dionê, minhas tias Diolanda, Danielle e Rosângela, mulheres que vieram antes de mim, que sempre estiveram por mim e que me inspiram a ser quem sou, minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força maior e superior, a Ele toda honra e toda glória.

Aos meus avós, Sebastião e Senhorinha, pelo exemplo de amor, dedicação, companheirismo e fé. A minha avó, por todo incentivo, por acreditar em mim mais que todos e por não me deixar desistir. Agradeço todo amor que me foi dado, as orações, as preocupações e por me mostrarem o verdadeiro significado do amor.

A minha mãe, Dionê, por tudo que sou, por tudo que tenho, pelo amor e carinho incondicional, por fazer de tudo para que todos os meus sonhos se realizem, pelo incentivo e valor que sempre deposita em mim e na minha educação e por ser minha fonte diária de inspiração e fortaleza.

As minhas tias, tia Diolanda, pelo amor e apoio incondicional, por ser minha segunda mãe, minha fortaleza, e mover céus e terras por mim, toda a minha gratidão. A minha tia Dani, por todo amor, carinho, conselho, abraço, apoio, companheirismo incondicional e por estar sempre ao meu lado. A minha tia Rosa por toda atenção, carinho, cuidado e conselho durante toda minha vida.

Ao meu love, Agostinho Júnior, meu refúgio, ponto de paz e equilíbrio. Minha sincera gratidão por compartilhar comigo as lutas e vitórias do cotidiano, por aguentar meu nervosismo, minha ansiedade, por me incentivar, apoiar e por não medir esforço para me ver feliz. Pelas inúmeras vezes que segurou minha mão e não me deixou desistir, pelas inúmeras vezes que trouxe água e lanche enquanto eu estudava e pelas massagens quando minhas costas não aguentavam mais.

As minhas Zara e Matilda, minha fonte diária de amor, por sempre reabastecer minha energia com um simples balançar de rabo.

Ao meu pai, Isidório, meus irmãos, Igor Rafael, Isis e Iasmin, e a Aline por todo apoio e carinho.

Aos meus primos, em especial, a Brena, por ser inspiração e por todo apoio e carinho que sempre me foi dado.

A toda a minha (melhor) família Oliveira.

A minha família Sousa, meus sogros Rosália e Agostinho, minhas cunhadas Amannda e Rosianne, pelo apoio e carinho durante esse percurso.

A todos os integrantes do ONCOFAR em especial, Ramon, Moisés, Paulo e Geovana que me ensinaram com tanta paciência o básico da parte prática e me receberam com tanto carinho. E ao Rafael que sempre esteve disponível pra me ajudar.

A Sâmia por todo carinho, paciência, dedicação, orientação, disponibilidade nas leituras das amostras no citômetro e por todos os ensinamentos que foram repassados.

A Heivila, pela cumplicidade em todos os experimentos, na discussão de todos os resultados e no desespero da escrita, pela parceria e amizade, por ter me acolhido com tanto carinho, minha eterna gratidão.

A Karinne, por ter me acolhido com tanto carinho, por enlouquecer junto comigo nas disciplinas e pela parceria e cumplicidade em todos os experimentos, na discussão dos resultados e pelo apoio quando parecia que ia dar errado, mas sempre dava certo. Minha gratidão.

A Mari, minha dupla, por todo o apoio e carinho que sempre me foi dado, por toda cumplicidade nos seminários do laboratório e durante nossos experimentos e pela sua amizade, minha eterna gratidão.

Ao prof. Dr. João Marcelo, por todo ensinamento durante minhas iniciações científicas, pelo incentivo pra vivenciar o novo (novas experiencias acadêmicas e pessoais), pelo apoio durante todo o meu mestrado, por ser amigo e inspiração de professor/pesquisador.

Ao prof. Dr. Juan Gonçalves por todos ensinamentos, paciência e disponibilidade nas leituras dos resultados no confocal.

A minha orientadora, fonte de inspiração, profa. Dra. Marianna Sobral, por me receber carinhosamente e abrir as portas do ONCOFAR pra mim, por toda a orientação e todos os conselhos, minha eterna gratidão.

À UFPB e ao PgPNSB por ter sido minha casa durante esses dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

E a todos que de certa forma contribuíram para meu êxito, me apoiaram e acreditaram em mim, minha eterna gratidão.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.” (Isaac Newton)

CASTRO, I. **Citotoxicidade e potencial efeito antitumoral *in vitro* da organotelurana RF07(4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) em células de adenocarcinoma mamário humano.** 2024. 127 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente e a principal causa de mortalidade entre mulheres. A quimioterapia é a modalidade mais empregada no tratamento, porém apresenta limitações, principalmente relacionadas à alta toxicidade e desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Considerando que as organoteluranas apresentam potencial antitumoral, o objetivo deste estudo foi aprofundar a investigação da citotoxicidade e dos efeitos antitumorais *in vitro* da organotelurana RF07 na linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano, MCF-7. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em células tumoral (MCF-7) e não tumoral (MCF-10A) humanas de mama. A RF07 apresentou uma concentração inibitória média (CI_{50}) de 3,3 ± 0,08 µM e 21,16 ± 0,9 µM para MCF-7 e MCF-10A, respectivamente, após 72 horas de tratamento, mostrando seletividade 6 vezes maior para a linhagem tumoral (IS: 6,41). Para avaliar os mecanismos de ação da RF07 foram investigados seus efeitos no ciclo celular, na apoptose, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o potencial citotóxico em esferoides tumorais. A RF07 alterou a progressão do ciclo celular, aumentando o percentual de células na fase S e na fração sub-G1, após 48 horas de tratamento. Houve um aumento no percentual de células em apoptose, detectado por citometria de fluxo após a marcação celular com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP). Análises microscópicas confirmaram o efeito apoptótico da RF07, mostrando características morfológicas indicativas, como alterações nucleares (cromatina condensada e/ou fragmentada) e na permeabilidade da membrana mitocondrial. O pré-tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) preveniu significativamente a citotoxicidade, sugerindo que a RF07 induz citotoxicidade por meio da produção de EROs. Além disso, a RF07 reduziu o tamanho e o raio de migração de esferoides tumorais, confirmando sua ação citotóxica neste modelo experimental. Em conclusão, os resultados indicam que a RF07 apresenta atividade antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, promovendo alterações no ciclo celular, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e induzindo a apoptose.

Palavras-chave: Citotoxicidade; atividade antitumoral; câncer de mama; organoteluranas.

CASTRO, I. **Cytotoxicity and potential in vitro antitumor effect of the organotellurane RF07 (4-{2-Chloro-3-[chloromethylene]-1-oxa-2-(lambda)4-telluraspiro [3.5]non-2-yl}phenyl Methyl Ether) in human breast adenocarcinoma cells.** 2024. 127 f. **Dissertation** (Master's in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent type of cancer and the leading cause of mortality among women. Chemotherapy is the most commonly used treatment modality, but it has limitations, mainly due to high toxicity and the development of drug resistance. Considering that organotelluranes show antitumor potential, the aim of this study was to further investigate the cytotoxicity and in vitro antitumor effects of the organotellurane RF07 in the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. Cytotoxicity was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay in human tumor (MCF-7) and non-tumor (MCF-10A) breast cells. RF07 exhibited a median inhibitory concentration (IC50) of 3.3 ± 0.08 µM and 21.16 ± 0.9 µM for MCF-7 and MCF-10A, respectively, after 72 hours of treatment, showing a 6-fold selectivity for the tumor cell line (SI: 6.41). To evaluate the mechanisms of action of RF07, its effects on the cell cycle, apoptosis, production of reactive oxygen species (ROS), and cytotoxic potential in tumor spheroids were investigated. RF07 altered cell cycle progression, increasing the percentage of cells in the S phase and in the sub-G1 fraction after 48 hours of treatment. There was an increase in the percentage of apoptotic cells, detected by flow cytometry after cell staining with annexin V-FITC and propidium iodide (PI). Microscopic analyses confirmed the apoptotic effect of RF07, showing indicative morphological characteristics such as nuclear alterations (condensed and/or fragmented chromatin) and changes in mitochondrial membrane permeability. Pre-treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) significantly prevented cytotoxicity, suggesting that RF07 induces cytotoxicity through ROS production. Additionally, RF07 reduced the size and migration radius of tumor spheroids, confirming its cytotoxic action in this experimental model. In conclusion, the results indicate that RF07 exhibits in vitro antitumor activity in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, promoting cell cycle alterations, increased production of reactive oxygen species, and inducing apoptosis.

Keywords: Cytotoxicity; antitumor activity; breast cancer; organotelluranes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo 25

Figura 2. Secção transversal de anatomia normal da mama..... 26

Figura 3. Carcinogênese: processo de desenvolvimento do câncer..... 27

Figura 4. Sintomas câncer de mama. 30

Figura 5. Características do câncer..... 33

Figura 6. Carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. 34

Figura 7. Vias genômica e não genômica do Erα..... 37

Figura 8. Sinalização clássica e não clássica dos receptores de progesterona (PR)..... 39

Figura 9. Via de sinalização HER2 41

Figura 10. Progressão do ciclo celular mediado por ciclinas. 47

Figura 11. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose 49

Figura 12. Os papéis biológicos de EROs 52

Figura 13. Estrutura química da organotelurana RF07..... 54

Figura 14. Citotoxicidade da RF07 e DXR em linhagem de células de MCF-7, após 72h de tratamento. 68

Figura 15. Citotoxicidade da RF07 e DXR em linhagem de células de MCF-10A, após 72h de tratamento 69

Figura 16. Efeitos do tratamento com RF07 ou DXR na distribuição de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular após 48h de tratamento 71

Figura 17. Efeitos da RF07 ou DXR em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48 h de tratamento 72

Figura 18. Análise da morfologia nuclear das células MCF-7 tratadas com a RF07 nas concentrações de 3 e 6 µM por 48 horas e posteriormente marcadas com Hoechst 34580 73

Figura 19. Indução da apoptose pela RF07, analisada por marcação com Hoechst, em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento. 74

Figura 20. Análise do potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7 tratadas com a RF07 nas concentrações de 3 e 6 µM por 48 horas e posteriormente marcadas com JC-1. 75

Figura 21. Alteração no potencial de membrana mitocondrial induzida pela RF07 ou CCCP, analisada por marcação com JC-1, em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, após 48h de tratamento 76

Figura 22. Citotoxicidade da RF07 ou DXR na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 72 h de tratamento 77

Figura 23. Efeito da RF07, em diferentes concentrações (3 e 6 µM), sobre o tamanho dos esferoides nos tempos de 0 e 48 h 78

Figura 24. Redução da migração celular ao redor dos esferoides após 48h de exposição a RF07 em diferentes concentrações (3 e 6 µM). 79

Figura 25. Imagens representativas do efeito citotóxico da RF07 no tamanho e na migração celular dos esferoides em 0 e 48h 80

Figura 26. Efeitos da RF07 em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos subtipos moleculares do tipo de câncer de mama..... 35

Tabela 2. Citotoxicidade da RF07 ou DXR em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas, após 72h de tratamento. 69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos regimes de quimioterapia utilizada para tratar o câncer de mama. 45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	Doxorrubicina, ciclofosfamida
AC-T	Doxorrubicina; ciclofosfamida e paclitaxel
AIF	Fator indutor de apoptose
AKT	Proteína cinase B
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AMPK	Proteína cinase ativada por adenisina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fator 1 de Ativação de Protease Apoptótica
AT	Adenina-Timina
B16F10A	Linhagem celular de melanoma murino
B16F10-Nex2	Linhagem celular de melanoma murino
BAK	Proteína, com nome derivado do inglês traduzido, antagonista/killer Bcl-2
BAX	Proteína, com nome derivado do inglês traduzido, proteína X associado ao Bcl-2
Bcl-2	Proteína, com nome derivado do inglês trazido, linfomas de células B2
BID	Proteína, com nome derivado do inglês trazido, agonista da morte com domínio de interação BH3
BLS	Biópsia do linfonodo sentinela
BRCA1	Gene breastcancer 1
BRCA2	Gene breast cancer 2
C	Carbono
CAF	Ciclofosfamida, doxorrubicina, 5-fluorouracil
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona
CCD-18Co	Linhagem celular de fibroblastos de cólon humano
CDH1	Gene supressor tumoral
CDK	Cinases dependente de ciclinas
CI50	Concentração inibitória mínima
CM	Câncer de mama

CMF	Ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil
CT26.Wt	Linhagem celular de carcinoma de cólon
D	Docetaxel
DAC	Docetaxel, doxorrubicina, ciclofosfamida
DC	Docetaxel, ciclofosfamida;
DISC	Complexo de sinalização de morte
DMEM	Meio Dulbecco'sModifiedEagle's
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
E	Epirrubicina
E2	Estrogênio
E2F	Fatores de transcrição
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento
EO	Estresse oxidativo
ER	Receptor de estrogênio
EREs	Elementos de resposta ao estrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAC	5-fluororacil, doxorrubicina, ciclofosfamida
FDA	Food andDrugAdministration
FEC100	5-fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida
FEC50	5-fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida
GC	Guanina-Citosina
Gene TP53	Gene supressor tumoral
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HL-60	Linhagem celular de leucemia humana
HREs	Elementos de resposta à hormonal
HSP	Proteína de choque térmico
HT-29	Linhagem celular de câncer de colón humano
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer

IP	Iodeto de propídeo
IPeFarM	Instituto de Pesquisa e Medicamentos
IS	Índice de seletividade
JC-1	Cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′ tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
Ki67	Marcador de índice de proliferação.
L929	Linhagem de fibroblastos murinos
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MCF-10A	Linhagem celular mamária normal
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MOMP	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
mPRs	Receptores de progesterona de membrana
mTOR	Alvo mecanicista da rapamicina
MTTA	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
p53	Proteína supressora de tumor
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Solução fosfato tamponada
PC12	Células de feocromocitoma da medula adrenal de rato
PD-1	Antagonistas do ligante de morte celular programada-1
PI3K	Fosfoinositídeo 3-cinase
PKC	Fosfolipase C
PR	Receptor de progesterona
pRb	Proteína retinoblastoma

RF07	(4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter)
RH	Receptores hormonais
RTK	Receptor de tirosina cinase
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERDs	Reguladores Seletivos do Receptor de Estrogênio
SERMs	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio
SK-MEL-147	Linhagem celular de melanoma humano
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
SREs	Elementos responsivos ao soro
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
STK11/LBK1	Serina treonina cinase 11
T	Paclitaxel
Te	Telúrio
TNFR	Receptores de morte da superfície celular
TNFα	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UFPI	Universidade Federal do Piauí
V79	Linhagem celular de fibroblasto do pulmão de um hamster

SUMÁRIO

Introdução **21**
Fundamentação teórica **24**
2.1 Câncer de mama 25
2.1.1 Epidemiologia 25
2.1.2 Fatores de risco genéticos e ambientais 26
2.1.3 Sintomas e diagnósticos 29
2.1.4 Características e classificações 32
2.1.4.1 Receptores de estrogênio (ER) 36
2.1.4.2 Receptores de progesterona (PR) 38
2.1.4.3 Receptores HER2 40
2.1.5 Tratamento 41
2.2 Ciclo celular e o câncer de mama 45
2.3 Apoptose e o câncer de mama 47
2.4 Estresse oxidativo e o câncer de mama 51
2.5 Organoteluranas 53
2.5.1 Organotelurana RF07 54
Objetivos **56**
3.1 Objetivo geral 57
3.2 Objetivos específicos 57
Material e métodos **58**
4.1 Local da pesquisa 59
4.2 Material 59
4.2.1 Substâncias e reagentes 59
4.2.2 Equipamentos 60
4.2.3 Amostra teste 60
4.2.4 Cultivo celular 60
4.3 MÉTODOS 61
4.3.1 Citotoxicidade celular pelo método do MTT 61
4.3.2 Investigação do efeito antitumoral *in vitro* do RF07 em células MCF-7 62
4.3.2.1 Avaliação da interferência do RF07 sobre a progressão do ciclo celular 62
4.3.2.2 Identificação do tipo de morte celular induzida pelo RF07 63
4.3.2.2.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo 63

4.3.2.2.2 Análise das alterações nucleares induzidas pelo RF07 utilizando a marcação com Hoechst e análise por microscopia confocal 64
4.3.2.2.3 Análise do potencial de membrana mitocondrial utilizando a marcação com JC-1 e microscopia confocal 64
4.3.2.3 Investigação da ação do RF07 no estresse oxidativo: citotoxicidade na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) 65
4.3.2.4 Avaliação do efeito citotóxico do RF07 através da análise do esferoide tumoral 65
4.3.3 Análise estatística 66
Resultados 67
5.1 Citotoxicidade do RF07 em linhagens de células tumoral e não tumoral humanas 68
5.2 Investigação do efeito antitumoral *in vitro* do RF07 em células MCF-7 70
5.2.1 Interferência do RF07 na progressão do ciclo celular 70
5.3 Identificação do tipo de morte celular induzida pelo RF07 71
5.3.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo 71
5.3.2 Análise das alterações nucleares induzidas pelo RF07 utilizando a marcação com Hoechst e análise por microscopia confocal 73
5.3.3 Análise do potencial de membrana mitocondrial utilizando a marcação com JC-1 e microscopia confocal 74
5.4 Investigação da ação do RF07 no estresse oxidativo: citotoxicidade na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) 76
5.5 Avaliação do efeito citotóxico do RF07 através da análise do esferoide tumoral 77
5.5.1 RF07 reduziu o tamanho do esferoide 77
5.5.2 RF07 reduziu a migração celular ao redor dos esferoides 78
Discussão 81
Conclusão 90
Referências 92

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo utilizado para definir um conjunto de doenças em que as células apresentam um crescimento anormal e adquirem determinadas características de malignidade, que culminam com a invasão e disseminação para outros tecidos e orgãos (Kumari, 2020). Corresponde a um extenso grupo de tumores malignos e heterogêneos que coletivamente é uma das principais causas de morte no mundo, causando aproximadamente 3.500 óbitos por milhão de pessoas a cada ano (Hussein e*t al*., 2024).

Os dados apontam que ocorreram aproximadamente 600.000 mortes nos EUA no ano de 2020 (Schwartz, 2024), enquanto no Brasil foram registradas 181.377 mortes entre os meses de março e dezembro de 2020 (Jardim *et al.,* 2022). Ainda, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 é de 704 mil novos casos de câncer no país, sendo 35 mil destes apenas no Estado da Paraíba para o mesmo período (INCA, 2023).

Entre esse conjunto de doenças destaca-se o câncer de mama, que representa um grande desafio para a saúde pública, pois é o tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo e a principal causa de mortalidade entre mulheres. Mundialmente, foram registrados 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama e 685.000 óbitos em 2020, correspondendo a quase 12% de todos os novos casos de câncer (Sung *et al.,* 2021). No Brasil, segundo o INCA, a taxa de mortalidade por câncer de mama foi de 1,71 óbitos por 100.000 mulheres em 2021. Para cada ano do triênio 2023-2025 a perspectiva é que ocorram 73.610 novos casos desta patologia (INCA, 2023).

O tratamento para o câncer de mama varia de acordo com o estadiamento da doença, suas características biológicas, bem como das condições da paciente (idade, menopausa e/ou comorbidades). As modalidades podem ser a cirurgia, seguida de terapias locais ou sistêmicas, tais como a radioterapia quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e terapia alvo (INCA, 2022). Destas, a quimioterapia é a principal forma de tratamento (Wu *et al*., 2023) e atualmente os agentes habituais utilizados para o câncer de mama são baseados nas antraciclinas e taxanos, nas modalidades adjuvante e neoadjuvante (Ben-Dror, Shalamov & Sonnenblick, 2022).

No entanto, a quimioterapia apresenta certas limitações, devido à alta toxicidade sistêmica e emergente desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos (Xie, Chen e Fang, 2020), tornando necessário a busca por novas abordagens que apresentem melhores resultados terapêuticos e baixos efeitos colaterais (Li *et al*., 2020).

As organoteluranas são compostos que possuem pelo menos uma ligação covalente com o telúrio (Silberman *et al.,* 2016), um elemento do grupo 16 da tabela periódica com propriedades químicas que permitem uma ampla gama de aplicações na química orgânica e inorgânica, bem como em materiais, ciência farmacológica e química medicinal (Teixeira *et al*., 2018). A literatura relata a ação destes compostos como agentes antioxidantes (Pessoto *et al.,* 2007), bem como sua atividade antileishmania (Lima *et al.*, 2009), anticonvulsivante (Persike *et al.,* 2008) e antitumoral (Nascimento *et al.,* 2021).

A organotelurana RF07 (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) é derivada da incorporação do p-metoxifenilo Te com 1-etinil-1-ciclo-hexanol, em refluxo de benzeno. Estudos recentes mostraram o potencial citotóxico desse composto frente à linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) (Nascimento, 2023), entretanto, as suas possíveis vias de ação ainda não foram elucidadas, portanto, o presente trabalho objetivou aprofundar a investigação da citotoxicidade e dos efeitos antitumorais da RF07 na linhagem celular de câncer de mama MCF-7.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer de mama

2.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama (CM) descreve uma série de doenças malignas que ocorrem nas glândulas mamárias, que coletivamente constituem o câncer mais prevalente no mundo (Organização Mundial da Saúde, 2021).

O CM apresenta maior frequência em termos de incidência e mortalidade no sexo feminino, com uma curva ascendente de casos a partir dos 25 anos que se torna mais evidente na faixa etária entre 40-69 anos (Costa *et al.,* 2024). Foram estimados 73.610 mil novos casos de CM feminina para o ano de 2023 (INCA 2022) (Figura 1), porém essa doença também pode acometer homens, sendo responsável por menos de 1% do total de casos no sexo masculino, com incidência rara antes dos 35 anos (Portela *et al.,* 2024).

Figura 1. Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes por sexo estimados para 2023, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%
Cólon e reto	21.970	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%
Estômago	13.340	5,6%
Cavidade oral	10.900	4,6%
Esôfago	8.200	3,4%
Bexiga	7.870	3,3%
Laringe	6.570	2,7%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%
Fígado	6.390	2,7%

Localização Primária	Casos	%
Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	23.660	9,7%
Colo do útero	17.010	7,0%
Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Glândula tireoide	14.160	5,8%
Estômago	8.140	3,3%
Corpo do útero	7.840	3,2%
Ovário	7.310	3,0%
Pâncreas	5.690	2,3%
Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

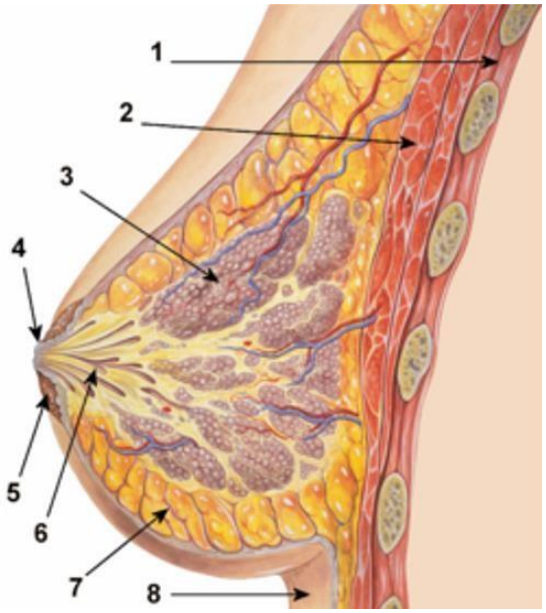
Fonte: INCA, 2022

Quanto à mortalidade no Brasil, o CM é a primeira causa de morte por câncer em mulheres, sendo registrados 11,71 óbitos/100.000 mulheres em 2021. Em termos de distribuição dos óbitos ocorridos no país, as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas de mortalidades (12,69 e 12,43 óbitos/100.000 mulheres, respectivamente), seguido da região nordeste (10,75 óbitos/100.000 mulheres), centro-oeste (10,90 óbitos/100.000 mulheres) e norte (8,59 óbitos/100.000 mulheres). Já em relação à incidência, o INCA apresentou uma estimativa de 15.690 novos casos de CM na região Nordeste e 55,40 casos/ 100.000 habitantes em João Pessoa, capital do Estado da Paraíba, para o ano de 2023 (INCA, 2022).

2.1.2 Fatores de risco genéticos e ambientais

A mama é uma estrutura complexa, constituída por diferentes partes e tecidos. Os lóbulos de tecido glandular são subdivididos em lóbulos menores e ligados por dutos de leite, responsáveis por transportar o leite dos lóbulos até os mamilos (Stark; Grandel; Spilker, 1992; Tanis *et al*., 2001). Uma região densa de tecido adiposo é encontrada envolvendo os lobos e preenchendo os espaços entre eles (Aronson *et al.,* 2000), além de uma extensa rede de outras estruturas responsáveis pelas funções de sustentação (tecido conjuntivo, ligamentos), defesa imunológica (linfonodos, vasos linfáticos), nutrição e oxigenação (vasos sanguíneos, nervos) das mamas (Thomsen & Tatman, 1998) (Figura 2). O tecido adiposo na mama participa ativamente da diferenciação das células mamárias, pois apresenta a capacidade de secretar fatores de crescimento e enzimas (Zangani *et al*., 1999).

Figura 2. Secção transversal da anatomia normal da mama

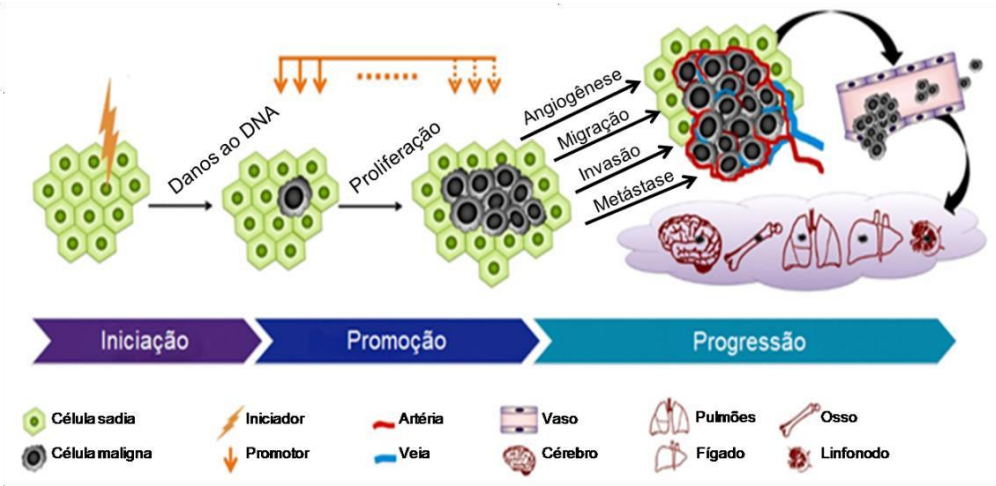


Os números das setas da figura representam as seguintes estruturas: 1) parede torácica; 2) musculatura peitoral; 3) lóbulos; 4) superfície do mamilo; 5) aréola; 6) ductos lactíferos; 7) tecido adiposo; 8) pele.
Fonte: Adaptado de Patrick J. Lynch (2006).

A transformação da mama sadia em um tumor maligno ocorre devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, além de mutações em genes relacionados aos mecanismos de controle da proliferação e morte celular, culminando no aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (Sotiriou; Pusztai, 2009). Nesse contexto, o câncer é caracterizado pelo crescimento

descontrolado de células (Fitzmaurice *et al*., 2017) que se desenvolvem a partir de um processo denominado de carcinogênese, compreendendo três estágios (Figura 3): **1) Iniciação:** nesta etapa inicial, os genes das células sadias passam por modificações que podem ocorrer de forma espontânea ou induzidas pela exposição à agentes carcinógenos; **2) Promoção:** posteriormente ocorre a expansão clonal das células anteriormente já alteradas, que são transformadas de maneira lenta e progressiva em células malignas, devido à exposição contínua aos agentes promotores; **3) Progressão:** o último estágio da carcinogênese é irreversível, sendo caracterizado pela multiplicação descontrolada e autônoma das células, culminando com a aquisição da capacidade de invasão e metástase (Liu *et al*., 2015; Hausmann, 2019).

Figura 3. Etapas da carcinogênese



A carcinogênese é dividida em três estágios sucessivos. No primeiro estágio, chamado de iniciação, as células sofrem a ação de um agente carcinógeno (iniciador), que provoca mutações em seus genes. Na etapa seguinte (promoção), as células anteriormente alteradas são transformadas de maneira lenta e progressiva em células malignas, devido à exposição contínua a agentes promotores. No último estágio (progressão), o câncer encontra-se instalado, logo, as células se multiplicam de forma descontrolada e irreversível, podendo adquirir um potencial invasivo e metastático.
Fonte: Adaptado de Liu et al., 2015.

Como mencionado anteriormente, os agentes carcinógenos transformam a célula para um fenótipo maligno principalmente por meio de mutações no DNA (ácido desoxirribonucleico) (Madia *et al.,* 2019), que podem ser causadas por fatores extrínsecos ou intrínsecos (Ponomarev *et al.,* 2022). Os fatores extrínsecos compreendem mutações adquiridas por meio de fatores ambientais, podendo-se citar como exemplos o tabagismo, os hábitos alimentares, o sedentarismo, a ingestão de bebidas alcoólicas, a exposição a radiações ultravioleta e agentes virais, entre outros (WU *et al.,* 2018). Já os fatores intrínsecos estão relacionados à

condições geneticamente predeterminadas do indivíduo, envolvendo fatores de ordem genética, variações hormonais (Chen, 2008), idade da menarca, menopausa, amamentação e etnia (Miller *et al*., 2020). Contudo, é a interação entre esses fatores que determina o risco de desenvolvimento do câncer (INCA, 2023).

A atividade física e uma alimentação adequada estão relacionadas ao CM pela influência que exercem nos hormônios. A prática da atividade física leva a liberação de endorfinas e substâncias que auxiliam na regulação hormonal, reduzindo níveis de estrogênio no organismo feminino (Silva *et al.,* 2020). O estrogênio tem papel importante na diferenciação, crescimento e função de vários órgãos e tecidos, atuando na mama, útero e cérebro, por exemplo, locais onde estimulam a liberação de fatores de crescimento que desempenham uma variedade de atividades biológicas nas células (Dias, Floté, Valejo, 2022). Portanto, o sedentarismo pode desencadear um desequilíbrio hormonal, aumentando os níveis de estrogênio levando ao desenvolvimento do CM. Ademais, a prática de exercício físico também está relacionada com a redução da gordura corporal, condição que também promove o desenvolvimento da neoplasia mamária (Campos *et al.,* 2022), uma vez que a síntese de tecido adiposo em mulheres obesas provoca o aumento nos níveis circulantes de estrogênio (Dias, Floté, Valejo, 2022).

Nos homens, os fatores de risco para o desenvolvimento de CM estão associados a um desequilíbrio entre o excesso de estrogênio e a deficiência de androgênio. Esse desequilíbrio pode estar relacionado à Síndrome de Klinefelter (SK), ginecomastia, obesidade, disfunção testicular e/ou hepática, infertilidade, hiperprolactinemia e consumo de álcool (Agrawal *et al.*, 2007). Nesse contexto, o consumo de álcool está intimamente ligado ao CM, de acordo com Muniz (2022) o álcool interfere no metabolismo do estrogênio ou atua causando danos ao DNA das células mamárias, levando ao desenvolvimento de tumores.

Em relação à influência dos genes na carcinogênese do CM, sabe-se que diferentes variações genéticas geralmente são encontradas nos proto-oncogenes, genes que codificam proteínas que controlam os processos de diferenciação, proliferação e morte celular em células sadias, levando ao surgimento de oncogenes, os quais favorecem a estimulação de vias que mantém as células neoplásicas em crescimento constante (Sheikh *et al.,* 2015).

Além disso, mutações que levam a perda de função em genes supressores de tumor também são frequentemente encontradas em células tumorais, inviabilizando

o papel destes no controle da divisão celular e nos mecanismos de reparo aos danos do DNA (Sheikh *et al.,* 2015; Wang *et al.,* 2002). Os dois principais genes supressores mutados no CM são o BRCA1 (do inglês, *breast cancer* 1) e BRCA2 (do inglês, *breast cancer* 2), responsáveis por 5 a 7% de todos os casos desse tipo de neoplasia (Xie *et al.,* 2022). A perda da função proteica leva a instabilidade genética possibilitando um aumento do risco de carcinogênese em portadores destas mutações (Weifeng *et al.,* 2019). De fato, é relatado que a incidência do câncer de mama em portadores da mutação BRCA2 é de 12,50%, o que representa um aumento cinco vezes superior quando comparado à indivíduos não portadores destas mutações (2,49%) (Ming; Honggang; Shaolong, 2020).

Outro gene supressor que pode estar envolvido no desenvolvimento do CM é o CDH1 (do inglês, *Cadherina-epitelial 1*), gene que codifica a E-caderina, molécula de adesão celular que atua na manutenção da integridade dos tecidos epiteliais em células fisiologicamente sadias. Quando mutados os genes de CDH1 levam a uma expressão reduzida de E-caderina, o que ocasiona a perda da adesão celular em consequência de alterações na motilidade celular, permitindo que as células neoplásicas invadam os tecidos próximos, estabelecendo metástases (Chong*;* Sankavaram; Freeke*,* 2011; Schrader *et al*., 2011; Benusiglio *et al*., 2013).

Mutações adicionais também envolvem os genes: I) STK11/LBK1 (do inglês, *Serine/Threonine Kinase 11/LKB1*), associados à positividade do receptor de estrogênio (Luo; Zang; Guo*,* 2010); II) *TP53 (*do inglês, *Tumor Protein 53*), gene supressor tumoral que codifica a transcrição da proteína p53 (do inglês, *Protein 53*), um fator de transcrição regulador de processos críticos envolvendo o ciclo celular, a apoptose e o reparo do DNA (Kastenhuber; Lowe, 2017); III) AR, gene que codifica o receptor de andrógeno (Anestis *et al*., 2020); e IV) *BARD1, CHECK2, FGFR2, RAD51 e* MAP3K1, genes que estão envolvidos com o reparo do DNA, processamento de RNA, transcrição, regulação do ciclo celular e apoptose (Jara-Palomares *et al.,* 2017).

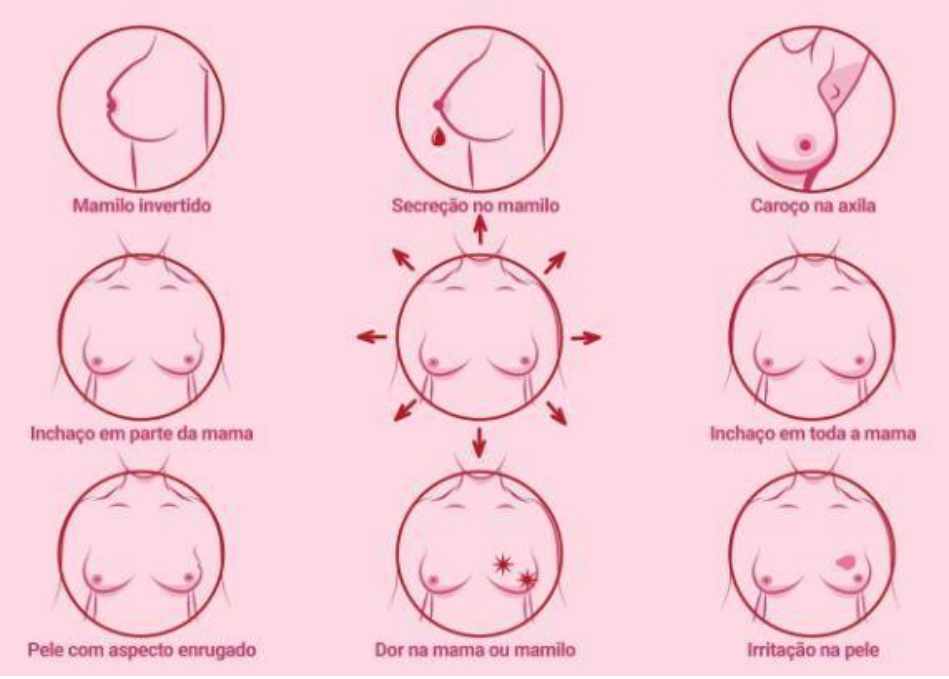
2.1.3 Sintomas e diagnósticos

Geralmente o CM se apresenta como um nódulo indolor (Organização Mundial da Saúde, 2021), sintoma que é o mais comum entre mulheres e possui um valor prognóstico relativamente elevado para a malignidade (Redaniel *et al.,* 2015). Entretanto, 90% das massas mamárias são de natureza benigna, constituindo

fibroadenomas, cistos e/ou alterações fibrocísticas (Organização Mundial da Saúde, 2021).

O nódulo mamário ou axilar proveniente do CM tem características únicas, podendo apresentar-se imóvel ou fixo, e com um formato consistente ou irregular (Fonseca *et al*, 2019). Além disso, outras anormalidades são frequentemente relatadas, tais como a presença de secreção ou inversão no mamilo, alterações na pele (eritema, covinhas, corrosão, ulceração, casca de laranja) e na mama (dor, inchaço, alterações na forma e tamanho) (Figura 4). Anormalidades mamárias não específicas, como a perda de peso, dor axilar, dor musculoesquelética, falta de ar, fraqueza, entre outros também são observadas (Katsura *et al.,* 2022).

Figura 4. Sintomas do câncer de mama.



Fonte: OMS, 2021.

Nos homens o tumor se desenvolve logo abaixo do mamilo, onde estão localizados os ductos mamários rudimentares, portanto os mamilos tendem a serem afetados mais cedo nos homens quando comparado às mulheres, que geralmente mostram um desenvolvimento inicial do tumor no quadrante superolateral da mama (Joshi *et al.,* 1996).

Para o diagnóstico mais acertivo é imprescindível o exame clínico das mamas. Durante o exame devem ser avaliadas as mamas, o tórax, as axilas e os

linfonodos (Saslow *et al.,* 2004). O exame clínico é composto inicialmente pela inspeção, momento no qual o profissional médico avaliará visualmente a pele em busca de alterações específicas. Em seguida é realizada a palpação das margens superior para inferior, assim como da medial para a lateral de cada mama, além dos linfonodos axilares e supraclaviculares, possibilitando que o profissional observe diferenças no tecido mamário (Klein, 2005).

Os pacientes que apresentarem alguma evidência de comprometimento dos linfonodos ou mama devem ser submetidos a exames de imagens (Cardoso, Kyriakides, Ohno, 2019), entre eles os mais solicitados são a mamografia e a ressonância magnética (Silva *et al.,* 2023). A mamografia, primeiro exame de imagem realizado, é uma radiografia da mama que pode revelar anormalidades benignas ou malignas. É realizada pela aplicação da radiação através da mama, pós-compressão entre duas placas, para produzir uma imagem de raio-x (Bhan, 2013). Mesmo sendo o exame de imagem mais requisitado para o diagnóstico, a mamografia apresenta limitações em mulheres com tecidos mamários densos, nestes casos utiliza-se o ultrassom como método complementar para rastrear áreas não visualizadas pela mamografia (Sridharan *et al.,* 2015). Por outro lado, a ressonância magnética da mama é uma técnica não invasiva e não ionizante, que utiliza ondas de radiofrequência de baixa energia e um campo magnético para gerar imagens detalhadas das estruturas internas da mama (Graves, Zhu, 2015), permitindo mensurar o tamanho do câncer e/ou localizar tumores metastáticos (Jethava *et al.,* 2015).

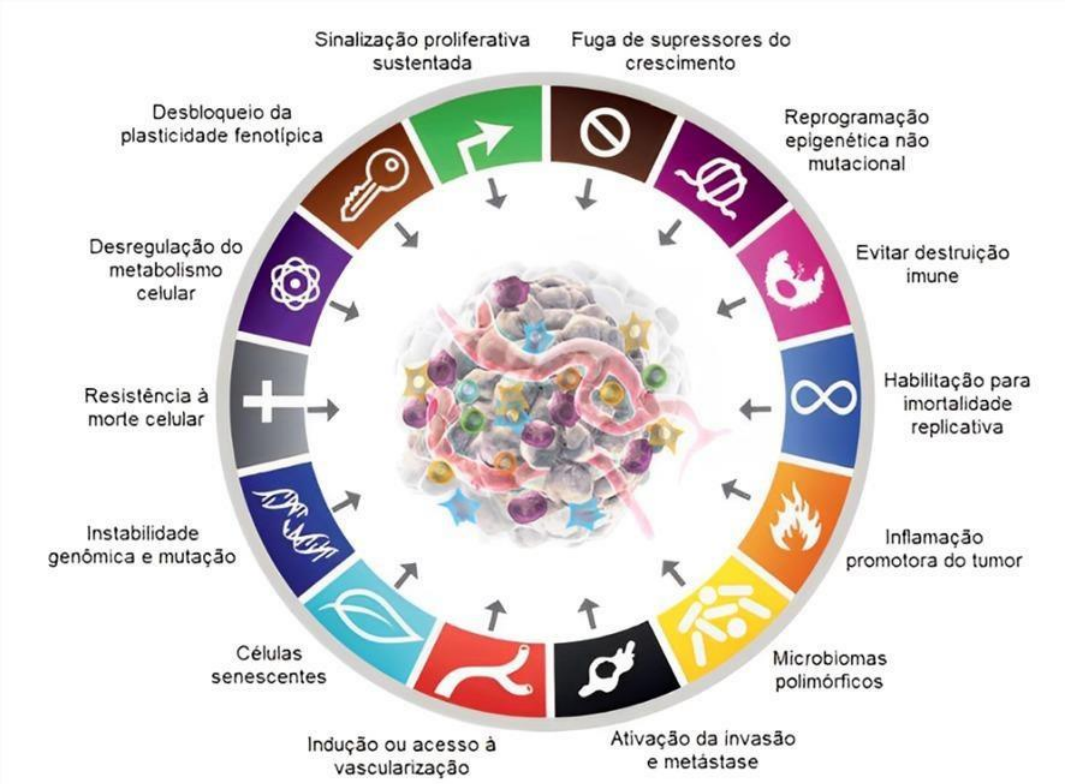
Conforme a necessidade podem ser utilizados outros métodos para definir o prognóstico e condutas, como a avaliação histopatológica das amostras de biópsia e a citologia (Koh e Kim, 2019). A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) é um método inovador e minimamente invasivo utilizado para determinar se houve metástase em pacientes com câncer de mama em estágio inicial. Dependendo da presença de metástase no linfonodo, a BLS é geralmente realizada para escolher a abordagem terapêutica mais adequada (Lyman *et al.,* 2016). Já a citologia é uma técnica menos invasiva que a biópsia, que utiliza as secreções mamárias obtidas geralmente a partir da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de lesões palpáveis ou impalpáveis para investigar a presença de células neoplásicas nas amostras (Bree, 2002).

De maneira geral a detecção precoce da doença é essencial para um tratamento eficaz e um prognóstico favorável, pois pacientes com tumores menores no momento do diagnóstico apresentam uma probabilidade significativamente menor de mortalidade e uma maior taxa de sobrevivência (Bhushan; Gonsalves; Menon, 2021).

2.1.4 Características e classificações

Embora o câncer seja representado por um grupo grande e heterogêneo de tumores malignos, estes apresentam características semelhantes, uma vez que as células neoplásicas adquirem um conjunto de capacidades funcionais durante o processo de carcinogênese que as distinguem de células sadias. Essas características foram denominadas de “marcas do câncer” (do inglês: *Hallmarks of cancer*) (Figura 5), são estas: sinalização proliferativa sustentada; fuga de supressores do crescimento; reprogramação epigenética não mutacional; evasão da destruição imune; habilitação para imortalidade replicativa; inflamação promotora do tumor; microbiomas polimórficos; ativação da invasão e metástase; indução ou acesso à angiogênese; senescência celular; instabilidade genômica e mutação; resistência à morte celular; desregulação do metabolismo celular; e desbloqueio da plasticidade fenotípica (Hanahan, 2022).

Figura 5. Características do câncer



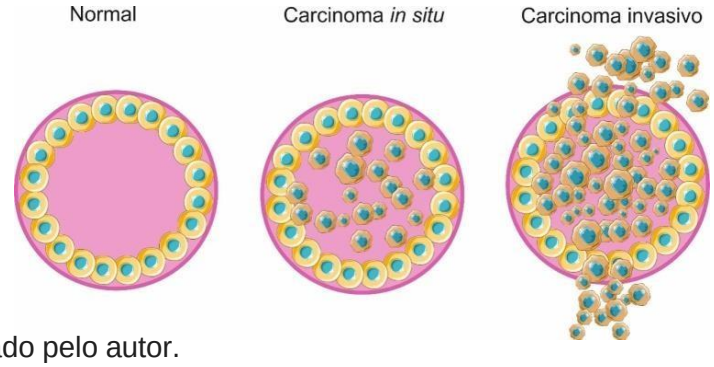
Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

As variações genéticas adquiridas resultam em uma heterogeneidade de genótipos/fenótipos no câncer de mama, apresentando um desafio na classificação desta neoplasia como uma doença única, devido à sua natureza multifatorial. Essa complexidade heterogênea é evidente tanto em variações espaciais quanto temporais (Keenan; Tolaney, 2020). A heterogeneidade espacial refere-se às diferenças nas características fenotípicas, epigenéticas e genômicas presentes dentro de um único tumor. Já a heterogeneidade temporal abrange as disparidades observadas entre tumores primários e metástases, ou entre diferentes locais metastáticos, ao longo da progressão tumoral (Yu *et al.,* 2021; Bonacho, Rodrigues; Liberal, 2019).

Para classificar o CM é necessária a análise de sua estrutura multidimensional, incorporando as classificações histopatológicas, as características clínicas e a análise molecular avançada. Pela histologia, os tumores podem ser classificados como carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (Figura 6) (Nolan; Lindeman; Visvader, 2023). De acordo com Pasqualini *et al.* (2021), eles podem ser subdivididos em: **I) carcinoma ductal *in situ*:** se refere a tumores localizados que

afetam os ductos mamários; **II) carcinoma ductal invasivo:** caracterizado pela capacidade de romper os ductos mamários e invadir os tecidos adjacentes. Estes tumores geralmente possuem pelo menos um receptor hormonal em sua superfície; **III) carcinoma lobular *in situ*:** originam-se nas glândulas produtoras de leite e não produzem metástases; e **IV) carcinoma lobular invasivo:** originam-se nos lóbulos mamários e podem atingir outros tecidos. Geralmente apresentam receptores de estrogênio e progesterona, mas não superexpressam a proteína HER2. Ademais, o carcinoma tem como subtipo o adenocarcinoma que é desenvolvido nas células glandulares da mama, apresentam-se como o tipo mais comum de carcinoma uma vez que tanto os ductos quanto os lóbulos são compostos por células glandulares ductal ou lobular (Kashyap *et al*., 2022).

Figura 6. Carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, o CM ainda pode ser classificado de acordo com a presença ou ausência de receptores, os quais ao serem ativados pelos ligantes específicos sinalizam vias que mantém o crescimento tumoral. Os receptores mais conhecidos são os I) hormonais (RH), que respondem aos hormônios estrogênio e/ou progesterona, e os II) receptores para a proteína HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), proteína envolvida na proliferação de células epiteliais (Nagini, 2017). A partir dessa classificação o CM pode ser diferenciado em quatro sub-grupos moleculares com perfis genéticos próprios: **I)** Luminal A e **II)** Luminal B: tumores que se caracterizam pela superexpressão de receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona), mas com ausência da superexpressão da proteína HER2 (HER2 negativo). O subtipo Luminal A exibe um crescimento lento das células tumorais, enquanto o subtipo Luminal B diferencia-se do anterior por possuir características mais agressivas, incluindo a presença de um marcador de índice de proliferação chamado ki67, o qual reflete a velocidade de proliferação das

células neoplásicas (Gao; Swain, 2018); **III)** HER2 +: não superexpressa os receptores hormonais, mas apresenta superexpressão dos receptores para a proteína HER2 (HER2 positivo); e **IV)** Triplo negativo: não apresentam ambos os receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona), nem os receptores para a proteína HER2 (Nagini, 2017; INCA, 2023; FEMAMA, 2023) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama

Biomarcadores moleculares	**SUBTIPOS**			
	Luminal A	**Luminal B**	**HER2 +**	**Triplo negativo**
Estrogênio	**ER +**	**ER +**	**ER-**	**ER-**
Progesterona	**PR +**	**PR +**	**PR -**	**PR -**
Receptor HER2	**HER2 -**	**HER2 -**	**HER2 +**	**HER2 -**

ER: Receptor de estrogênio; PR: Receptor de progesterona; HER2: Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os hormônios e seus receptores são responsáveis por diversas funções biológicas que em conjunto mantêm a homeostase celular (Asavasupreechar *et al*., 2020). Estima-se que aproximadamente 70% dos cânceres de mama expressem receptores hormonais (Clark; Osborne; Mcguire, 1984). De acordo com Mallepell *et al.* (2006) o estrogênio e a progesterona são os principais hormônios esteroides proliferativos no epitélio mamário que sinalizam o desenvolvimento da glândula mamária e também desempenham um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

O CM triplo negativo é o único subtipo molecular que não possui receptores para os hormônios (progesterona e/ou estrogênio) e não superexpressam a proteína HER2 (Shi *et al*., 2018), utilizando a via PI3K/AKT/mTOR para se desenvolver (Janku; Yap; Meric-Bernstam, 2018). Este subtipo representa 10–20% dos CM invasivos, sendo biologicamente e clinicamente mais agressivo, com células tumorais extremamente proliferativas e de pior prognóstico (Kumar; Aggarwal, 2015).

Além disso, sabe-se que os cânceres HER2+ são menos responsivos às terapias atuais e apresentam maior probabilidade de recorrência do que os tumores HER2- ou receptores hormonais positivos (Karim *et al*., 2023). Neste contexto, BRCA1 (do inglês, *Breast cancer 1*) foi bem caracterizado como um gene de suscetibilidade para o CM triplo negativo (Shimelis *et al.,* 2018), bem como as variantes patogênicas BRIP1 , BARD1 , RAD51C e PALB2, que foram descritas com maior frequência em comparação com outros subtipos de câncer (Laraqui *et al.,* 2021).

A seguir será descrito brevemente algumas das principais características e as vias de sinalização ativadas por estes receptores (receptores hormonais e HER2) envolvidos no CM.

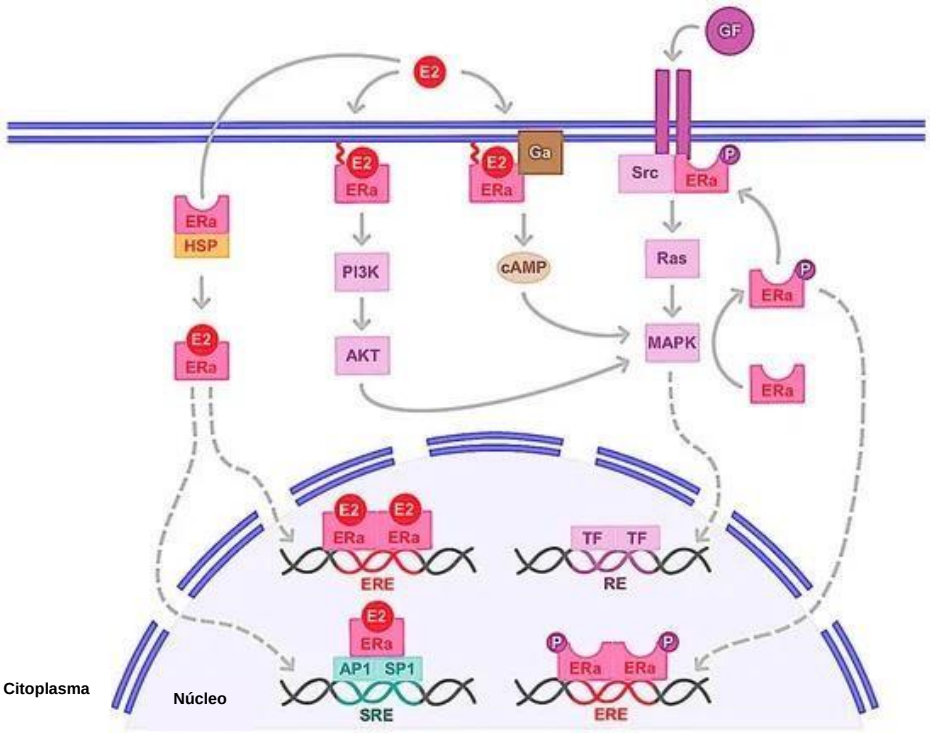
2.1.4.1 Receptores de estrogênio (ER)

Os receptores de estrogênio (ER) pertencem à superfamília de receptores esteroides e nucleares, que quando ativados por estrogênio medeiam e regulam vários processos fisiológicos tais como: desenvolvimento de órgãos sexuais, mobilização de colesterol, sistema cardiovascular, gravidez entre outros (Begam; Jubie;Nanjan, 2017; Asavasupreechar *et al.,* 2020). Com base em genes específicos localizados nos cromossomos eles são subdivididos em receptores de estrogênio alfa (ERα, também conhecidos como ESR1) e receptores de estrogênio β (ERβ, também conhecidos como ESR2). ERα é o receptor de estrogênio mais conhecido e está presente na glândula mamária, localizado predominantemente no núcleo, podendo, no entanto, se mover entre este compartimento e o citoplasma, onde atua por duas vias principais, a via genômica e a não genômica (Edwards, 2005; Khan *et al*., 2022) (Figura 7).

Na via genômica, o estrogênio (E2) se liga ao ERα, promovendo uma mudança conformacional que ativa o receptor. O ERα ativado se dimeriza e é translocado para o núcleo, onde recruta co-repressores transcricionais (Shiau *et al*., 1998) e interage com fatores de transcrição ou com elementos reguladores específicos, tais como os elementos de resposta ao estrogênio (EREs) e os elementos responsivos ao soro (SREs) (Frasor *et al*., 2003; Stender *et al*., 2010). Por meio dessa via o ERα regula a transcrição de uma ampla gama de genes envolvidos no crescimento e na diferenciação celular. Em células sadias, por exemplo, contribui para o desenvolvimento e a manutenção do tecido mamário

durante o ciclo menstrual e na gravidez. Já nas células tumorais ERα regula a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, na proliferação e na apoptose, tais como MYC, ciclina D1, FOXM1, GREB1, BCL2, IGF-1 e CXCL12, que possuem potencial oncogênico, levando ao aumento de células cancerígenas e ao risco de danos no DNA em resposta aos estrogênios (Harbeck *et al*., 2019) (Figura 7).

Figura 7. Vias genômica e não genômica do receptor de estrogênio alfa (ERα)



Vias genômicas e não genômicas do ERα. A ativação de ERα ocorre após a ligação de estrogênio (E2) ou fosforilação (P) por cinases celulares. A estimulação do receptor do fator de crescimento (GF) leva à sua translocação para o núcleo. Lá, o homodímero de ERα se liga ao DNA direta ou indiretamente, por meio de elementos responsivos ao estrogênio (EREs), ou através de fatores de transcrição, como AP1 ou SP1, que se ligam ao DNA por meio dos elementos responsivos ao soro (SREs). Esta é a chamada ação genômica de ERα, que leva à regulação da transcrição de genes alvo. ERα também pode estar ancorado à membrana e interagir com proteínas G (Ga) ou receptores GF. A ativação de ERα também desencadeia a produção de segundos mensageiros (como o monofosfato de adenosina cíclico, AMPc) e estimula vias de sinalização envolvendo PI3K/AKT ou Ras/MAPK, por exemplo. Essa atividade não genômica do ERα eventualmente leva à ativação de fatores de transcrição (FTs) envolvidos na regulação da proliferação e sobrevivência celular.
Fonte: Adaptado de Clusan *et al*., 2023.

Na via não genômica o E2 se liga ao ERα citosólico e forma um complexo citoplasmático com algumas proteínas, como a Src (do inglês, *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) e a PI3K (fosfoinositídeo 3-cinase), desencadeando a ativação das vias das MAPK (cinases ativadas por mitógenos) e de AKT (proteína cinase B) (Cabodi *et al*., 2004), que estão envolvidas com a proliferação, sobrevivência e migração celular (Acconcia; Barnes; Kumar, 2006; Song; Zhang;

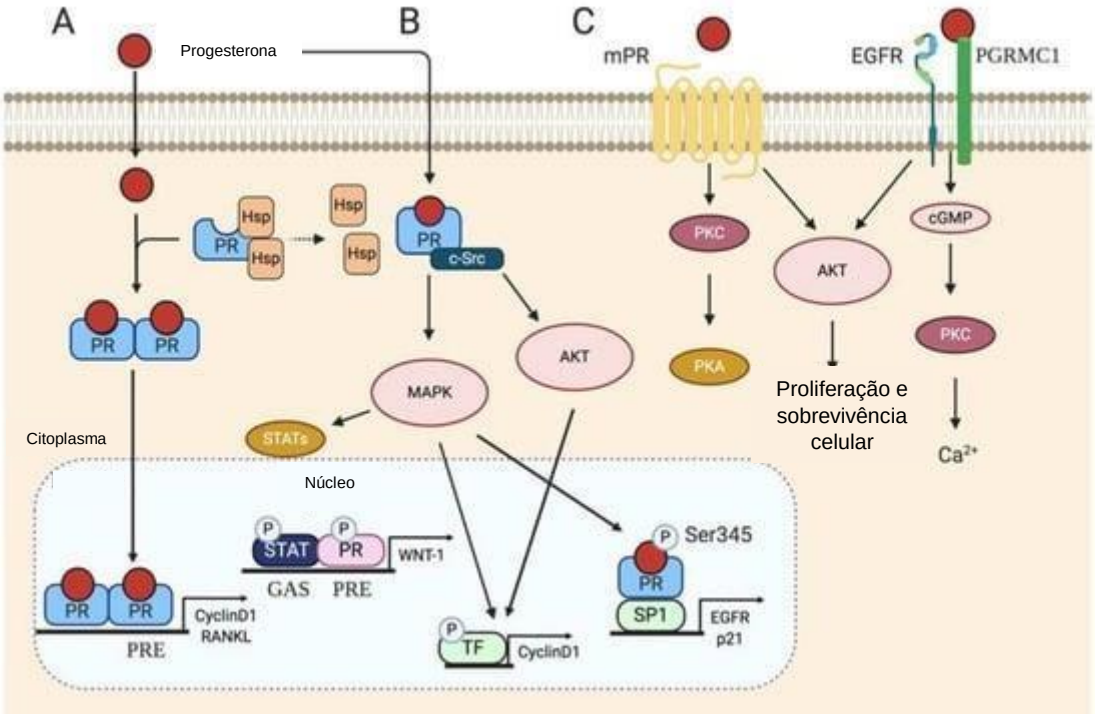
Santen, 2005). O E2 também pode ativar uma proteína transmembrana chamada GPER (do inglês*, G protein-coupled estrogen receptor 1*), que está presente em diversos tecidos como no fígado, no tecido adiposo e nas glândulas mamárias (Varricchio *et al.,* 2007), cuja expressão também vem sendo relatada em vários tipos de câncer de mama (Xu *et al*., 2022). A estimulação dessa proteína pela E2 desencadeia o aumento nas concentrações de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) (Luo; Liu, 2020) e a mobilização de cálcio intracelular, resultando na ativação das vias de PI3K/Akt e Ras/MAPK, as quais regulam genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (Chan *et al.,* 2019) (Figura 7). Por fim, estudos demonstraram que as vias genômica e não genômica estão conectadas (Larosa *et al.,* 2012; Acconcia; Marino, 2003; Pedram *et al.,* 2002), indicando que há uma convergência de sinalização em elementos e/ou genes alvo do E2 (Bjϋrnstrϋ; Sjϋberg, 2005).

2.1.4.2 Receptores de progesterona (PR)

Os receptores de progesterona (PR) são membros da superfamília de fatores de transcrição do receptor nuclear, localizados no citoplasma como um complexo de chaperona multiproteica que funciona de maneira dependente e/ou independente de ligante (Scarpin *et al*., 2009). Possuem duas isoformas PRα e PRβ, que são codificadas pelo mesmo gene localizado no cromossomo 11 (11q22-q23) e transcritas por promotores distintos induzidos por E2. Portanto, acredita-se que os PRs sejam alvos diretos dos ERs (Anderson, 2002).

Os PRs apresentam duas vias de sinalização, denominadas de vias clássica e não clássica (Figura 8). Na sinalização clássica (Figura 8-A) a progesterona se liga ao receptor, promovendo uma mudança conformacional que induz a dissociação da proteína de choque térmico (HSP) e dimerização do PR. O complexo ligante-receptor liga-se a um elemento de resposta da progesterona (PRE), ativando a transcrição gênica de alvos efetores a jusante, tais como as proteínas ciclina D1 relacionada com a regulação do ciclo celular (JIA *et al.,* 2024) e RANKL (Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B"), envolvida na diferenciação dos osteoclastos (Yokota, 2023).

Figura 8. Sinalização clássica e não clássica dos receptores de progesterona (PR)



Visão geral das ações da progesterona por meio da sinalização clássica e não clássica. (**A**) A sinalização clássica induzida pela ligação da progesterona aos seus receptores (PR) leva à dissociação da proteína de choque térmico (HSP), dimerização de PR, ligação do elemento de resposta à progesterona (PRE) e transcrição de alvos efetores a jusante, como ciclina D1 e RANKL. (**B**) A rápida ativação não clássica de progesterona de ações proximais à membrana no proto-oncogene tirosina-proteína Src (c-Src), na proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e na proteína quinase B (AKT), promove a fosforilação de PR e a ligação à fatores de transcrição que transcrevem os genes das proteínas WNT-1, ciclina D1, EGFR e p21. (**C**) Os progesterona iniciam a sinalização não clássica dos receptores de progesterona de membrana (mPRs) e do componente 1 da membrana do receptor de progesterona (PGRMC1), ativando alvos a jusante (como exemplo, a proteína quinase C (PKC); a proteína quinase A (PKA); o monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e AKT), levando ao influxo de Ca^{2+} , proliferação e sobrevivência celular.

Fonte: Adaptado de Pedroza, Subramani e Lakshmanaswamy (2020).

Na sinalização não clássica (Figura 8-B), a progesterona ativa vias de sinalização importantes, como as vias MAPK e AKT, que promovem a proliferação e o crescimento das células tumorais. Quando a progesterona se liga ao seu receptor (PR), ocorre a ativação da proteína c-Src e a fosforilação do PR na posição Ser345, um processo regulado pela via MAPK. Essa fosforilação aumenta a ativação de STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) mediada pela prolactina. A ativação de STAT por sua vez estimula a transcrição do WNT-1, um proto-oncogene que pode contribuir para o desenvolvimento de câncer (Leehy *et al.,* 2018)

Ademais, na via não clássica, a progesterona também apresenta a capacidade de se ligar à receptores presentes nas membranas celulares,

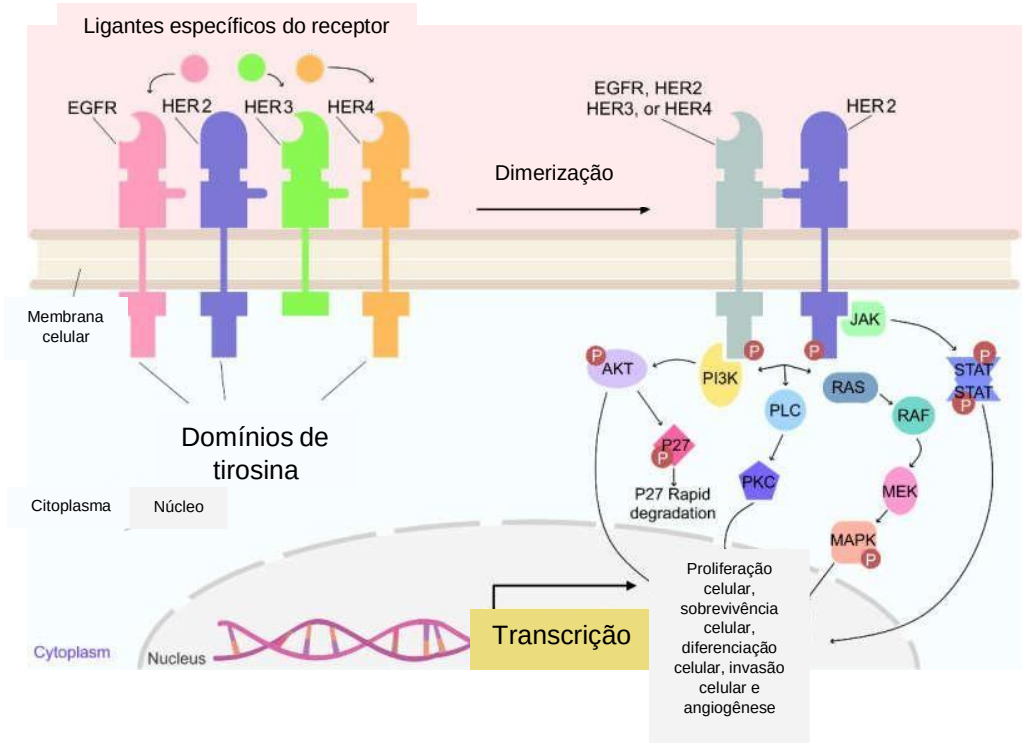
denominados de “receptores de progesterona de membrana” (mPRs) (Figura 8-C). Alguns desses receptores possuem 7 domínios transmembranares e são semelhantes a proteína G (GPCRs) (Valadez-Cosmes *et al.,* 2016), enquanto outros se apresentam como um único tipo de proteína de domínio transmembrana conhecida como “componente de membrana do receptor de progesterona 1 e 2” (PGRMC1 e PGRMC2) (Cahill, 2007). Quando a progesterona se liga aos mPRs ativa várias vias de sinalização, incluindo as MAPKs, logo o influxo de cálcio (Ca^{2+}) dentro da célula e as cascatas de sinalização resultantes desencadeiam respostas celulares críticas envolvendo a regulação do crescimento e da proliferação celular (Ashley *et al.,* 2006; Hanna *et al*., 2006; Karteris *et al.,* 2006).

2.1.4.3 Receptores HER2

HER2, uma proteína da família HER, são receptores transmembrana do fator de crescimento tipo II e constitui um oncogene em células de câncer de mama HER2-positivo (Moasser, 2007). Essa proteína tem potencial tumorigênico quando superexpressa, o que ocorre por meio da sua amplificação genética ou desregulação transcricional (Figueiredo *et al*., 2022). É relatado na literatura que células HER2+ (OH; BANG, 2019) apresentam 25-50 cópias do gene HER2 e um aumento de 40-100 vezes na expressão da proteína HER2, resultando em até 2 milhões de receptores expressos na superfície dos tumores de mama (Moasser, 2007).

HER2 induz a tumorigênese por uma série de sinalizações (Figura 9). A atividade dessa proteína não depende de sua ligação direta com ligantes (Sliwkowski, 2003). Quando superexpresso HER2 apresenta uma conformação constitutivamente aberta, o que permite a interação com RTK (receptor de tirosina cinase) disponíveis (Cho *et al.,* 2003), tais como o EGF (fator de crescimento epidérmico). Assim, o EGF se liga ao seu receptor (EGFR), induzindo a formação de dímeros com HER2, o que resulta na fosforilação de resíduos de tirosina e na transdução de sinais, desencadeando a ativação de diversas vias de sinalização (por exemplo: PI3K/AKT, RAS/MEK/MAPK, JAK/STAT e PKC), que promovem distintos efeitos relacionados à proliferação, diferenciação, invasão celular, angiogênese, entre outros (Najjar *et al*., 2022).

Figura 9. Via de sinalização HER2



HER2 é ativado após heterodimerização com outra família de receptores EGFR ativados ou por heterodimerização com receptores HER2 ativados. A dimerização do receptor leva à fosforilação de resíduos de tirosina e à transdução de sinais. PI3K/AKT, RAS/MEK/MAPK, JAK/STAT e PKC são as vias de sinalização mais comuns por meio das quais várias cascatas a jusante são ativadas, promovendo vários efeitos, incluindo proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, angiogênese e invasão. Além disso, PI3K/AKT ativado também leva à degradação do inibidor do ciclo celular p27 ^{Kip1} e, portanto, promove a progressão do ciclo celular.
EGF: fator de crescimento epidérmico; **HB-EGF:** fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina; **TGF:** fator de crescimento tumoral; **NRG:** neuregulina.

Fonte: Adaptado de Najjar *et al*. (2022).

2.1.5 Tratamento

De maneira geral, a terapia utilizada para o tratamento do câncer de mama é baseada no seu subtipo molecular (Shien; Iwata, 2020). Quando o diagnóstico é realizado nos estágios iniciais da doença a primeira opção é a cirurgia, que consiste na retirada do tumor. No CM a cirurgia pode ter duas abordagens: I) a mastectomia: consiste na retirada total da mama, incluindo todo tecido mamário e às vezes tecidos adjacentes; e a II) Lumpectomia, mastectomia parcial ou cirurgia conservadora da mama: essa abordagem envolve a retirada do segmento que contém o tumor mamário, com uma região de tecido normal circundante como margem de segurança (Schnitt; Moran; Giuliano, 2020).

Além do procedimento cirúrgico, caso seja necessário utiliza-se também a radioterapia (Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023). A radioterapia baseia-se no uso de

radiações de alta energia (como raios-X e raios gama), que são aplicadas em toda a mama ou em uma parte da mesma (após a lumpectomia, por exemplo), na parede torácica (após a mastectomia) e/ou em linfonodos regionais (Boyages, 2017). Essa terapia pode ser utilizada para tratar todos os subtipos de CM, mas tem maior aplicabilidade no subtipo triplo negativo, uma vez que esse subtipo não possui uma terapia personalizada (Feng *et al.,* 2018).

Existem ainda modalidades terapêuticas mais atuais e personalizadas, como a imunoterapia (Silva, *et al.,* 2014), terapia hormonal (Chlebowski; Manson, 2022) e terapia alvo (Ye *et al*., 2023).

A imunoterapia tem como mecanismo de ação induzir o sistema imunológico do próprio paciente para que reconheça e elimine o tumor maligno, escapando das barreiras imunossupressoras desenvolvidas pelo câncer (Syn et al., 2017). Nesta terapia são utilizadas abordagens baseadas na transferência de células T, anticorpos monoclonais, vacinas de tratamento, moduladores imunológicos e inibidores dos pontos de controle (*checkpoints*) imunológicos, com o objetivo de ativar as respostas das células efetoras do sistema imune e provocar a morte celular. Como exemplos de imunoterapicos já usados na clínica pode-se citar os antagonistas do ligante de morte celular programada-1/morte programada-1 (PD-1/PD-L1) (como Avelumab, Atezolizumab, Tezolizumab e Pembrolizumab), ligantes da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), (como Tremelimumab e Ipilimuma), que são utilizados para tratar os cânceres de mama triplo negativo (TN), Hormônio positivos (ER+ ou PR+) e HER2 negativo (HER2−) (Loibl *et al.,* 2021; Márquez-Garbán *et al.,* 2019; Emens, 2018).

O CM HER2+ também pode ser tratado utilizando anticorpos monoclonais, tais como o trastuzumab (Herceptin), trastuzumab-DM1 (T-DM1) e pertuzumab. O trastuzumab é usado como tratamento de primeira linha nesse tipo de CM e vem sendo inserido em monoterapia ou em combinação com a quimioterapia. O uso desse anticorpo monoclonal tem demonstrado resultados promissores, favorecendo a resposta imune por intermédio da ativação de células T, células *natural killers* e macrófagos, produzindo efeitos antitumorais citotóxicos em pacientes acometidos com esse tipo de câncer (Schneble; Jinga; Peoples, 2015).

A Terapia hormonal é utilizada nos tipos de tumores hormônio dependentes. Esses medicamentos agem de forma sistêmica, diminuindo a capacidade de liberação e produção desses hormônios, ou bloqueando a ligação destes com seus

receptores, privando as células neoplásicas dos estímulos necessários para sua proliferação (Deli; Orosz; Jakab, 2020). Essa modalidade geralmente é utilizada como terapia neoadjuvante, sendo aplicada antes da retirada do tumor (Korde *et al*., 2021).

No CM, a terapia hormonal é empregada para tratar pacientes positivos aos receptores hormonais (RH), dos subtipos Luminal A e Luminal B (Wang; Minden, 2022). Os receptores de estrogênio têm sido modulados pelo uso de antiestrogênios, que compreendem principalmente os Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERMs) e os Reguladores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERDs), tais como o Tamoxifeno, Toremifeno, Raloxifeno e o Fulvestrant (Patel; Bihani, 2018). Os inibidores de aromatase (Ais) também são empregados, os quais atuam por meio da inibição da conversão de andrógenos em estrogênios (Goldstein, 2021; Chakraborty, 2022). Contudo, o uso dessa terapia pode apresentar alguns efeitos colaterais, que limitam a sua aplicabilidade, prejudicando tecidos/orgãos vitais presentes no osso, coração e cérebro, por exemplo, uma vez que o estrogênio desempenha papéis importantes nesses locais (Wang; Minden, 2022).

A terapia alvo atua na destruição seletiva das células tumorais, reconhecendo alvos moleculares específicos nas células transformadas que promovem seu crescimento, disseminação e capacidade proliferativa (Baudino, 2015). Os tipos mais comumente utilizados atualmente compreendem os anticorpos monoclonais e os inibidores de pequenas moléculas (Cao; Niu, 2020). No tratamento do CM já tem sido utilizado: I) inibidores de PI3K/AKT/mTOR, que inibem a via mTOR (como exemplo a Metformina e Demetoxicurcumina); II) inibidores de PARP (Olaparib, Talazoparib, Veliparib, Iniparib); III) inibidores de mTOR (Everolimus); IV) inibidores de pan-PI3K (por exemplo, Buparlisib, Alpelisib, Pictilisib, Taselisib); e V) inibidores de CDK4/6 (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib) (Faria *et al.,* 2019; Cao, *et al.,* 2019; Cortesi; Rugo; Jackisch, 2021; Moreau-Bachelard *et al.*, 2023; Glaviano *et al*., 2023; Zhang *et al*., 2024).

Como relatado, estas terapias se mostram promissoras por serem alvo-dirigidas e personalizadas, contudo, ainda não são acessíveis para o tratamento da grande maioria dos pacientes devido ao seu alto custo (Mailankody; Prasad, 2015; Prasad; Jesus; Mailankody, 2017; Seiger *et al.,* 2020). Neste contexto, a quimioterapia apresenta-se como a primeira opção para o tratamento de vários tipos de câncer (Galmarin *et al*., 2012). Baseia-se no tratamento sistêmico, ou seja, no

uso de medicamentos que atuam na circulação sanguínea e consequentemente afetam as células sadias e neoplásicas em todos os tecidos do corpo (Pereyra *et al.,* 2019). O tratamento sistêmico varia em terapia adjuvante (após a retirada cirúrgica) e neoadjuvante (antes da retirada cirúrgica) (Shien; Iwata, 2020; Viale *et al.,* 2008).

De acordo com o seus mecanismos de ação os quimioterápicos podem ser divididos em: I) agentes alquilantes, tais como a ciclofosfamida e as nitrosureias (carmustina, lomustina e estreptozocina) (Sauter; Gillingham, 2018), que atuam por meio da ligação de grupos alquil à diferentes partes do DNA (Peng; Pei, 2021); II) antimetabólitos, por exemplo o 5-fluoracil e o metotrexato, que agem inibindo a enzima timidilato sintase, bloqueando a síntese de DNA nas células neoplásicas, (Brandes *et al*., 2016); III) inibidores da topoisomerase, tais como o topotecano (Beretta *et al*., 2013) e o irinotecano (Hart *et al*., 2021), que impedem a ação das enzimas topoisomerases I e II durante a replicação (You; Gao, 2019); IV) inibidores do fuso mitótico, como o paclitaxel, docetaxel, taxano e os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), que atuam inibindo a função dos microtúbulos do fuso mitótico, levando à morte celular (Asma *et al.,* 2022; Sinha; Duijf; Khanna, 2019; Chin *et al.,* 2022); e os V) antibióticos antitumorais, como a daunorrubicina, doxorrubicina, e epirrubicina, que impedem o complexo da topoisomerase II, inibindo a replicação celular (Apetoh *et al.,* 2015; Mayer; Tardi; Louie, 2019).

A combinação terapêutica vem sendo utilizada a séculos e o uso da quimioterapia combinada com outras terapias oferece vantagens como a chance de melhorar a eficácia e a diminuição do desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Foucquier; Guedj, 2015). A quimioterapia combinada pode ser utilizada para tratar todos os subtipos de CM e deve ser escolhido de acordo com as características biológicas de cada subtipo (Fisusi; Akala, 2019). Os regimes de quimioterapia combinada a outra terapia são classificados como primeira, segunda e terceira geração, com diferentes combinações de fármacos e ciclos de admnistrações, conforme evidenciado no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação dos regimes de quimioterapia utilizada para tratar o câncer de mama

Geração	Regime
Primeira geração	CMFx6, ACx4, FEC50x6
Segunda geração	FEC100x6, CAFx6, FACx6
	ACx4- Tx4
	DCx4, Ex4- CMFx4
Terceira geração	FECx4- Dx3, FECx4- Tx8
	DACx6
	ACx4- Tx4 de dose densa
	ACx4- paclitaxel semanal
	ACx4- docetaxel

CMF: Ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil; **AC:**Doxorrubicina, ciclofosfamida; **FEC50:** 5-fluorouracil, epirrubicina (50 mg), ciclofosfamida; **FEC100:** 5-fluorouracil, epirrubicina (100 mg), ciclofosfamida; **AC-T:** Doxorrubicina; ciclofosfamida e paclitaxel; **DC:** Docetaxel, ciclofosfamida; **CAF:** Ciclofosfamida, doxorrubicina, 5-fluorouracil; **FAC:** 5-fluororacil, doxorrubicina, ciclofosfamida; **DAC:** Docetaxel, doxorrubicina, ciclofosfamida; **T:** paclitaxel; **D:**Docetaxel; **E:** Epirrubicina.

Fonte: Adaptado de Anampa; Makower; Sparano (2015).

No entanto, a quimioterapia apresenta limitações que comprometem o sucesso terapêutico, o que é evidenciado em pacientes com resistência aos quimioterápicos, envolvendo mecanismos que reduzem a absorção ou induzem o efluxo desses agentes. Além disso, por agirem de forma sistêmica provocam a destruição de células sadias, toxicidade e diversos efeitos colaterais (Mondal; Panigrahi; Khuda-Bukhsh, 2014; Hussein, 2024). Por isso a pesquisa por novos agentes antitumorais tem sido constante, objetivando identificar novas moléculas que atuem de forma seletiva nas células neoplásicas, minimizando os efeitos tóxicos destas terapias (Stine *et al.,* 2022).

2.2 Ciclo celular e o câncer de mama

A manutenção da homeostase dos tecidos é controlada por dois processos fisiológicos principais, a divisão e a morte celular, que quando desregulados são responsáveis pelo desenvolvimento de células alteradas e com intenso potencial proliferativo (Piezzo *et al*., 2020).

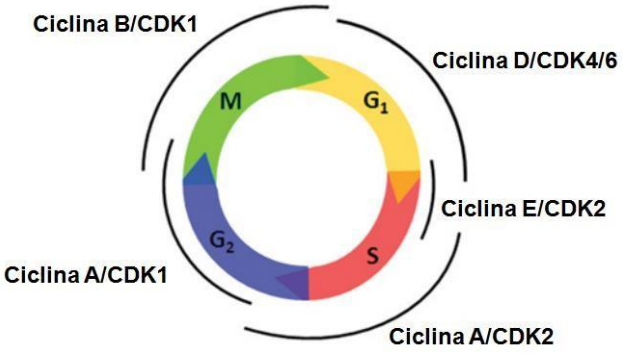
O ciclo celular é a sequência de eventos coordenada por diversas moléculas que monitoram continuamente as células em processos que envolvem a diferenciação, replicação do genoma, divisão e proliferação (Chinzei *et al.,* 2015).

Essa sequência consiste em duas etapas principais: (1) a intérfase (subdividida nas fases G1, S e G2), etapa onde ocorre o crescimento celular e a duplicação do material genético, e a (2) mitose ou fase M, caracterizada pela divisão celular propriamente dita, culminando com a formação de duas células filhas idênticas (Tan; Duncan; Slawson, 2017).

A maioria das células diferenciadas dos tecidos adultos sadios é mantida em um estado de dormência denominado G0, caracterizado pela ausência de atividade proliferativa, embora as células estejam metabolicamente ativas. Este período pode ser transitório e reversível (quiescência) ou permanente (senescência), resultando neste último caso na morte celular (Piezzo *et al*., 2020). Caso as células quiescentes recebam estímulos mitogênicos para se dividirem elas poderão iniciar um novo ciclo celular. A primera fase, denominada G1 (do inglês, *gap* 1), é caracterizada pelo aumento do tamanho e do metabolismo celular. Genes de diferentes moléculas envolvidas no controle das etapas seguintes do ciclo estão sendo transcritos. Posteriormente, o material genético das células será sintetizado na fase S. A próxima etapa é chamada de G2 (do inglês, *gap* 2) e corresponde à fase no qual as células finalizam seu crescimento e sintetizam proteínas necessárias para entrar na última etapa, a fase M, onde ocorre a divisão celular e a formação das novas células (Thu *et al*., 2018). Ainda, nas fases *Gap* (G1 e G2) existem pontos de verificação regulatórios críticos que monitoram a integridade deste processo e determinam se as células poderão entrar na fase S e M, respectivamente (Niu; Xu; Sun, 2019).

O ciclo celular é regulado majoritariamente por proteínas ciclinas e cinases dependente de ciclinas (CDKs) (Figura 10). Em células sadias quiescentes, a fase G1 é regulada por CDK4 e CDK6, duas serina/treonina cinases cuja atividade catalítica é modulada por ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3). Esse complexo inativa a proteína associada ao retinoblastoma (pRb), uma importante proteína supressora tumoral, que atua como co-repressor transcricional e limita a expressão dos genes alvos de E2F, um fator de transcrição responsável pela progressão do ciclo celular. A hiperfosforilação de Rb pelo complexo ciclina D-CDK4/6 reduz sua afinidade por E2F e permite a liberação deste para transcrever os genes necessários a entrada da célula na fase S (Cardoso *et al.,* 2018).

Figura 10. Progressão do ciclo celular mediado por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs)



O ciclo celular consiste de uma fase onde ocorre a síntese de DNA (S) e uma fase mitótica (M), separada por dois intervalos ou *gaps* (G1 e G2), necessários ao crescimento celular. Diferentes complexos ciclina/CDK regulam a progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular. **Fonte:** Adaptado de Suryadinata et al., 2010

De acordo com Piezzo et al. (2020) no câncer de mama é observado frequentemente uma desregulação do ciclo celular via ciclina D/CDK/pRb, no qual o complexo CDK4/6 foi identificado como principal indutor da proliferação em CM HR-positivo, enquanto a pRb é encontrada alterada em tumores TN e HER2+ (Jiang *et al.,* 2019). Ainda, é relatado na literatura que tumores luminais e HER2+ apresentam os genes *CCND1* (codifica a ciclina-D1), CCNE1 (codifica a ciclina E1) e CDK4 superexpressos, modulando o processo de divisão celular e proliferação de células neoplásicas (Jiang *et al.,* 2019; Rinaldi *et al*., 2020).

Atualmente os inibores de CDK4/6, como exemplo o palbociclib, ribociclib e abemaciclib, são os únicos medicamentos ciclo-específicos aprovados para o tratamento do CM, induzindo as células tumorais a entrarem em um estado de quiescência (Slamon *et al.,* 2023). O conhecimento desses marcadores moleculares fornece uma justificativa para utilizar reguladores do ciclo celular em pacientes com CM, bem como aprofundar os estudos para o desenvolvimento de novos fármacos desta classe (Fuentes-Antrás; Bedard; Cescón, 2024).

2.3 Apoptose e o câncer de mama

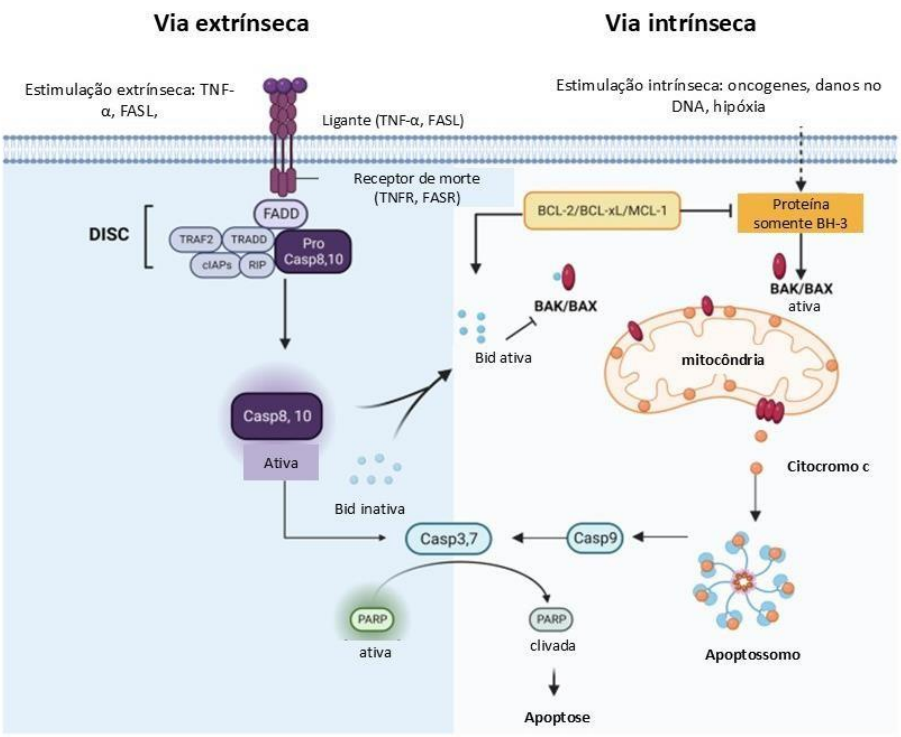
A apoptose é um tipo de morte celular que regula processos fisiológicos vitais, tais como a diferenciação e o desenvolvimento embrionário, eliminando células alteradas, não-funcionais ou contendo danos irreparáveis, com o objetivo de manter a homeostase celular (Singh; Letai.; Sarosiek, 2019; Galimberti; Rothlin; Ghosh,

2019). Na carcinogênese, a apoptose pode auxiliar no controle das células que invadem outros tecidos, bloqueando a metástase (Ichim; Tait, 2016; Su *et al*., 2015), entretanto sabe-se que diferentes tipos de cânceres desenvolvem resistência à apoptose (Rathore *et al.*, 2017; Sharma; Boise; Shanmugam, 2019), portanto, o estudo dessas vias de sinalização celular é importante para a busca de novos alvos terapêuticos no tratamento do câncer (Carneiro; El-Deiry, 2020).

A apoptose apresenta características morfológicas específicas que incluem a contração celular, agregação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs* de membrana) e de corpos apoptóticos (fragmentos celulares envolvidos por membrana) (Roos; Kaina, 2013). Adicionalmente, também ocorrem mudanças bioquímicas características, incluindo a ativação de proteínas denominadas caspases, a clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais, e alterações na superfície da membrana, como por exemplo, a externalização da fosfatidilserina, fosfolipídeo que ao ser translocado sinaliza para que células apoptóticas sejam reconhecidas e destruídas por fagócitos (Saraste; Pulkki, 2000; Shlomovitz; Speir; Gerlic, 2019). Em geral a apoptose resulta em uma eliminação “silenciosa” da célula, pois não há extravassamento do conteúdo intracelular, e consequentemente não ocorre um processo inflamatório, diferente da necrose, outro tipo de morte celular (Galluzzi *et al.,* 2018).

Esse processo pode acontecer por duas vias principais dependentes de proteases de cisteína que clivam seus alvos em resíduos de ácido aspártico, denominadas caspases: 1) via endógena, intrínseca ou mitocondrial e 2) via extrínseca, exógena ou induzida por receptores de morte (Campbell; Tait, 2018) (Figura 11). Adicionalmente, existem relatos na literatura que indicam uma via alternativa independente de caspases, onde a morte celular é mediada pela proteína formadora de poros, perforina, e por uma serina protease denominada granzima (Voskoboinik; Whisstock; Trapani, 2015).

Figura 11. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose



A via extrínseca é iniciada pela ligação de ligantes de morte aos receptores de morte, o que ativa a caspase 8. A via intrínseca, regulada pela família Bcl-2, é desencadeada por estressores intracelulares, como danos ao DNA e estresse oxidativo, resultando na liberação do citocromo c da mitocôndria e na ativação da caspase 9. As duas vias convergem, em última análise, na caspase 3, que medeia a execução da apoptose.

Fonte: Adaptado de Park *et al. (*2023).

A via extrínseca da apoptose é induzida por ligantes externos, como o Fas/CD95 e/ou o fator de necrose tumoral (TNFα), que se ligam aos receptores de morte na superfície celular. Estes receptores são proteínas da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), que inclui o receptor para o próprio TNF (TNF-R1), o receptor de morte Fas (CD95 e APO1) e os receptores para o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL, do inglês *TNF-related apoptosis inducing ligand*) (Tummers; Green, 2017). A ativação desses receptores promove o recrutamento de pró-caspases iniciadoras (-8, -10 ou ambas) para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do *inglês death-inducing signaling complex*), que ativa caspases executoras (geralmente a -3 e -7), as quais direcionam a célula à morte (Ashkenazi, 2015). Ainda, a caspase-8 também pode ativar a apoptose por uma via mediada por mitocôndrias, clivando a proteína Bid (do inglês*, BH3 interacting domain death agonist*), e o Bid clivado (tBid) ativa Bax (do inglês, *Bcl-2 associated X*

protein) e/ou Bak (do inglês*, Bcl-2 antagonist killer 1*), para mediar a liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria, iniciando a apoptose (Shoshan-Barmatz; Arif; Shteinfer-Kuzmine, 2023).

A ativação da apoptose também pode ocorrer em resposta à estímulos celulares internos, como o estresse oxidativo, fragmentação do DNA, exposição à radiação ou medicamentos citotóxicos, entre outros. Esses estímulos levam ao aumento na produção de proteínas da família Bcl-2 (do inglês, *B cell Lymphoma 2*) , como exemplo as proteínas pró-apoptóticas BH3-*only* (BIM, BID, PUMA, BMF, NOXA, BIK, BAD e HRK) (Lopez; Tait, 2015), que por sua vez se ligam às proteínas antiapoptóticas BCL-2, liberando efetores da apoptose como BAX e BAK. Uma vez liberados esses efetores oligomerizam e formam poros na membrana mitocondrial externa, causando a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT, do inglês *mitochondrial permeability transition*), com consequente liberação de fatores apoptogênicos (como o citocromo c e as proteínas apoptóticas SMAC/DIABLO) a partir do interior da mitocôndria para o citosol (Uren; Iyer;Kluck, 2017). O citocromo c se associa ao Fator 1 de Ativação de Protease Apoptótica (APAF-1) e à pró-caspase-9 para constituir um complexo proteico chamado apoptossomo. Em seguida, a pró-caspase iniciadora -9 é ativada e cliva as pró-caspases executoras (-3, -6, -7), que executam a apoptose através da via intrínseca (Singh;Letai; Sarosiek, 2019).

As proteínas da família Bcl-2 exercem papéis críticos distintos durante o desenvolvimento e a função do organismo (Brinkmann *et al.,* 2022). Os constituintes dessa família de proteínas podem ser classificados em três subgrupos com base em suas funções e na similaridade da sequência de aminoácidos. Isso inclui as proteínas pró-apoptóticas BH3-*only* (BIM, BID, PUMA, BMF, NOXA, BIK, BAD, HRK), as proteínas pró-sobrevivência (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1) e os efetores da apoptose (BAX, BAK, BOK). O que define se uma célula entrará em apoptose ou sobreviverá é a interação entre os membros dos subgrupos dessas proteínas (Czabotar *et al.,* 2013; Kaloni *et al*., 2022).

Em células mamárias sadias há um equilíbrio entre os processos de proliferação celular e apoptose para manter a homeostase celular (Parton *et al.,* 2001). No CM esse equilíbrio é interrompido e a via de sinalização antiapoptótica é ativada, ou ainda observa-se uma deficiência da via proapoptótica, culminando com a proliferação celular descontrolada, resistência terapêutica e recorrência de células

tumorais (Mohammad *et al*., 2015). Neste contexto, alguns estudos relataram que a ocorrência de câncer de mama não está relacionada apenas à mutação, deleção ou ativação de alguns proto-oncogenes e genes supressores tumorais, mas também com o envolvimento do gene BCL-2 (Liu *et al.,* 2015; Sun; Zhao, 2021).

Alguns inibidores de membros da família Bcl-2 estão sendo desenvolvidos atualmente para tratar o CM (Singh; Lim, 2022), enquanto outros já foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), como exemplo o Venetoclax (Roberts *et al.*, 2016). Portanto, direcionar as células para as vias apoptóticas é uma estratégia eficiente para identificar agentes terapêuticos que visem a indução desse tipo de morte celular, tornando-se uma abordagem efetiva para tratar o CM (Rajabi *et al.*, 2021).

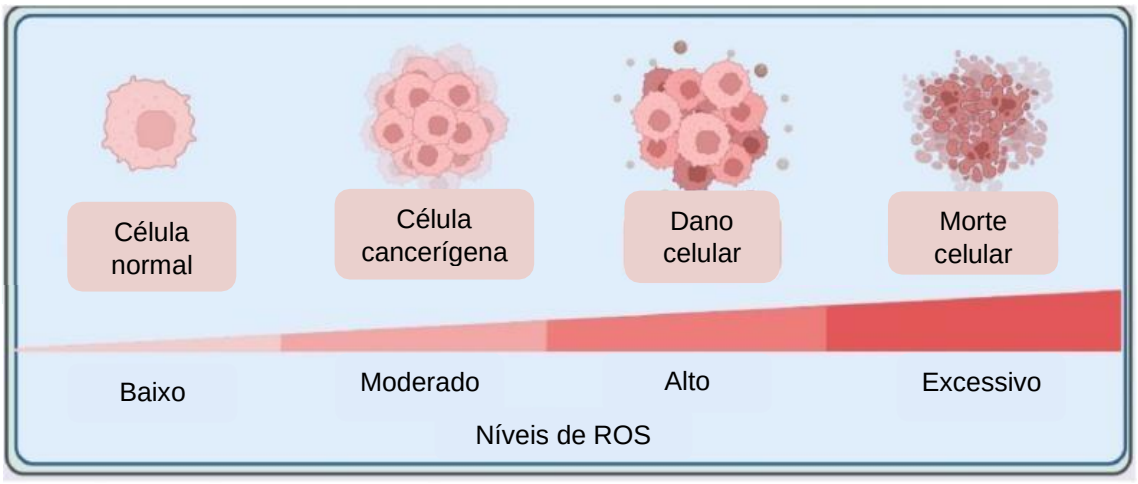
2.4 Estresse oxidativo e o câncer de mama

O estresse oxidativo (EO) refere-se ao desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante no organismo, causando uma produção excessiva de peróxidos e radicais livres, que podem danificar diversas biomoléculas nas células afetadas (Forman; Zhang, 2021; Pisoschi *et al*., 2021),

Entre os subprodutos gerados estão as espécies reativas de oxigênio (EROs), pequenas moléculas, derivadas do oxigênio molecular (Sies; Jones, 2020), que possuem elétrons desemparelhados em sua camada de valência, o que as tornam altamente reativas (Chatterjee; Chatterjee, 2020). Essas espécies incluem os radicais hidroxila (•OH), radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Perillo *et al*., 2020). Ademais, as espécies reativas de nitrogênio (RNS) também desempenham um papel significativo no estresse oxidativo (Jomova *et al.,* 2023), a exemplo do óxido nítrico (NO) e do peroxinitrito (ONOO-). As RNSs induzem danos celulares e estão envolvidos em diferentes vias de sinalização relacionadas à progressão do câncer (Zaric; Macvanin; Isenovic, 2023).

As EROs apresentam um papel dual no metabolismo celular. Geralmente concentrações baixas a moderadas são benéficas para a manutenção de atividades fisiológicas e vias de sinalização intracelulares (Hancock; Veal, 2020), no entanto, concentrações mais altas dessas espécies podem resultar em danos ou até mesmo em morte celular (Sies; Jones, 2020) (Figura 12).

Figura 12. Os papéis biológicos das espécies reativas de oxigênio (EROs)



Em células sadias antioxidantes endógenos podem neutralizar efetivamente o excesso de EROs para manter o equilíbrio redox e a homeostase celular. No entanto, níveis mais altos dessas espécies impulsionados por diferentes fatores podem levar à transformação maligna, o que promove a tumorigênese e a progressão do câncer. Além disso, o excesso de EROs induzido pelo desequilíbrio redox ou por terapias pró-oxidantes exógenas ativará múltiplas vias antioxidantes e provocará danos oxidativos às biomacromoléculas ou até mesmo a morte celular.

Fonte: Adaptada de Jiang *et al*. (2023)

O aumento de EROs desempenha um papel crucial na transformação de células sadias em células tumorais. Ele pode induzir mutações no DNA, causar quebras de fita, ou até mesmo provocar aberrações cromossômicas ao interagir com as bases nitrogenadas e com a estrutura açúcar-fosfato do DNA. Essas alterações genéticas podem comprometer a integridade dos eventos que ocorrem no ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA, resultando na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor, ambientes que favorecem a proliferação celular descontrolada e a tumorigênese (Baird; Yamamoto, 2020).

Portanto, as células tumorais apresentam níveis de EROs elevados quando comparado às células sadias, o que pode resultar em danos irreversíveis e/ou na morte celular programada (Able *et al*., 2022). Em contrapartida, se essas células receberem estímulos para produzirem antioxidantes, ou se forem expostas à estes, podem induzir a diminuição dos níveis de EROs, prevenindo consequentemente os danos celulares provocados por esse processo (Tong *et al.,* 2015). Considerando isto, já existem medicamentos que visam aumentar os níveis de EROs com o objetivo de induzir a célula tumoral à entrar em apoptose. A doxorrubicina e o paclitaxel são exemplos utilizados para tratar o CM (Kciuk *et a*l., 2023).

2.5 Organoteluranas

O telúrio é um integrante do grupo dos calcogênicos juntamente com o oxigênio, enxofre, selênio e polônio. No entanto, esse elemento se diferencia dos demais por não apresentar efeitos nos tecidos biológicos (Vavrovrá *et al*., 2021). Eles possuem propriedades químicas de um não metal ou metaloide, e as propriedades físicas de um metal (Ba *et al.,* 2010), possuindo aplicações na química orgânica e/ou na inorgânica (Teixeira *et al*., 2018).

A química do organotelúrio é um campo amplo para a pesquisa e desenvolvimento de aplicações (Nogueira; Zeni; Rocha, 2004). As organoteluranas são uma subfamília de compostos organotelúricos que apresentam pelo menos uma ligação covalente entre o telúrio (Te) e o carbono (C) (Silberman *et al.,* 2016). Além disso, exibem estruturas complexas com caráter eletrofílico, descritas por uma geometria pseudo-bipiramide-trigonal, onde os átomos mais eletronegativos ocupam uma posição axial no arranjo molecular, enquanto os átomos mais eletropositivos ocupam a posição equatorial (Cunha *et al.,* 2009). O átomo central de Te pode se unir à outros ligantes, originando uma variedade de organotuleranas com diferentes atividades biológicas (Carmely *et al.,* 2009).

Os compostos contendo telúrio apresentam propriedades biológicas relevantes, tais como atividades: antioxidante (Gay *et al*., 2010); anti-inflamatória (Rima et al., 2016); antimicrobiana (Daniel *et al*., 2009); imunomoduladora (Hayun *et al*., 2009); antiviral (Friedman *et al*., 2009); e antitumoral (Nascimento, 2021).

Vários estudos revelam o potencial antitumoral *in vitro* desses compostos.Sailer e colaboradores (2004), mostraram que a organotelurana 2,2'-dimetoxidifenilditelureto e 2,2'-diamino-3,3',5,5' -tetrametildifenilditelureto induziu a apoptose na linhagem celular de leucemia mielóide humana (HL60). Nos estudos de Hayun e colaboradores (2009) a organotelurana AS101 induziu a apoptose e interferiu no ciclo celular, direcionando a célula tumoral à entrar em um estado de senescência. Ainda, Tanini e colaboradores (2019) relataram o efeito citotóxico de uma organotelurana frente à linhagem celular de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231).

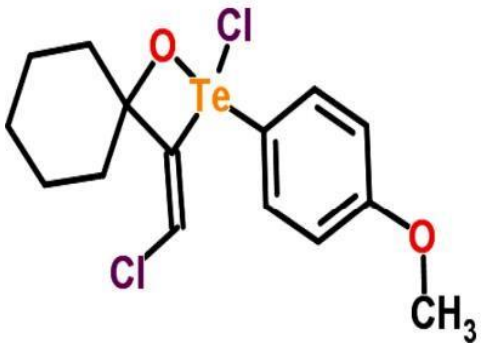
A atividade antitumoral das organoteluranas também tem sido observado em modelos *in vivo*. As organoteluranas RF 13R e RF 13S induziram efeito citotóxico e inibiram a progressão do tumor em camundongos 57BL com melanoma (Paschoalin

et al., 2019). Os estudos de Borges e colaboradores (2007) mostraram que a organotelurana DPDT induziu hepatotoxicidade por AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) e citotoxicidade nos eritrócitos de ratos wistar, colaborando com os resultados de Stangherlin *et al.* (2006) que verificaram que a mesma organotelurana provocou toxicidade no tecido testicular no mesmo modelo animal.

2.5.1 Organotelurana RF07

Dentre a ampla variedade de organoteluranas encontra-se a (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter), codificada neste trabalho como RF07 (Figura 13). Essa molécula apresenta peso molecular de 427,5 g/mol e é obtida pela incorporação do p-metoxifenilo Te com 1- etinil-1-ciclo-hexanol em refluxo de benzeno (Persike *et al*, 2008; Paschoalin *et al.,* 2019).

Figura 13. Estrutura química da organotelurana RF07 ((4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter)



Fonte: Adaptada de Nunes *et al*. (2020).

Na literatura são descritas algumas atividades biológicas dessa molécula, como: antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, anticonvulsivante, hemolítica, proteolítica, anti-leishmania e antitumoral (Persike *et al*., 2008; Pimentel *et al*., 2012; Maluf *et al*., 2015; Nunes *et al*., 2020; Nunes *et al*. (2020); Nascimento *et al*., 2021).

Entretanto a citotoxicidade e atividade antitumoral dessa molécula ainda é pouco explorada. Nascimento e colaboradores (2021) demonstraram que a RF07 apresenta capacidade de induzir morte celular *in vitro* por via apoptótica, além de provocar efeitos genotóxicos e mutagênicos em cultura primária de sarcoma murino.

Em outro estudo, Nascimento e colaboradores (2023) evidenciaram o efeito citotóxico da RF07 frente as linhagens celulares de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e MCF-7. Para a linhagem MDA-MB-231 a substância RF07 apresentou concentração inibitória média (CI_{50}) de 4,78 µM e induziu citotoxicidade e apoptose através da ativação da via mitocondrial. Na linhagem MCF-7 a CI_{50} obtida foi de 1,86 µM e também houve ativação da apoptose nesse tipo celular.

Considerando isto, observa-se que o RF07 possui potencial citotóxico em células tumorais, apesar de seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente elucidados. Por isso, este estudo foi conduzido para uma melhor compreensão da ação citotóxica e atividade antitumoral dessa substância na linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a citotoxicidade e ação antitumoral *in vitro* do (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) (RF07).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do RF07 em linhagem de câncer de mama humano (MCF-7);
- Avaliar a citotoxicidade do RF07 em células não tumorais mamárias (MCF-10A);
- Determinar o índice de seletividade (IS) do RF07;
- Verificar a interferência do RF07 sobre a progressão do ciclo celular em células MCF-7;
- Identificar o tipo de morte (apoptose ou necrose) induzida pelo RF07 em células MCF-7;
- Investigar a interferência do RF07 no estresse oxidativo em células MCF-7;
- Avaliar o efeito citotóxico e antimetastático do RF07 através da análise do raio do esferoide tumoral mamário produzido em células MCF-7.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Substâncias e reagentes

Neste estudo foram utilizadas as seguintes substâncias: meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); soro bovino fetal (SBF) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil); tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); N-acetilcisteína (NAC) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); dodecil sulfato de sódio (SDS) (Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil); doxorrubicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); iodeto de propídeo (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA); anexina V-FITC (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA); RNAse (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); cloreto de sódio (NaCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); cloreto de potássio (KCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); sulfato de sódio (Na_2SO_4) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); Hoechst 34580 (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, EUA) e cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′-

tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA).

4.2.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha); microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão); estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss®, Baden-Württemberg, Alemanha); microscópio AxioObserver A1 (Zeiss®, Baden-Württemberg, Alemanha); câmera fotográfica OverShot A2500 (Canon®, São Paulo, Brasil); citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson®, New Jersey, EUA); leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA); centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha); banho-maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil); geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil); incubadora de CO_2 MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão); autoclave vertical linha CS-A (Prismatec®, São Paulo, Brasil); estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil); balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil); cabine de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil) e agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.2.3 Amostra teste

A amostra teste RF07 foi cedida pelos professores Dr. Rodrigo Cunha (coordenador do Laboratório de Biologia Química, na Universidade Federal do ABC, em Santo André, São Paulo, Brasil) e Dr. João Marcelo Castro e Sousa (coordenador do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, na Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil).

A molécula foi sintetizada no Laboratório de Biologia Química da Universidade Federal do ABC, de acordo com a metodologia descrita por Zeni *et al.* (1999) e caracterizada por infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de 1H, 13C e 125 Te, e análise elementar (C, H, N).

4.2.4 Cultivo celular

Nos experimentos de citotoxicidade, foram utilizadas as linhagens celulares humanas MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e MCF-10A (linhagem celular mamária sadia), fornecidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e pelo Dr. João

Marcelo Castro e Sousa (Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil), respectivamente.

As células foram cultivadas no meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina-estreptomicina, e mantidas em estufa com 5% de CO_2, a 37 °C. O crescimento celular foi monitorado diariamente e ao atingirem 80% de confluência foi realizado procedimento para repique celular em fluxo laminar. As células aderentes foram desprendidas da superfície do frasco de cultura celular por meio da incubação com 2 mL da solução de tripsina 0,25%-EDTA, por 4 minutos. Após este período foi adicionado meio suplementado com SBF, na mesma proporção, para neutralizar sua ação. As células foram centrifugadas a 500 × g, por 5 minutos, em seguida o pellet foi ressuspendido em meio suplementado com SBF para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada usando o corante azul de tripan e a concentração celular foi ajustada para 1×10^5 células/mL.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Citotoxicidade celular pelo método do MTT

A investigação da citotoxicidade do RF07 foi realizada em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas, utilizando o ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). O MTT é um sal amarelo que atravessa as membranas celulares. Em células viáveis, ele é convertido em cristais roxos insolúveis de formazan, que podem ser quantificados espectrofotometricamente. A densidade óptica medida é proporcional ao número de células viáveis (Duarte *et al.*, 2022).

Para esse ensaio as células MCF-7 e MCF-10A foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF, com uma solução dos antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO_2. As células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/mL (MCF-7) ou 3×10^5células/mL (MCF-10A), com 100 µL por poço. Após 24 horas, foram adicionados 100 µL das soluções de RF07 (0,78-50 µM para a linhagem MCF-7; 1,5-100 µM para a linhagem MCF10-A) ou da droga padrão doxorrubicina (DXR, 0,31-20 µM), dissolvidos em DMSO (0,5%). No controle negativo foi utilizado apenas o veículo e meio de cultura. Após 72 horas de incubação, as placas foram centrifugadas (500 × g, 24 °C, 5 minutos), o

sobrenadante foi removido (110 µL), e a solução de MTT (5 mg/mL, 10 µL) foi adicionada, com incubação adicional por 4 horas (37 °C, 5% de CO_2). O formazan formado foi dissolvido com SDS (100 µL) (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram obtidas em um leitor de microplacas (λ = 570 nm) para calcular a concentração inibitória média (CI_{50}). Para cada linhagem celular foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da fórmula abaixo:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem não tumoral (MCF-10A)}}{CI_{50} \text{ da linhagem tumoral (MCF-7)}}$$

4.3.2 Investigação do efeito antitumoral *in vitro* do RF07 em células MCF-7

Para melhor caracterizar o efeito antitumoral *in vitro* do RF07, foram realizados alguns ensaios com este composto frente à linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, os quais serão descritos a seguir. Para todas as metodologias foram realizados três experimentos independentes, em triplicata ou duplicata.

4.3.2.1 Avaliação da interferência do RF07 sobre a progressão do ciclo celular

Para verificar a interferência do RF07 sobre a progressão do ciclo celular, as células MCF-7 foram marcadas com o fluoróforo iodeto de propídeo (IP) e analisadas por citometria de fluxo. O IP se intercala ao DNA e, portanto, a intensidade de fluorescência emitida pelo IP permite a quantificação do DNA das células em cada fase do ciclo celular: (1) **fase G0/G1** (Ploidia: 2n, diplóide; células que não estão em divisão); (2) **fase S** (Ploidia: >2n; células que iniciam o processo de duplicação do material genético); (3) **fase G2/M** (Ploidia: 4n; células com o DNA totalmente duplicado). Além disso, pode ocorrer a formação de uma população celular com quantidade de DNA inferior à G1 (<2n), chamado de **sub-G1** (Darzynkiewicz *et al.,* 2001; Páral *et al*., 2018).

Para este ensaio as células MCF-7 foram adicionadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e após 24h foram incubadas com o RF07 (3 ou 6 µM, correspondentes aos valores da CI_{50} e ao dobro da CI_{50}, respectivamente) e DXR (2 µM, correspondente a CI_{50}). Após 48 de incubação com os compostos, as células foram coletadas e centrifugadas (500 × g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS,

fixadas com etanol 70% previamente gelado, em agitador, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise as células foram recuperadas por centrifugação (400 × g, 10 min, 4 °C), lavadas com PBS e Triton X-100 (0,1%), e incubadas (no escuro, 25 °C, 30 minutos) com RNase (0,1 mg/mL) e IP (0,05 mg/mL). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, utilizando detectores de fluorescência vermelha (IP, 325/488 nm) e adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Foi determinado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular, bem como células subdiploides (sub-G1). Os dados foram obtidos com o software DIVA 6.0 (Sousa *et al.*, 2023; Ferreira *et al*., 2023).

4.3.2.2 Identificação do tipo de morte celular induzida pelo RF07

4.3.2.2.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo

Para a identificação do tipo de morte induzida pelo RF07 em células MCF-7 foi realizado o ensaio de marcação com anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e IP. A anexina V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina, um tipo de fosfolipídeo que se move para a superfície externa da membrana celular no início do processo de apoptose. Em contraste, o iodeto de propídio (IP) se liga diretamente ao DNA de células que possuem a membrana comprometida, permitindo diferenciar entre células que estão em apoptose inicial e tardia (Tan; Norhaizan, 2019).

Neste ensaio, as células foram adicionadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e após 24h foram tratadas com o RF07 (3 ou 6 µM) e DXR (2 µM), por 48 h. Após este período, as células foram coletadas por centrifugação (500 × *g*, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em tampão de ligação e incubadas com anexina V-FITC (temperatura ambiente, 10 minutos, no escuro). Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas (500 × *g*, 20 °C, 5 minutos), lavadas com o tampão de ligação e marcadas com IP (20 µg/mL). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra, usando detectores de fluorescência vermelha (IP, 325/488 nm) e verde (FITC, 493/525 nm). Os dados foram obtidos com o software DIVA 6.0 (Sousa *et al*., 2023).

4.3.2.2.2 Análise das alterações nucleares induzidas pelo RF07 utilizando a marcação com Hoechst e análise por microscopia confocal

As células MCF-7 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^{5} células/mL e após 24h foram tratadas com o RF07 (3 µM) por 48 h. Após este tempo, as células foram coletadas por centrifugação (500 × *g*, 20 °C, 5 minutos) e lavadas com PBS. Sequencialmente foram incubadas (15-20 minutos, em temperatura ambiente, no escuro) com 20 µL de Hoechst 34580 (10 µg/mL), uma sonda fluorescente permeável à membrana celular, que se liga ao DNA, emitindo coloração azul (Medeiros, 2018). As células coradas foram visualizadas em campos selecionados aleatoriamente sob um microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Hesse, Alemanha), com 2000x de magnificação, utilizando o laser de 405nm, e emissão na faixa de 410-600nm, o marcador foi utilizado para identificação das alterações nucleares em células apoptóticas, tais como condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Kabakov e Gabai, 2017). A fluorescência foi mensurada utilizando o software Image J

4.3.2.2.3 Análise do potencial de membrana mitocondrial utilizando a marcação com JC-1 e microscopia confocal

Para avaliar as alterações no potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o JC-1 (cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), um corante fluorescente catiônico lipofílico que alterna entre dois estados de emissão de fluorescência. Em células saudáveis o JC-1 se acumula e oligomeriza na matriz mitocondrial, emitindo fluorescência vermelha. Em contraste, quando há despolarização e consequente redução do potencial de membrana mitocondrial, tal como ocorre em células apoptóticas, o JC-1 se apresenta como monômero e emite fluorescência verde. Portanto, a perda do potencial da membrana mitocondrial é indicada pela mudança de fluorescência do vermelho para o verde (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019).

As células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^{5} células/mL e após 24h tratadas com o RF07 (3 ou 6 µM) por 48 h. Após este tempo, as células foram coletadas por centrifugação (500 × *g*, 20 °C, 5 minutos) e lavadas com PBS. Sequencialmente foram coradas com 20 µL de cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, 2,5 µM) por 15 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. O carbonil cianeto m-

clorofenilidrazona (CCCP, 50 µM) foi utilizado como controle positivo neste ensaio. As células coradas foram analisadas em um microscópio confocal de varredura a laser, com 2000x de magnificação, utilizando o laser de 488nm, e emissão nas faixas de 520-542 nm e 580-614 nm. A fluorescência foi mensurada utilizando o software Image J.

4.3.2.3 Investigação da ação do RF07 no estresse oxidativo: citotoxicidade na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Para investigar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no efeito citotóxico do RF07, as células MCF-7 foram pré-tratadas com N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante que atua neutralizando EROs, bem como sendo precursora para a síntese de glutationa (Marco; Foti; Corsico, 2022). O ensaio do MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do RF07 na ausência e presença de NAC. Para isto, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/mL. Após 24 h foram incubadas (3h) na presença ou ausência da NAC (10 mM). Decorrido este período, as células foram tratadas com RF07 (3 e 6 µM) e DXR (2 µM). Após 72 h o sobrenadante foi descartado (110 µL) e a solução de MTT (5 mg/mL, 10 µL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight* (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram obtidas em um leitor de microplacas (λ = 570 nm) para determinação da viabilidade celular (%) (Ferreira *et al.,* 2023).

4.3.2.4 Avaliação do efeito citotóxico do RF07 através da análise do esferoide tumoral

Os esferóides são o modelo tridimensional mais comum para estudar a biologia do câncer, pois conseguem replicar a estrutura, assim como as características moleculares e funcionais dos tumores encontrados no organismo (Hamilton; Rath, 2018). Nesse ensaio, foi utilizado o método de “hangingdrop”, ou gota invertida (Coelho, 2020). A suspensão celular de MCF-7 (6×10^4 células/mL) foi depositada em gotas (25 µL) na tampa de uma placa de petri descartável e estéril. Em seguida, a tampa foi invertida sobre a placa de petri permitindo o acúmulo de células na interface líquido/ar. Aguardou-se 3 dias para a formação do esferóide. Os esferóides formados foram transferidos para uma placa de 48 poços, um por poço, e a placa foi incubada por 40-60 minutos, à 37ºC e 5% de CO_2, com o objetivo de

garantir a adesão do esferoide à placa. Decorrido este período, adicionou-se 500 µLda solução contendo RF07 (3 e 6 µM) para o tratamento por 48h. Os esferoides foram fotografados em microscópio invertido com o programa ZEN 2 Pro (versão 2.0.0.0) nos tempos de 0 e 48h para avaliação do tamanho e raio de migração. Os dados foram analisados utilizando o software Image J.

4.3.3 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad*Software* Inc, San Diego, CA, EUA).

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). As concentrações inibitórias médias (CI_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos por análise de regressão não-linear.

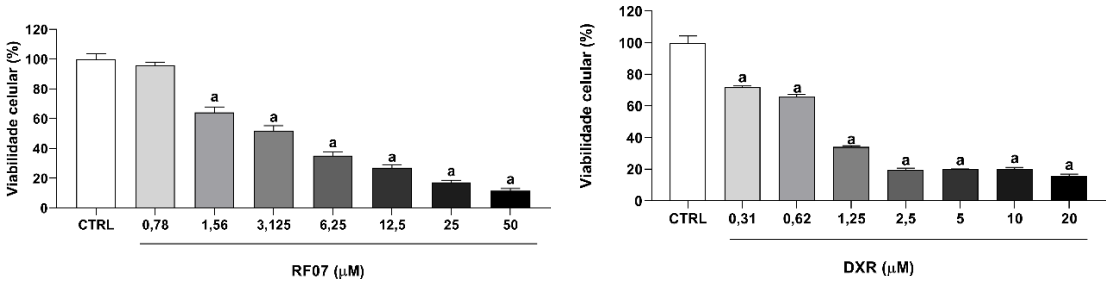
Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade do RF07 em linhagens de células tumoral e não tumoral humanas

No ensaio do MTT foi observado que o RF07 induziu citotoxicidade na linhagem celular de adenocarcinoma mamário (MCF-7) obtendo-se uma CI_{50} no valor de 3,3 ± 0,08 µM (Figura 14). Em relação à linhagem celular mamária sadia (MCF-10A) foi obtida uma CI_{50} de 21,16 ± 0,9 µM (Figura 15). Em adição, a droga padrão doxorrubicina (DXR) apresentou CI_{50} de 1,53 ± 0,20 µM e 0,68 ± 0,07 µM, para as linhagens MCF-7 (Figura 14) e MCF-10A (Figura 15), respectivamente, após 72 h de tratamento.

Figura 14. Citotoxicidade do RF07* e da DXR** em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), após 72h de tratamento



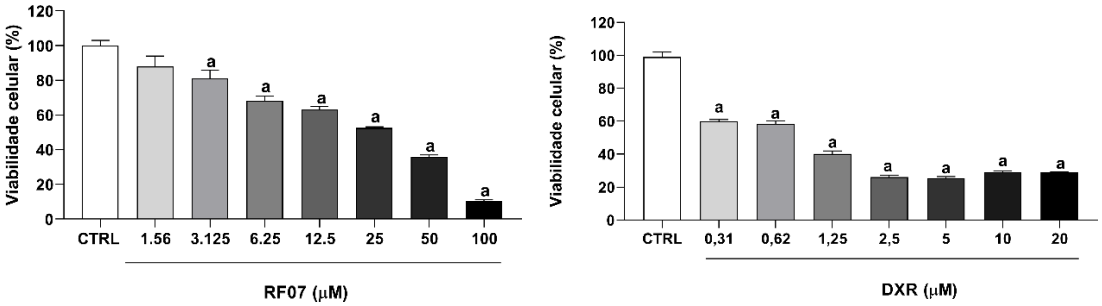
Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one*-way, seguido do teste de Tukey. “a” expressa diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).

** Doxorrubicina

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15. Citotoxicidade do RF07* e da DXR** em células mamárias sadias (MCF-10A), após 72h de tratamento



Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one*-way, seguido do teste de Tukey. “a” expressa diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
** Doxorrubicina
Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos valores de CI_{50} obtidos foi possível determinar o Índice de Seletividade (IS) do RF07 e DXR. A RF07 apresentou maior seletividade (IS: 6,41) para as células MCF-7 comparado a droga padrão doxorrubicina (IS: 0,44), conforme mostrado na Tabela 2. Esse resultado indica que a RF07 é citotóxica e apresenta seletividade para a linhagem tumoral testada, justificando a continuidade dos estudos para investigação da ação antitumoral deste composto na linhagem MCF-7.

Tabela 2. Citotoxicidade e índice de seletividade do RF07* e da DXR** em linhagens de células mamárias humanas, após 72h de tratamento

Linhagens celulares	**CI_{50} (μM)**		**IS**	
	RF07	**DXR**	**RF07**	**DXR**
MCF-7	3,3 ± 0,08	1,53 ± 0,20	6,41	0,44
MCF-10A	21,16 ± 0,9	0,68 ± 0,07		

MCF-7: Linhagem de adenocarcinoma mamário humano; MCF-10A: Linhagem de células mamárias sadias humana; CI_{50}: Concentração inibitória mínima; IS: Índice de seletividade (CI_{50} linhagem não tumoral/CI_{50} linhagem tumoral). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
** Doxorrubicina
Fonte: Elaborado pelo autor

Todos os resultados dos ensaios a seguir utilizaram o RF07 nas concentrações de 3 e 6 µM (correspondente aos valores da CI_{50} e ao dobro da CI_{50}, respectivamente) e a DXR na concentração de 2 µM (correspondente a CI_{50}).

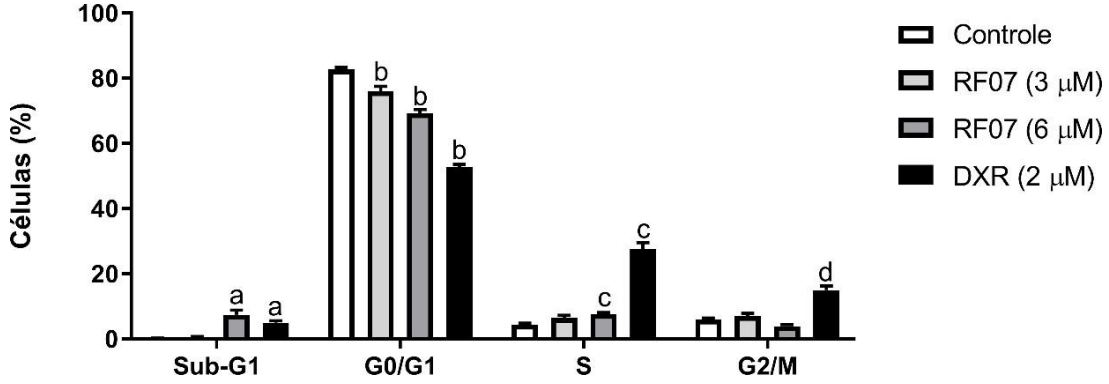
5.2 Investigação do efeito antitumoral *in vitro* do RF07 em células MCF-7

5.2.1 Interferência do RF07 na progressão do ciclo celular

Após 48 horas de tratamento com RF07 (3 e 6 µM), observou-se uma redução significativa no percentual de células na fase G0/G1 (3 µM: 75,93 ± 1,55%; 6 µM: 69,19 ± 1,16%, $p < 0,05$ para ambos) em comparação ao controle (82,60 ± 0,73%). Além disso, a concentração de 6 µM induziu um aumento significativo no percentual de células na fração sub-G1 (7,39 ± 1,41%, $p < 0,05$) e na fase S (7,57 ± 0,42%, $p < 0,05$), em relação aos seus respectivos controles (0,16 ± 0,22% e 4,36 ± 0,42%) (Figura 16).

O tratamento com DXR (2 µM) provocou um aumento significativo no percentual de células nas fases S (27,52 ± 2,04%, $p < 0,05$), G2/M (14,96 ± 1,27%, $p < 0,05$) e na fração sub-G1 (4,97 ± 0,58%, $p < 0,05$), quando comparado aos grupos controles (S: 4,36 ± 0,42%; G2/M: 5,98 ± 0,43%; sub-G1: 0,16 ± 0,22%). Também foi observado uma redução significativa no percentual de células na fase G0/G1 (52,67 ± 0,88%, $p < 0,05$) em comparação ao controle (82,60 ± 0,73%) (Figura 16).

Figura 16. Efeito do tratamento (48h) com RF07* (3 e 6 µM) e DXR** (2 µM) na distribuição das células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular



Percentual de células em cada fase do ciclo celular e no pico sub-G1. Os dados estão expressos como média ± EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata, analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way, seguido do teste de Tukey. **a:** Expressa diferença significativa quando comparado ao grupo controle Sub-G1; **b:** Expressa diferença significativa quando comparado ao grupo controle G0/G1, **c:** Expressa diferença significativa quando comparado ao grupo controle S; **d:** Expressa diferença significativa quando comparado ao grupo controle G2/M. $p < 0,05$.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
** Doxorrubicina
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Identificação do tipo de morte celular induzida pelo RF07

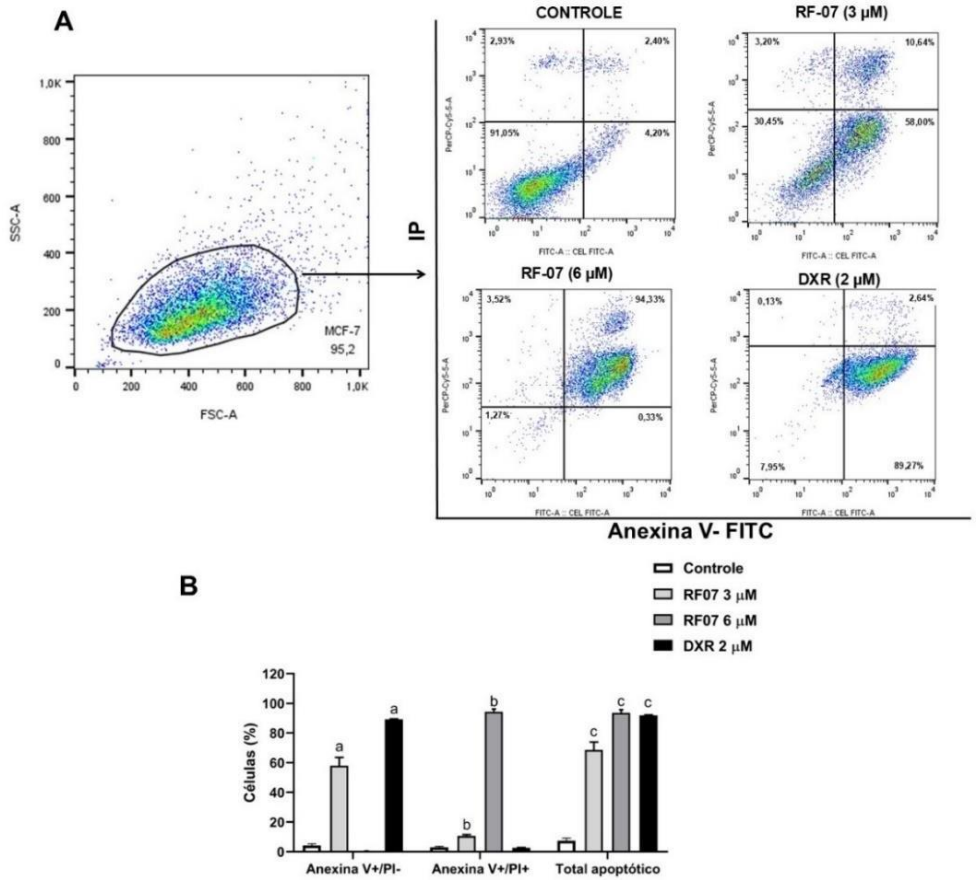
5.3.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo

A marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP) mostrou que o tratamento com RF07 induziu um aumento no percentual de células apoptóticas (Figura 17). Na concentração de 3 µM houve um aumento significativo (58 ± 5,5%, p<0,05) de células em apoptose inicial (anexina V-FITC+ /IP-) e tardia (anexina V-FITC+ /IP+) (10,64 ± 0,93%, p<0,05), quando comparado aos seus respectivos grupos controle (4,20 ± 1,12% e 2,93 ± 0,72%). Em contrapartida, na concentração de 6 µM houve um aumento significativo apenas no percentual de células em apoptose tardia/necrose (94,33 ± 1,92%, p<0,05) em relação ao controle (Figura 17).

Como evidenciado na figura 17, o RF07 aumentou significativamente o percentual de células apoptóticas (apoptose total) em ambas concentrações utilizadas (3 µM: 68,64 ± 5,26 %; 6 µM: 93,65 ± 2,07 %, p<0,05 para ambos), comparado ao grupo controle (7,46 ± 1,82 %, p<0,05).

A droga padrão doxorrubicina induziu um aumento significativo do número de células em apoptose inicial (89,27 ± 0,26 %, p < 0,05) e total (91,91 ± 0,38 %, p < 0,05), quando comparado ao controle (7,46 ± 1,82 %, p<0,05)(Figura 17).

Figura 17. Efeitos do tratamento (48h) com RF07* (3 e 6 µM) e DXR** (2 µM) na morte celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP)



(A) *Dotplots* representativos obtidos por meio da análise de citometria de fluxo. Os *dotplots* foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células viáveis (anexina V-FITC-/IP-, quadrante inferior esquerdo); células em apoptose inicial (anexina V-FITC+/IP-, quadrante inferior direito); células em apoptose tardia/necrose (anexina V-FITC+/IP+, quadrante superior direito) e células mortas (anexina V-FITC-/IP+, quadrante superior esquerdo). Um total de 10.000 eventos/amostra foram adquiridos usando detectores de fluorescência vermelha (IP, 325/488 nm) e de fluorescência verde (FITC, 493/525 nm). **(B)** Porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC e/ou IP. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way,* seguido pelo teste de Tukey. **a** indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle "anexina V-FITC+/IP-"; **b** indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle "anexina V-FITC+/IP+"; **c** indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle do "total apoptótico". $p < 0,05$.

* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).

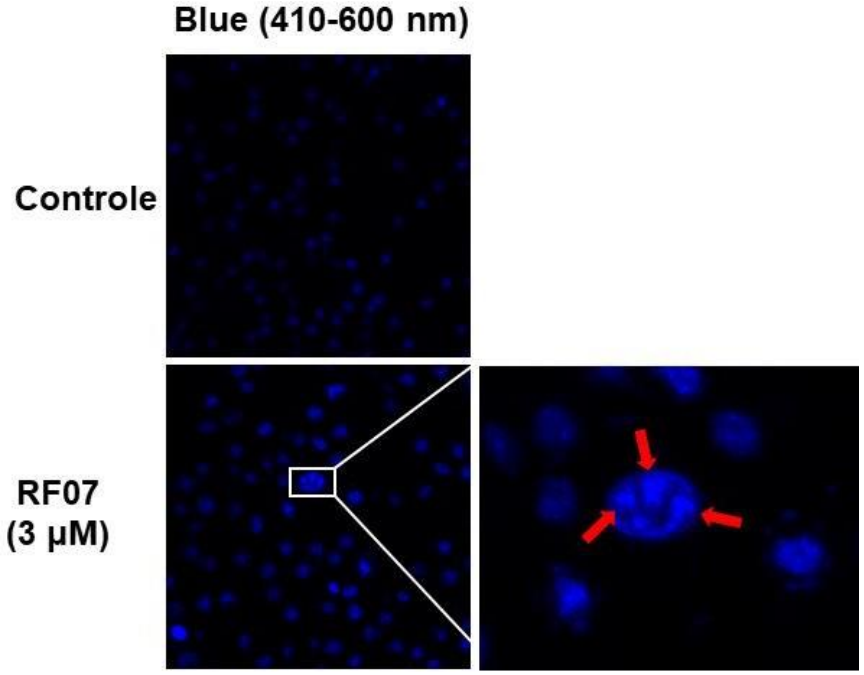
** Doxorrubicina

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Análise das alterações nucleares induzidas pelo RF07 utilizando a marcação com Hoechst e análise por microscopia confocal

Após a marcação com Hoechst foi observado que as células tratadas (48h) com RF07 (3 µM) exibiram intensa fluorescência azul, com um aumento na quantidade de núcleos contendo cromatina condensada e/ou fragmentada, ou seja, alterações nucleares características de células apoptóticas. Em contraste, o grupo controle apresentou células com núcleos levemente corados em azul e um aspecto homogêneo, indicando uma predominância de células com poucas alterações nucleares evidentes (Figura 18).

Figura 18. Imagens representativas da avaliação da morfologia nuclear de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas (48h) com RF07* (3 e 6 µM) e marcadas com Hoechst 34580

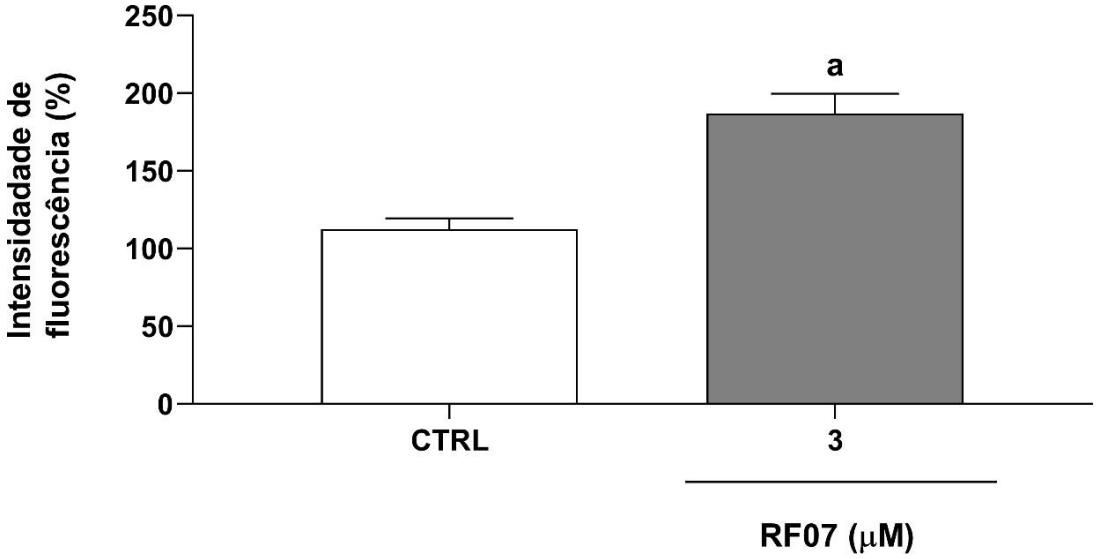


As células foram observadas por microscopia confocal a *laser*. O grupo controle apresentou células com núcleos levemente corados em azul e com estrutura intacta. As células tratadas com RF07 mostraram intensa fluorescência azul. Setas vermelhas indicam núcleos condensados ou fragmentados. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
Fonte: Elaborado pelo autor.

A intensidade da fluorescência das células tratadas com RF07 (3 µM) e marcadas com Hoechst foi quantificada e normalizada em relação à intensidade de fluorescência das células do grupo controle. Os resultados estão representados no gráfico da Figura 19. É possível observar que o grupo tratado com 3 µM de RF07

apresentou um aumento significativo no percentual de fluorescência, com uma média de 186,8 ± 12,84%, em comparação ao controle (112,5 ± 6,9%).

Figura 19. Intensidade de fluorescência (%) de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas (48h) com RF07* (3 e 6 µM) e marcadas com Hoechst 34580

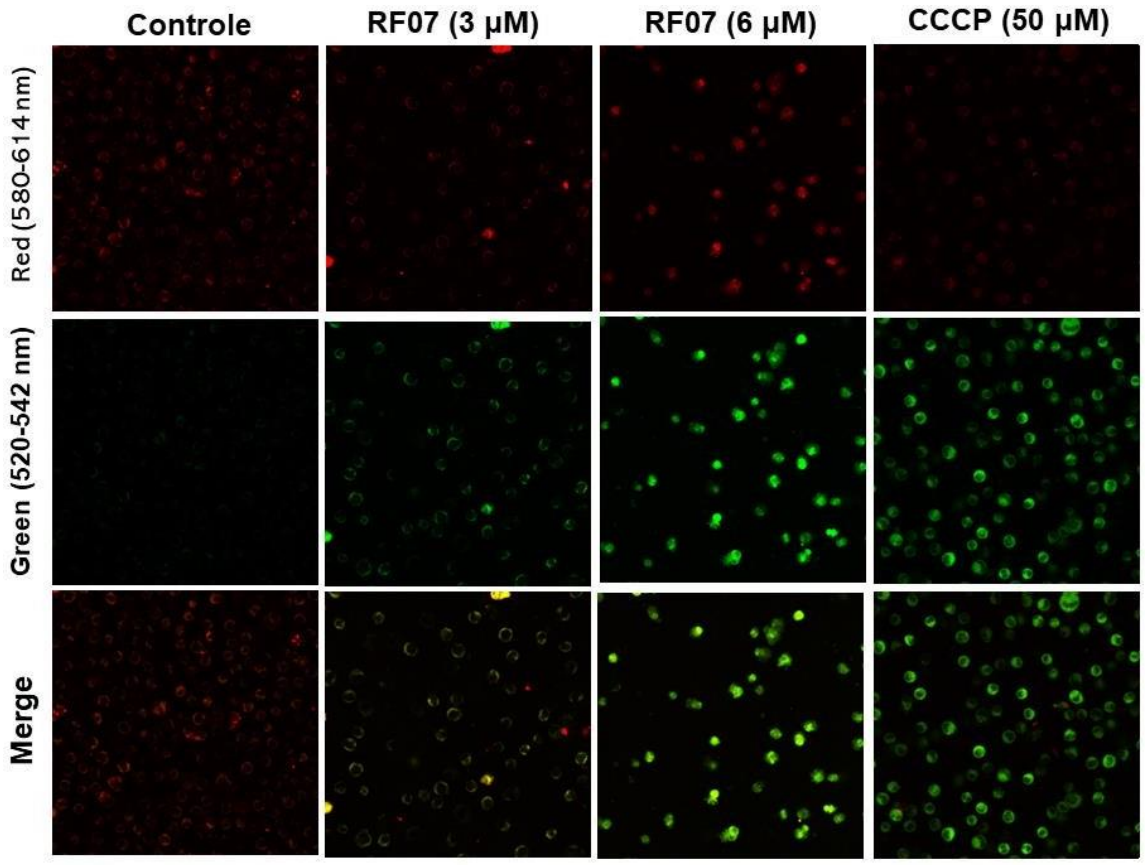


Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one*-way, seguido do teste de Tukey. **a** indica diferença significativa comparado ao controle. p <0,05.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Análise do potencial de membrana mitocondrial utilizando a marcação com JC-1 e microscopia confocal

A figura 20 apresenta imagens representativas das células MCF-7 após o tratamento (48 horas) com RF07 (3 µM e 6 µM) e CCP (50 µM). A marcação com JC-1 mostrou que houve um aumento na fluorescência de luz verde nos grupos tratados, em comparação com o grupo controle, que apresentou predominantemente células com a fluorescência de luz vermelha (Figura 20).

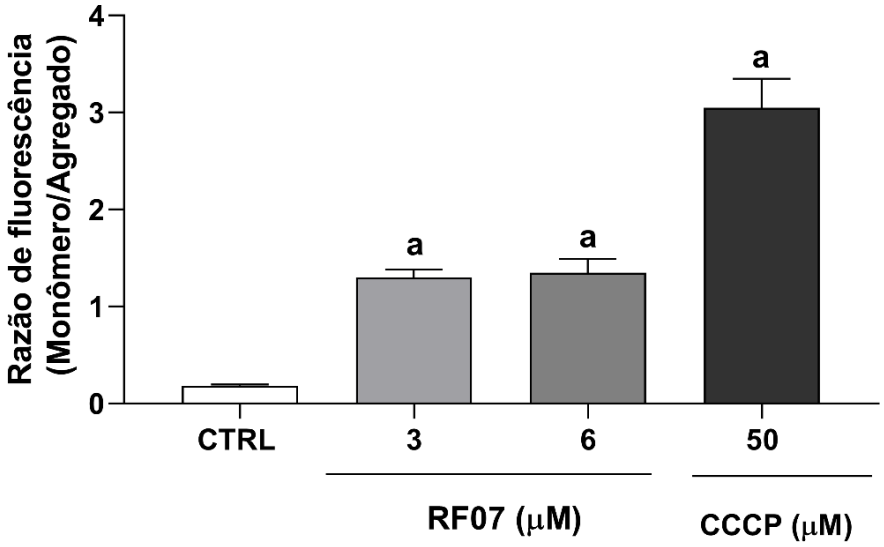
Figura 20. Imagens representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial por JC-1 em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas (48h) com RF07* (3 e 6 µM) e CCCP*** (50 µM)



As células foram observadas por microscopia confocal a *laser*. O grupo controle apresentou células com fluorescência vermelha, enquanto nos grupos tratados com o RF07 (3 e 6 µM) e com o controle positivo CCCP (50 µM) foi observado majoritariamente células com fluorescência verde, indicativo de perda do potencial de membrana mitocondrial. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata. *Merge*: indica a sobreposição das fluorescências verde e vermelha.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
*** Carbonil cianeto m-clorofenilidrazona
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados apresentados anteriormente foram quantificados e estão ilustrados na Figura 21. Observa-se um aumento na intensidade de fluorescência verde/vermelho (razão da fluorescência monômero/agregado de JC-1). Os grupos tratados com RF07 nas concentrações de 3 µM e 6 µM apresentaram médias de fluorescência de 1,29 ± 0,08 % e 1,35 ± 0,14 % respectivamente, valores significativamente superiores à média de fluorescência do controle negativo (0,18± 0,01). Como esperado, o controle positivo também induziu um aumento significativo na razão de fluorescência verde/vermelho (3,05± 0,30).

Figura 21. Razão da fluorescência verde/vermelha (monômero/agregado) de JC-1 em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas (48h) com RF07* (3 e 6 µM) e CCCP*** (50 µM)



Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one*-way, seguido do teste de Tukey. **a** indica diferença significativa quando comparado ao controle negativo. $p < 0,05$.

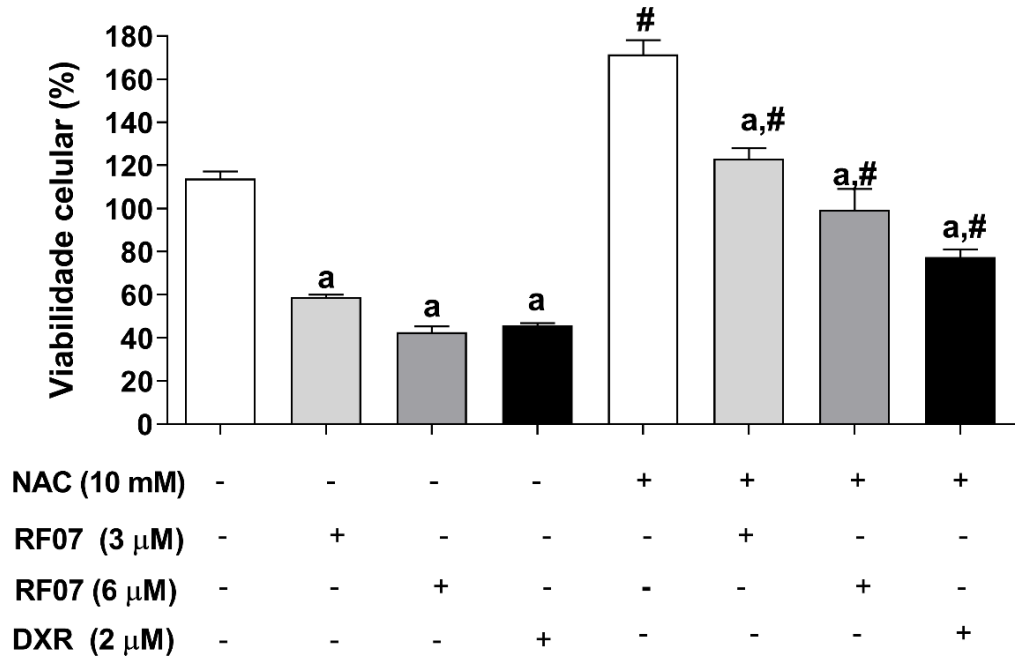
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
*** Carbonil cianeto m-clorofenilidrazona
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Investigação da ação do RF07 no estresse oxidativo: citotoxicidade na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Após 72 horas de tratamento com RF07 foi observado que na ausência de NAC este composto reduziu significativamente a viabilidade celular (3 µM: 58,86 ± 1,1%; 6 µM: 42,65 ± 2,8%; $p < 0,05$ para ambos), em comparação ao grupo controle (100 ± 3,37%) (Figura 22).

Como mostrado na Figura 22, o pré-tratamento com NAC (10 mM) por 3 horas preveniu o efeito citotóxico do RF07 (3 µM: 123,1 ± 5,1%; 6 µM: 99,4 ± 9,7%; $p < 0,05$ para ambos), indicando uma redução significativa da citotoxicidade em comparação com os grupos tratados com RF07 na ausência de NAC.

Figura 22. Citotoxicidade do RF07* (3 e 6 µM) e da DXR** (2 µM) na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC, 10 mM) após 72 h de tratamento



Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one*-way, seguido do teste de Tukey. **a** indica diferença significativa quando comparado ao respectivo controle na ausência ou na presença de NAC; # indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo na ausência de NAC. $p < 0,05$.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
** Doxorrubicina
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o grupo tratado com DXR (2 µM) na ausência de NAC houve uma redução significativa na viabilidade celular (45,80 ± 1,1%; $p < 0,05$), em relação ao grupo controle. Como esperado, o efeito citotóxico da DXR foi significativamente reduzido na presença de NAC (77,51 ± 3,5%; $p < 0,05$), em comparação com o grupo tratado com DXR na ausência de NAC (Figura 22).

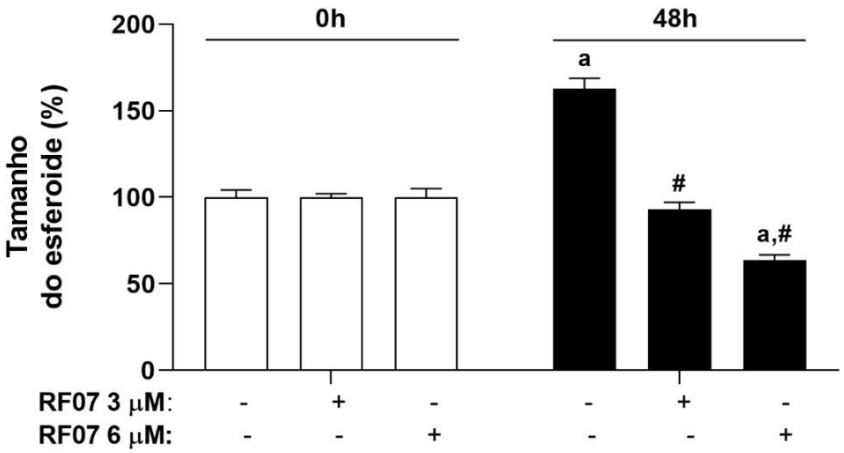
5.5 Avaliação do efeito citotóxico do RF07 através da análise do esferoide tumoral

5.5.1 RF07 reduziu o tamanho do esferoide

A avaliação da área do esferoide tumoral mostrou uma redução significativa no tamanho dos esferoides após 48 horas de tratamento com RF07 (3 µM: 284,7 ± 14,7 µ%; 6 µM: 199,6 ± 9,7 %; $p < 0,05$ para ambos), comparado ao grupo controle

(455,0 ± 16,7 %). Adicionalmente, foi observado uma redução significativa no tamanho dos esferoides ao longo do tempo de incubação com RF07 na concentração de 6 µM (tamanho dos esferoides em 0 horas: 313,5 ± 17,4 %; tamanho dos esferoides em 48 horas: 199,6 ± 9,7 %; p < 0,05). em relação ao grupo controle (tamanho dos esferoides em 0 horas: 279,5 ± 12,2 %; tamanho dos esferoides em 48 horas: 455,0 ± 16,7 %) (Figura 23 e 25).

Figura 23. Efeito do tratamento (0 e 48h) com RF07* (3 e 6 µM) sobre o tamanho dos esferoides de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7

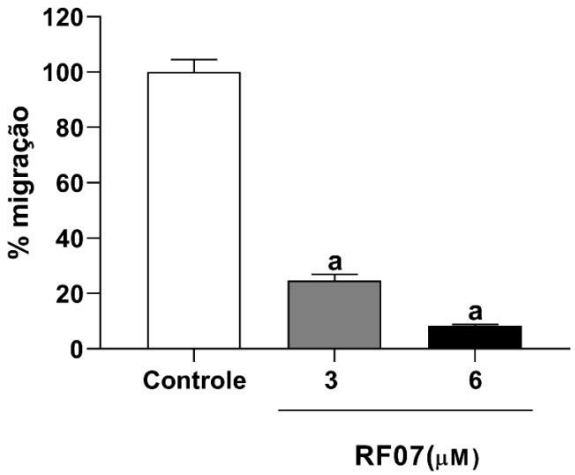


Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de Tukey. **a** indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo no tempo de 0h; # indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle no tempo de 48h. $p < 0,05$.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.2 RF07 reduziu a migração celular ao redor dos esferoides

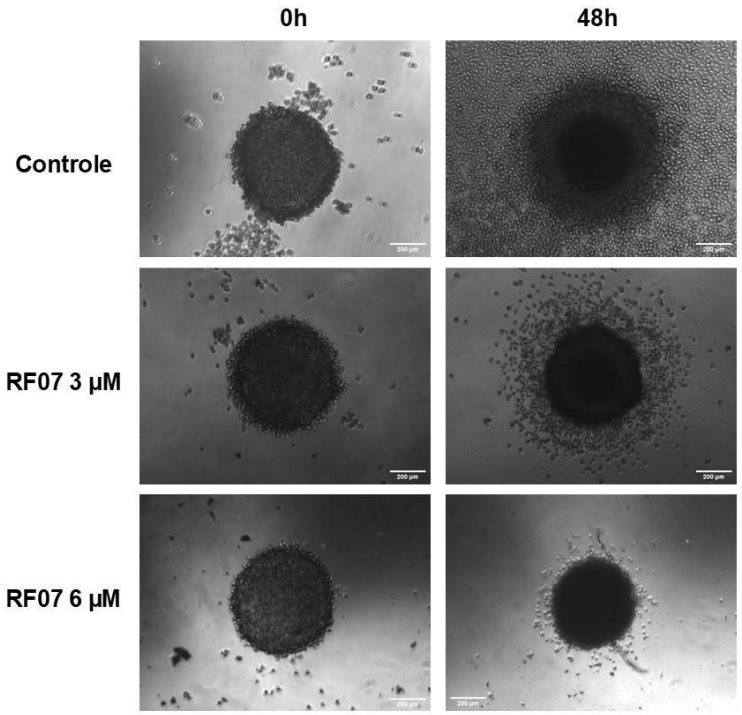
Também foi avaliada a migração celular ao redor dos esferoides após 48 horas de exposição ao RF07 (3 e 6 µM). Os resultados mostraram uma redução significativa da migração celular nos esferoides tratados (3 µM: 207,5 ± 19,64 %; 6 µM: 69,94 ± 4,30 %; p < 0,05 para ambos) em comparação com o grupo controle (841,3 ± 37,85 %) (Figura 24 e 25).

Figura 24. Redução da migração celular ao redor dos esferoides de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 48h de exposição ao RF07* (3 e 6 µM)



Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one*-way, seguido do teste de Tukey. **a** indica diferença significativa quando comparado ao controle. $p < 0,05$.
* (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25. Imagens representativas do efeito citotóxico do tratamento (0 e 48h) com RF07* (3 e 6 µM) no tamanho e na migração celular dos esferoides de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7



Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama (CM) é uma doença causada pela multiplicação descontrolada de células da mama (Santos *et al.,* 2022), constituindo o câncer com maior incidência entre as mulheres no Brasil e no mundo (INCA, 2022; Organização Mundial da Saúde, 2021). De acordo com suas características moleculares o CM pode ser classificado em quatro subtipos: luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2-); luminal B (ER+ e/ou PR+, HER2- e Ki67>14%); receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, HER2+ (ER-, PR-, HER2+) e Triplo Negativo (ER-, PR-, HER2-) (Bevers *et al*., 2023).

As modalidades de tratamento do CM incluem a cirurgia e terapias locais ou sistêmicas, das quais a quimioterapia é a principal forma de tratamento (Wu *et al*., 2023). Entretanto esta apresenta diversas limitações, como toxicidade sistêmica, taxa de resposta insatisfatória e/ou resistência aos quimioterápicos (Xie, Chen e Fang, 2020), tornando necessário a busca por novos agentes que proporcionem melhores resultados terapêuticos (Li *et al.,* 2020).

As organoteluranas são compostos que possuem pelo menos uma ligação covalente com o telúrio (Silberman *et al.,* 2016) e que se ligam à diferentes alvos, originando compostos com atividades biológicas relevantes (Carmely *et al.,* 2009), incluindo ação antitumoral (Sailer *et al.*, 2004; Hayun *et al.*, 2009; Tanini *et al.*, 2019; Paschoalin *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, o presente estudo propôs aprofundar a investigação da citotoxicidade e dos efeitos antitumorais *in vitro* da RF07 ((4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2-il}fenil Metil Éter), uma nova organotelurana que previamente mostrou-se promissora contra linhagens de câncer de mama (Nascimento *et al.,* 2023)

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foi selecionada para realizar estes estudos. Essa linhagem pertence ao subtipo molecular luminal A, que é ER+ e PR+ (Gunduz; Gunduz; Shirazi, 2011) e é utilizada mundialmente nas pesquisas de potenciais fármacos antitumorais (Comşa;Cîmpean; Raica, 2015; Amini *et al*., 2021). Inicialmente, o efeito citotóxico do RF07 foi avaliado por meio do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)- 2,5-difenil tetrazólio (MTT), um método colorimétrico amplamente utilizado para inferir a citotoxicidade de novos compostos (Ghasemi *et al.,* 2023). A doxorrubicina (DXR), uma antraciclina isolada da espécie *Streptomyces peucetius* var. caesius, foi

escolhida como droga padrão dos ensaios por já ser empregada na clínica para o tratamento do CM (Rawat *et al*., 2021).

Como resultado, o RF07 apresentou significativa citotoxicidade (CI_{50}: 3,3 ± 0,08 µM) contra a linhagem MCF-7. Os resultados do estudo de Nascimento e colaboradores (2023) corroboram essas descobertas, demonstrando que a substância RF07 mostrou atividade antiproliferativa nas linhagens tumorais MCF-7 e CT26.Wt (células de carcinoma de cólon).

Outras organoteluranas também demonstraram citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens celulares. Por exemplo, o estudo de Sailer *et al.* (2004) evidenciou que as organoteluranas 2,2'-dimetoxidifenil ditelureto e 2,2'-diamino-3,3',5,5'-tetrametildifenil ditelureto, nas concentrações de 1 a 5 µM, exibiram citotoxicidade na linhagem celular de leucemia promielocítica aguda humana (HL-60). De maneira similar, o estudo de Santos *et al*. (2009) mostrou que a organotelurana 2-(butil telúrio) furano foi citotóxica para eritrócitos humanos nas concentrações de 4, 8, 50, 75 e 100 µM.

O desenvolvimento de terapias seletivas para células tumorais é essencial para minimizar a toxicidade associada ao tratamento (Saleh *et al*., 2023), já que os quimioterápicos induzem danos não apenas às células tumorais, mas também às células saudáveis que se proliferam rapidamente (Muhamad; Plengsuriyakarn; Na-Bangchang, 2018). Isso pode levar a efeitos adversos significativos (Blagosklonny, 2023), como perda de cabelo, náuseas, vômitos, diminuição da fertilidade e mielossupressão (Asqarov; Bekmirzaeva; Usmanova, 2023). Diante disso, a avaliação da citotoxicidade do RF07 em células de mama humano sadias (MCF-10A) permitiu a obtenção do índice de seletividade, parâmetro que permite inferir se o composto é mais seletivo para as células tumorais em comparação às não tumorais, sendo considerado promissor quando o valor for igual ou superior a 2 (Oliveira *et al.,* 2015; Pilon *et al.,* 2020; Duarte *et al.,* 2022).

A substância RF07 demonstrou uma seletividade seis vezes maior para a linhagem tumoral MCF-7 (IS: 6,41), em comparação com a linhagem sadia MCF-10A, indicando que a RF07 exerce um efeito citotóxico *in vitro* mais seletivo para a linhagem de adenocarcinoma mamário humano. Ainda, esses dados mostram que a seletividade obtida no presente estudo foi superior à observada por Nascimento e colaboradores (2023), que relataram um IS de 1,91 e 1,02, para as linhagens tumorais mamárias MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente.

Em contrapartida, a droga padrão doxorrubicina, amplamente utilizada no tratamento do CM (Anampa; Makower; Sparano, 2015), não foi seletiva, apresentando um índice de seletividade inferior a um (IS: 0,44). Tais resultados justificam os efeitos adversos dos quimioterápicos já utilizados nos pacientes em tratamento do câncer (Moustafa *et al*., 2023) e impulsionam a busca por novas drogas que causem menos efeitos adversos (Malyarenko *et al*., 2023).

Na próxima etapa deste estudo buscou-se elucidar as prováveis ações antitumorais do RF07 envolvidas na citotoxicidade de MCF-7. Para isto, seus efeitos antitumorais *in vitro* foram avaliados no período de 48 horas, utilizando-se o valor aproximado da CI_{50} (3 µM), que representa o efeito citotóxico máximo, e o dobro da CI_{50} (6 µM).

Primeiramente foi investigado a interferência deste composto no ciclo celular, considerando a premissa de que os inibidores ciclo-específicos têm sido alternativas promissoras na terapia do câncer de mama (Piezzo *et al*., 2020; Ray *et al*., 2019). O tratamento com o RF07 (6 µM) causou um aumento significativo no percentual de células na fase S do ciclo celular e em sub-G1. A população sub-G1 caracteriza-se por células que apresentam menor conteúdo de DNA devido à fragmentação do material genético (Chainumnim *et al*., 2022), o que é característico de células apoptóticas (Zhang *et al*., 2023). Portanto, os dados obtidos sugerem que o RF07 possivelmente induz a apoptose nestas células. Ademais, a fase S do ciclo celular é caracterizado pela síntese e replicação do material genético (Rasli *et al.,* 2023), portanto, o aumento de células nessa fase pode ser justificado pela parada do ciclo no ponto de verificação intra-fase S, o qual interrompe o inicio da replicação e o alongamento do DNA (Seiler *et al*., 2007). Existem substâncias, como os análogos de nucleosídeos, que agem incorporando-se ao DNA durante a replicação e, portanto, têm como alvos mais específicos as células na fase S. Quando estes compostos se ligam ao DNA das células podem ativar a verificação da fase S, impedindo a progressão do ciclo celular (Shi *et al.*, 2001). Com esse resultado podemos inferir que o RF07 interfere no ciclo celular.

A literatura relata a atividade de outras organoteluranas no ciclo celular. Shaaban e colaboradores (2014) mostraram que uma organotelurana era capaz de causar um atraso na divisão celular, inferido a partir do aumento de células na fase G0/G1 e uma redução em G2/M, na linhagem MCF-7. A orgatelurana AS101 induziu parada do ciclo celular em G2/M em células Jukart (Frei *et al*., 2007), resultado que

também foi observado para o mesmo composto em co-cultura de células estromais da medula óssea de camundongos MS-5 e 5T33MM (Hayun *et al*., 2009).

Baseado no aumento do percentual de células em sub-G1, que como mencionado anteriormente é um resultado preliminar sugestivo de apoptose, o objetivo da próxima etapa deste estudo foi investigar o efeito do RF07 neste processo.

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada com características morfológicas próprias, tais como o encolhimento celular, a condensação da cromatina e a fragmentação em pequenos corpos apoptóticos. Além disso, existem outros tipos de morte celular que podem ser avaliadas na pesquisa por novas drogas, a exemplo da necrose, piroptose, necroptose e autofagia (Park *et al.,* 2023; Tkachenko, 2023). No câncer, porém, as células habitualmente apresentam resistência à apoptose (Sun; Zhao, 2021; Hanahan, 2022), portanto, a indução deste tipo de morte celular tem sido um dos vários alvos farmacológicos de interesse para o tratamento do câncer (Mirzayans, 2024).

Para a investigação da morte celular foram realizados ensaios complementares, empregando diferentes fluoróforos e/ou marcadores celulares, que foram avaliados por citometria de fluxo e microscopia confocal. A análise por citometria de fluxo, após a marcação celular com anexina V-FITC e IP, mostrou que o tratamento com o RF07 aumentou o percentual de células apoptóticas (apoptose inicial + tardia/necrose) em ambas as concentrações (3 e 6 µM). Nascimento (2023) também investigou o tipo de morte induzida pelo RF07 na linhagem MCF-7, marcando as células com laranja de acridina/ iodeto de propídio e analisando a morfologia por microscopia confocal de fluorescência. Os autores observaram que o RF07 induziu a apoptose nesta linhagem. Adicionalmente eles avaliaram a morte celular em MDA-MB-231 e MCF-10A, utilizando os marcadores anexina V PE e 7-AAD por citometria de fluxo, e relataram que o RF07 também causou a apoptose nas duas linhagens celulares. Além disso, em outro trabalho o RF07 casou a apoptose em cultura primária de sarcoma murino (Nascimento *et al*., 2021). Por fim, estudos com diferentes organoteluranas demonstraram que essa classe de compostos atua por este mecanismo antitumoral (Sailer *et al*., 2004; Vij; Hardej, 2012; Shakibaie *et al*., 2018).

Para corroborar os resultados anteriormente obtidos, as células de MCF-7 foram coradas com Hoechst 34580 (tricloridrato de N,N-Dimetil-4-[5-(4-metil-1-

piperazinil)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-il]benzenamina), um corante que se intercala ao DNA e emite fluorescência azul, permitindo distinguir algumas das alterações nucleares ocorridas durante o processo apoptótico (Kabakov; Gabai, 2017). As análises morfológicas por microscopia confocal de fluorescência evidenciaram que as células MCF-7 após o tratamento com RF07 (3 µM) apresentaram encolhimento celular, condensação e fragmentação de cromatina, características de células apoptóticas. Nascimento e colaboradores (2021) observaram alterações nucleares induzidas pelo RF07 em cultura primária de sarcoma murino. Ademais, outras organoteluranas induziram fragmentação nuclear em células V79 (fibroblasto do pulmão de um hamster) (Trindade, 2015) e de leucemia promielocítica aguda humana (HL-60) (Abondanza *et al*., 2008).

A perda do potencial transmembrana mitocondrial é um evento que ocorre nas mitocôndrias e está envolvido com a abertura do poro de permeabilidade mitocondrial e consequente liberação de fatores apoptogênicos, os quais ativam as vias de sinalização intracelular responsáveis pela apoptose (Zorova *et al.,* 2018). Nesta perspectiva, na próxima etapa deste estudo as células tratadas com RF07 foram marcadas com JC-1 (5,5,6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimi-dazoilcarbocianina iodeto), um corante catiônico lipofílico que permite inferir as alterações do potencial de membrana mitocondrial. Quando as células estão saudáveis o corante penetra na mitocôndria e se acumula formando agregados com fluorescência vermelha, entretanto, em células apoptóticas o JC-1 entra na mitocôndria em menor quantidade e não consegue formar agregados, apresentando monômeros que emitem fluorescência verde. Portanto, a razão de fluorescência monômeros/agregados do JC-1 na mitocôndria pode ser utilizada como um parâmetro na avaliação direta do estado de polarização mitocondrial (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019).

O RF07 (3 e 6 µM) aumentou a razão da intensidade de fluorescência verde em função da fluorescência vermelha (monômeros/agregados), sugerindo que este composto interfere no estado de polarização da mitocôndria. Além disso, a perda do potencial de membrana mitocondrial pode estar relacionada com a ativação da via mitocondrial da apoptose, como já é relatado na literatura (HUANG *et al*., 2019). Este resultado corrobora com os estudos anteriores de Nascimento (2023), que demonstraram que o RF07 induz a apoptose em células da linhagem MDA-MB-231 por via intrínseca mitocondrial, regulando positivamente a expressão de caspases

específicas desta via e atuando na instabilidade mitocondrial. Já é relatado que outras organoteluranas promovem alterações mitocondriais em diferentes linhagens tumorais (Puntel *et al.*, 2013; Trindade *et al.*, 2019; Siqueira *et al*., 2023).

Prosseguindo com a elucidação dos efeitos antitumorais do RF07, foi investigado o seu papel no estresse oxidativo celular. As espécies reativas de oxigênio (EROs) agem como moléculas sinalizadoras e participam de várias vias de sinalização intracelular fundamentais para a manutenção da homeostase celular (Hancock; Veal, 2020). Geralmente, as células cancerígenas apresentam níveis basais mais altos de EROs em comparação às células sadias (Yang; Chen; Shi, 2019). No câncer de mama as EROs atuam como transdutores de sinais para ativar processos que mantêm a carcinogênese, como a proliferação, angiogênese, migração e invasão celular (Liu *et al*., 2023). Entretanto, aumentos adicionais nos níveis destas espécies causam danos a proteínas, DNA, lipídios e organelas celulares, induzindo a célula à morte (Nakamura; Takada, 2021). Nessa perspectiva, o câncer de mama pode ser tratado com agentes farmacológicos que induzem a formação de EROs à níveis elevados, levando a célula tumoral ao estresse oxidativo e consequente morte celular (Souza *et al*., 2024). A doxorrubicina, metotrexato e a cisplatina são exemplos de agentes farmacológicos que atuam induzindo estresse oxidativo e são utilizados na prática para tratar o câncer de mama (Sinha; Tokar; Bushel, 2020).

O efeito de RF07 no estresse oxidativo foi avaliado pelo ensaio do MTT, realizado na presença e na ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (Sahasrabudhe; Terluk; Kartha, 2023; Ferreira et al., 2023). O pré-tratamento com NAC reduziu significativamente a citotoxicidade induzida pelo RF07, permitindo inferir que existe o envolvimento de EROs no efeito antitumoral produzido por este composto.

A ação oxidativa das organoteluranas é uma das mais explanadas e pode estar relacionada com a capacidade que essas substâncias possuem de reduzir a atividade das enzimas antioxidantes δ-ALA-D, glutationa-redutase, glutationa-S-transferase e peróxido dismutase (Trindade, 2015; Capperucci *et al.*, 2021). Além disso, as organoteluranas também produzem espécies reativas de oxigênio (Du *et al*. 2014; Petreni *et al*., 2022), exibindo mecanismos oxidativos pela diminuição de glutationa uma vez que os grupamentos tióis desses compostos interagem com essa enzima (Frei *et al.*, 2007; Vij; Hardej, 2012; Vij; Hardej, 2016).

Os efeitos do RF07 também foram avaliados no modelo experimental de esferoides. Os esferoides representam o modelo tridimensional mais utilizado para investigar a biologia do câncer, uma vez que conseguem simular a arquitetura do microambiente tumoral, bem como as características moleculares e funcionais do tumor *in vivo* (Froehlich *et al*., 2016; Hamilton; Rath, 2018).

A formação de esferoides pode ocorrer por meio de diferentes técnicas, divididas em duas categorias: esferoides produzidos sobre ou incorporados em substratos (*scaffold-based*) e esferoides gerados sem qualquer substrato de suporte (*scaffold-free*) (Coelho, 2020). Na técnica *scaffold-based* os esferoides são cultivados no topo ou embebidos dentro de uma matriz extracelular sintética ou natural, como por exemplo, polímeros de hidrogéis e metilcelulose (Xu *et al*., 2016). Na outra categoria (*scaffold-free*) essas estruturas são formadas espontaneamente, pois as células são colocadas em condições que não favorecem a aderência no substrato, resultando na adesão célula-célula (Weiswald, Bellet; Dangles-Marie, 2015). Nessa última categoria existem três métodos para a formação dos esferoides: *liquid overlay*, *suspension culture* e *hanging drop method* (Froehlich *et al*., 2016). A técnica de *hanging drop* envolve a utilização de gotas suspensas contendo meio nutritivo e células para a produção de esferoides, com a ação gravitacional facilitando a sua formação (Timmins *et al*., 2005).

As células MCF-7 possuem a capacidade de gerar agregados 3D multicelulares que podem levar a formação de esferoides. Os esferiodes formados por essa linhagem celular são descritos como uma massa de células com núcleo desorganizado, que possuem ligações célula-célula mediada pela proteína E-caderina (Comşa; Cîmpean; Raica, 2015). Assim, estes modelos têm sido utilizados em diferentes linhas de pesquisa que visam o entendimento da biologia do câncer de mama, a análise de potenciais drogas antitumorais, bem como o estudo da migração e invasão celular (Coelho, 2020; Klein; Distel; Neuhuber, 2021).

Os esferoides formados com células MCF-7 foram produzidos utilizando a técnica de *hanging drop* e classificados como *scaffold-free*. Após a formação, foram tratados com RF07 (3 e 6 µM), por 48 horas. Foi observado uma redução significativa no tamanho e no raio de migração dos esferoides após o tratamento, sugerindo que o RF07 exerce efeitos citotóxicos sobre os esferoides, diminuindo o seu tamanho. Além disso, a significativa redução na migração celular ao redor dos esferoides demonstra potencial em inibir a migração celular.

As organoteluranas RF 13 e RF13S, que possui similaridade na estrutura química com a RF07, promoveu a inibição da migração, angiogênese e das catepsinas (proteínas envolvidas com a invasão e metástase) em células de melanoma murino (B16F10 e B16F10-Nex2) (Paschoalin *et al.*, 2019). Adicionalmente, as organoteluranas RF13 e RF13S inibiram a migração de células de melanoma humano SK-MEL-28 e SK-MEL-147 (Martens, 2017).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a citotoxicidade da organotelurana RF07 e elucidam alguns dos efeitos antitumorais *in vitro* exercidos em células de adenocarcinoma mamário humano. Estas descobertas encorajam outros estudos para elucidação dos mecanismos de ação deste composto, que apresenta potencial para a seleção de novos candidatos à fármacos antitumorais.

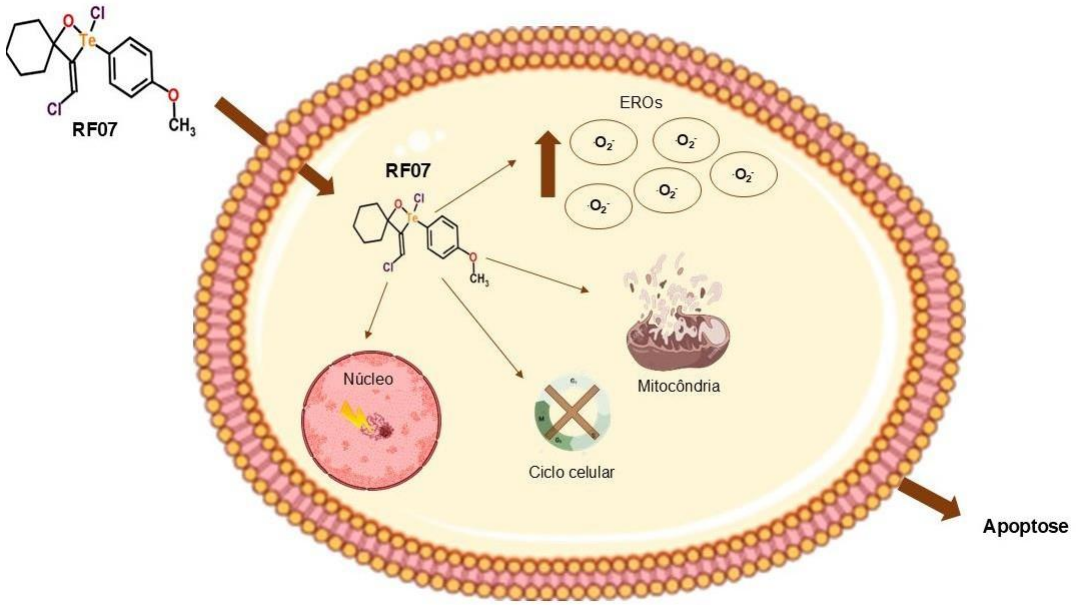
Conclusão

7. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a organotelurana RF07 demonstrou citotoxicidade contra a linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, mostrando-se mais seletiva para esta linhagem em comparação com a linhagem celular mamária não tumoral MCF-10A. Em adição, o RF07 demonstrou uma notável capacidade citotóxica no modelo experimental de esferoides, evidenciada pela redução no tamanho e na migração dos mesmos.

Os efeitos antitumorais do RF07 estão associados à: I) interferência no ciclo celular, evidenciado pela parada de células na fase S; II) atividade oxidante da substância, que eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) para promover a morte celular; II) ativação da apoptose, possivelmente através da via intrínseca mitocondrial.

Figura 26. Efeitos da RF07 em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.



A organotelurana RF07 ((4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-(λαμβδα)4-teluraspiro [3.5]non-2- il}fenil Metil Éter) induz citotoxicidade em células de adenocarcinoma mamário humano, MCF-7. Este efeito está associado à alterações no ciclo celular, exemplificado pela parada das células na fase S. Ainda, a RF07 atua por meio do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da apoptose, levando à morte celular. Sugere-se que a apoptose seja ativada pela via intrínseca, já que este composto induziu alterações no potencial de membrana mitocondrial.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Referências

REFERÊNCIAS

ABLE, J. Y. S.; CAMPOS, D. C.; ANDRADE, B. Y. G.; BÁO, S. N.; FARIAS, L. R. Tratamento com metformina em células de Câncer de Mama e sua influência na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 20432-20441, 11 out. 2022. South Florida Publishing LLC. http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv5n5-212.

ACCONCIA, F.; BARNES, C. J.; KUMAR, R. Estrogen and Tamoxifen Induce Cytoskeletal Remodeling and Migration in Endometrial Cancer Cells. **Endocrinology**, [S.L.], v. 147, n. 3, p. 1203-1212, 1 mar. 2006. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-1293.

ACCONCIA, F.; MARINO, M. Synergism between Genomic and Non Genomic Estrogen Action Mechanisms. **Iubmb Life**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 145-150, mar. 2003. Wiley. http://dx.doi.org/10.1080/1521654031000110172.

AGRAWAL, A.; AYANTUNDE, A. A.; RAMPAUL, R.; ROBERTSON, J. F. R. Male breast cancer: a review of clinical management. **Breast Cancer Research And Treatment**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 11-21, 11 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10549-006-9356-z.

AMINI, P.; KESHTKAR, A.; BAKHTIARI, M.; SADEGHI, A.; KHALEDI, P.; VAHID, S.; YEGANEH, M.; BAHRAMI, D. O resveratrol induz a apoptose e atenua a proliferação de células MCF-7 em combinação com radiação e hipertermia. **Current Molecular Medicine,** v. 21, n. 2, p. 142-150, 2021.

ANAMPA, J.; MAKOWER, D.; SPARANO, J. A. Progresso na quimioterapia adjuvante para câncer de mama: uma visão geral. **BMC Medicine**, v. 13, p. 195, 2015. DOI: 10.1186/s12916-015-0439-8.

ANDERSON, E. O papel dos receptores de estrogênio e progesterona no desenvolvimento mamário humano e na tumorigênese. **Pesquisa sobre câncer de mama: BCR**, v. 4, n. 5, p. 197-201, 2002.

ANDERSSON, T. M. L.; ENGHOLM, G.; BRINK, A. L.; PUKKALA, E.; STENBECK, M.; TRYGGVADOTTIR, L.; WEIDERPASS, E.; STORM, H. Tackling the tobacco epidemic in the Nordic countries and lower cancer incidence by 1/5 in a 30-year period—The effect of envisaged scenarios changing smoking prevalence. **European Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 103, p. 288-298, nov. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.031.

ANESTIS, A.; ZOI, I.; PAPAVASSILIOU, A. G.; KARAMOUZIS, M. V.. Androgen Receptor in Breast Cancer—Clinical and Preclinical Research Insights. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 358, 15 jan. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules25020358.

APETOH, L.; LADOIRE, S.; COUKOS, G.; GHIRINGHELLI, F.. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure?. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 1813-1823, set. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv209.

ARONSON, K. J.; MILLER, A. B.; WOOLCOTT, C. G.; STERNS, E. E.; MCCREADY, D. R.; LICKLEY, L. A.; FISH, E. B.; HIRAKI, G. Y.; HOLLOWAY, C.; ROSS, T.; HANNA, W. M.; SENGUPTA, S. K.; WEBER, J. P. Breast adipose tissue

concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. 1, p. 55–63, jan. 2000. Disponível em: PMID: 10667464.

ASAVASUPREECHAR, T.; SAITO, R.; MIKI, Y.; EDWARDS, D. P.; BOONYARATANAKORNKIT, V.; SASANO, H. Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 199, p. 105599, maio 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105599.

ASAVASUPREECHAR, T.; SAITO, R.; MIKI, Y.; EDWARDS, D. P.; BOONYARATANAKORNKIT, V.; SASANO, H. Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 199, p. 105599, maio 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105599.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 125, n. 2, p. 487-489, 2 fev. 2015. American Society for Clinical Investigation. http://dx.doi.org/10.1172/jci80420.

ASHLEY, R. L.; CLAY, C. M.; FARMERIE, T. A.; NISWENDER, G. D.; NETT, T. M.. Cloning and Characterization of an Ovine Intracellular Seven Transmembrane Receptor for Progesterone that Mediates Calcium Mobilization. **Endocrinology**, [S.L.], v. 147, n. 9, p. 4151-4159, 1 set. 2006. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-0002.

ASMA, S. T.; ACAROZ, U.; IMRE, K.; MORAR, A.; SHAH, S. R. A.; HUSSAIN, S. Z.; ARSLAN-ACAROZ, D.; DEMIRBAS, H.; HAJRULAI-MUSLIU, Z.; ISTANBULLUGIL, F. R. Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. **Cancers**, [S.L.], v. 14, n. 24, p. 6203, 15 dez. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cancers14246203.

ASQAROV, A. N.; BEKMIRZAEVA, N. B.; USMANOVA, Z. U. MAIN SIDE Effects Of Antitumor Chemotherapy. **Int. J. Med. Sci. Clin. Res.**, v. 3, n. 3, p. 107-109, 2023.

AVERILL-BATES, D. A. The antioxidant glutathione. **Vitamins And Hormones**, [S.L.], p. 109-141, 2023. Elsevier. http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002.

BA, L. A.; DÖRING, M.; JAMIER, V.; JACOB, C. Tellurium: an element with great biological potency and potential. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S.L.], v. 8, n. 19, p. 4203, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). http://dx.doi.org/10.1039/c0ob00086h.

BAIRD, L.; YAMAMOTO, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 40, n. 13, p. 9-20, 15 jun. 2020. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00099-20.sa

BAUDINO, T. Targeted Cancer Therapy: the next generation of cancer treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 3-20, 22 jul. 2015. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/1570163812666150602144310.

BEGAM, A. J.; JUBIE, S.; NANJAN, M.J. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: a critical review. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 71, p. 257-274, abr. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.011.

BEN-DROR, J.; SHALAMOV, M.; SONNENBLICK, A. The History of Early Breast Cancer Treatment. **Genes**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 960, 27 maio 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/genes13060960.

BENUSIGLIO, P. R; MALKA, D.; ROULEAU, E.; PAUW, A.; BUECHER, B.; NOGUÈS, C.; FOURME, E.; COLAS, C.; COULET, F.; WARCOIN, M. CDH1germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. **Journal Of Medical Genetics**, [S.L.], v. 50, n. 7, p. 486-489, 25 maio 2013. BMJ. http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101472.

BERETTA, G. L.; GATTI, L.; PEREGO, P.; ZAFFARONI, N.. Camptothecin Resistance in Cancer: insights into the molecular mechanisms of a dna-damaging drug. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 20, n. 12, p. 1541-1565, 1 mar. 2013. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/0929867311320120006.

BEVERS, T. B.; THD, S.; AUMAN, J. M.; KINGSLEY, K.; HAZELRIGG, D. A.; BERG, W. A.; SMITH, M. A.; DOOLEY, W. C.; YOUNG, R. J.; RAO, P. R. NCCN Guidelines® Insights: Breast Cancer Screening and Diagnosis, Version 1.2023: Featured Updates to the NCCN Guidelines. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 21, n. 9, p. 900–909, 1 set. 2023.

BHAN, A. Análise comparativa de técnicas de pré-processamento para aprimoramento de imagens de mamografia. In: Anais do INCON VIII 2013: Conferência Internacional sobre Pesquisa Contínua em Gestão e TI, Pune, Índia,11–13 jan. 2013.

BHUSHAN, A.; GONSALVES, A.; MENON, J. U. Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 723, 14 maio 2021. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13050723.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 833-842, 1 abr. 2005. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0486.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 833-842, 1 abr. 2005. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0486.

BLAGOSKLONNY, M. V. Selective protection of normal cells from chemotherapy, while killing drug-resistant cancer cells. **Oncotarget**, v. 14, p. 193, 2023.

BLUM, J. L.; FLYNN, P. J.; YOTHERS, G.; ASMAR, L.; GEYER, C. E.; JACOBS, S.A.; ROBERT, N. J.; HOPKINS, J. O.; O'SHAUGHNESSY, J. A.; DANG, Chau T. Anthracyclines in Early Breast Cancer: the abc trials∴usor 06-090, nsabp b-46-i/usor 07132, and nsabp b-49 (nrg oncology). **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 35, n. 23, p. 2647-2655, 10 ago. 2017. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.2016.71.4147.

BONACHO, T.; RODRIGUES, F.; LIBERAL, J. Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. **Biotechnic & Histochemistry**, [S.L.], v. 95, n. 2, p. 71-91, 10 set. 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/10520295.2019.1651901.

BORGES, V. C.; NOGUEIRA, C. W.; RODRIGUES, C. A.; CARRILHO, E.; SILVA, T. S.; CALMON, M. F.; REIS, R. M.; SILVA, L. M.; SOUZA, C. J.; FERREIRA, M. A.; SILVA, G. G.; VILELA, F. C. Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. **Food and Chemical Toxicology,** v. 45, n. 8, p. 1453-1458, 2007.

BOYAGES, J. Radiation therapy and early breast cancer: current controversies. **Medical Journal Of Australia**, [S.L.], v. 207, n. 5, p. 216-222, set. 2017. Wiley. http://dx.doi.org/10.5694/mja16.01020.

BRANDES, A. A.; BARTOLOTTI, M.; TOSONI, A.; FRANCESCHI, E. Nitrosoureas in the Management of Malignant Gliomas. **Current Neurology And Neuroscience Reports**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 2-13, 11 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s11910-015-0611-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Câncer de mama: saiba como reconhecer os 5 sinais de alerta. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/prevencao-ao-cancer/cancer-de-mama-saiba-como-reconhecer-os-5-sinais-de-alerta. Acesso em: 3 ago. 2024.

BREE, E.; ASKOXYLAKIS, J.; GIANNIKAKI, E.; CHRONIARIS, N.; SANIDAS, E.; TSIFTSIS, D. D. Secretory carcinoma of the male breast. **Annals Of Surgical Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 663-667, ago. 2002. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/bf02574482.

BRINKMANN, K.; NG, A. P.; GRAAF, C. A.; STRASSER, A. What can we learn from mice lacking pro-survival BCL-2 proteins to advance BH3 mimetic drugs for cancer therapy? **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 1079-1093, 6 abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41418-022-00987-0.

CABODI, S.; MORO, L.; BAJ, G.; SMERIGLIO, M.; STEFANO, P.; GIPPONE, S.; SURICO, N.; SILENGO, L.; TURCO, E.; TARONE, G. P130Cas interacts with estrogen receptor α and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], v. 117, n. 8, p. 1603-1611, 15 mar. 2004. The Company of Biologists. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01025.

CAHILL, M. A.. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 105, n. 1-5, p. 16-36, jun. 2007. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.02.002.

CAMPBELL, K. J.; TAIT, S. W. G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. **Open Biology**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 180002, maio 2018. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rsob.180002.

CAMPOS, M. S. B.; FEITOSA, R. H. F.; MIZZACI, C. C.; VON FLACH, M. R. T.; SIQUEIRA, B. J. M.; EDUARDOMASTROCOLA, L. Os Benefícios dos Exercícios Físicos no Câncer de Mama. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 119, n.

6, p. 981-990, 2022. Sociedade Brasileira de Cardiologia. http://dx.doi.org/10.36660/abc.20220086.

CANTINI, L.; TRAPANI, D.; GUIDI, L.; BIELO, L. B.; SCAFETTA, R.; KOZIEJ, M.; VIDAL, L.; SAINI, K. S.; CURIGLIANO, G. Neoadjuvant therapy in hormone Receptor-Positive/HER2-Negative breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, [S.L.], v. 123, p. 102669, fev. 2024. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102669.

CAO, L.; NIU, Y. Triple negative breast cancer: special histological types and emerging therapeutic methods. **Cancer Biology And Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 293-306, 2020. China Anti-cancer Association. http://dx.doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0465.

CAO, W.; LI, J.; HAO, Q.; VADGAMA, J. V; W., Y. AMP-activated protein kinase: a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 21-29, 21 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s13058-019-1107-2.

CAPPERUCCI, A.; CORONNELLO, M.; SALVINI, F.; TANINI, D.; DEI, S.; TEODORI, E.; GIOVANNELLI, L. Synthesis of functionalised organochalcogenides and in vitro evaluation of their antioxidant activity. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 110, p. 104812, maio 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104812.

CARDOSO, F.; KYRIAKIDES, S.; OHNO, S.; PENAULT-LLORCA, F.; POORTMANS, P.; RUBIO, I.T.; ZACKRISSON, S.; SENKUS, E.. Early breast cancer: esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 30, n. 8, p. 1194-1220, ago. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz173.

CARDOSO, F.; SENKUS, E.; COSTA, A.; PAPADOPOULOS, E.; AAPRO, M.; ANDRÉ, F.; HARBECK, N.; LOPEZ, B. Aguilar; BARRIOS, C.H.; BERGH, J.. 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 29, n. 8, p. 1634-1657, ago. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdy192.

CARMELY, A.; MEIROW, D.; PERETZ, A.; ALBECK, M.; BARTOOV, B.; SREDNI, B.. Protective effect of the immunomodulator AS101 against cyclophosphamide-induced testicular damage in mice. **Human Reproduction**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 1322-1329, 24 fev. 2009. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den481.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 395-417, 23 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 395-417, 23 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y.

CAULFIELD, S. E.; DAVIS, C. C.; BYERS, K. F. Olaparib: a novel therapy for metastatic breast cancer in patients with a BRCA1/2 mutation. **J. Adv. Pract. Oncol.**, v. 10, n. 2, p. 167, 2019.

CHAINUMNIM, S.; SAENKHAM, A.; DOLSOPHON, K.; CHAINOK, K.; SUKSAMRARN, S.; TANECHPONGTAMB, W. Stem Extract from Momordica cochinchinensis Induces Apoptosis in Chemoresistant Human Prostate Cancer Cells (PC-3). **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 1313, 15 fev. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules27041313.

CHAKRABORTY, B.; BYEMERWA, J.; KREBS, T.; LIM, F.; CHANG, C-Y.; MCDONNELL, D. P. Estrogen Receptor Signaling in the Immune System. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 117-141, 16 jun. 2022. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/endrev/bnac017.

CHAN, Y-T.; LAI, A. C.-Y.; LIN, R-J.; WANG, Y-H.; WANG, Y-T.; CHANG, W-W.; WU, H.-Y.; LIN, Y-J.; CHANG, W-Y.; WU, J-C.. GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 146, n. 6, p. 1674-1685, 7 ago. 2019. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.32588.

CHATTERJEE, R.; CHATTERJEE, J. ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness. **European Journal Of Cell Biology**, [S.L.], v. 99, n. 2-3, p. 151073, abr. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151073.

CHEN, W. Y. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 573-585, ago. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2008.08.001.

CHIN, K.; YAMAMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; KADOWAKI, S.; KUBOTA, Y.; AMANUMA, Y.; OKADA, M.; KANDA, M.; KIMURA, Y.; NOGI, Y. Effectiveness of taxanes following nivolumab in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective chart review of patients in attraction-3. **Esophagus**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 302-308, 23 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10388-022-00972-z.

CHINZEI, N.; TADA, M.; KOJIMA, K.; KIMURA, Y.; TSUBOTA, A.; NAKAMURA, T.; MATSUMURA, K.; KUBO, M.; INOUE, K.; TAKEDA, S.; KATADA, T.; NISHIDA, H. P21 deficiency delays regeneration of skeletal muscular tissue. **PloS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125765, 2015. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125765. Acesso em: 7 ago. 2024.

CHLEBOWSKI, R. T.; MANSON, J. E. Menopausal Hormone Therapy and Breast Cancer. **The Cancer Journal**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 169-175, maio 2022. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/ppo.0000000000000601.

CHO, H-S.; MASON, K.; RAMYAR, K. X.; STANLEY, A. M.; GABELLI, S. B.; DENNEY, D. W.; LEAHY, D. J. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. **Nature**, [S.L.], v. 421, n. 6924, p. 756-760, fev. 2003. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nature01392.

CHONG, L.; SANKAVARAM, K.; FREEKE, H.C. LIV-1 regula a captação de zinco e a expressão de E-caderina (CDH1) em células de câncer de mama MDAMB-231, mas não influencia o SNAI1. **FASEB Journal**, v. 25, p. 979-2, 2011.

CLARK, G. M.; OSBORNE, C. K.; MCGUIRE, W. L. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 1102-1109, out. 1984. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.1984.2.10.1102.

CLUSAN, L.; FERRIÈRE, F.; FLOURIOT, G.; PAKDEL, F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 6834, 6 abr. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076834.

COELHO, L. L. **Utilização de esferoides tumorais mamários para o estudo in vitro do potencial metastático e de resposta terapêutica**. 2020. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, jun. 2015

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, jun. 2015. PMID: 26026074.

CORT, A.; OZBEN, T.; MELCHIORRE, M.; CHATGILIALOGLU, C.; FERRERI, C.; SANSONE, A.. Effects of bleomycin and antioxidants on the fatty acid profile of testicular cancer cell membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 1858, n. 2, p. 434-441, fev. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.005.

CORTESI, L.; RUGO, H. S.; JACKISCH, C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. **Targeted Oncology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 255-282, 12 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s11523-021-00796-4

COSTA, A. C. da. **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S NOS TUMORES GÁSTRICOS E SUA CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI**. 2021. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Cirurgia, Centro de Ciências de Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/40553/1/TESE%20Adriano%20Carneiro%20da%20Costa.pdf. Acesso em: 22 ago. 2024.

COSTA, M. D.; COSTA, M. D.; ERICEIRA, M. S.; LIMA, W. W.; REIS, L. M.; MELO, J. M. D.; SILVA, J. I.; SILVA, C. M. L.; VASCONCELOS, C. A. L.; ALVES, G. M. L. CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA MORTALIDADE POR NEOPLASIAS MALIGNAS DE MAMA NO BRASIL PERÍODO DE 2019 A 2023. **Brazilian Journal Of Implantology And Health Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 2384-2397, 26 abr. 2024. Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences. http://dx.doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n4p2384-2397.

CUNHA, R. L. O. R.; GOUVÊA, I. E.; FEITOSA, G. P. V.; ALVES, M. F. M.; BROMME, D.; COMASSETO, J. V.; TERSARIOL, I. L. S.; JULIANO, L**. Biol. Chem**., v. 390, p. 1205-1212, 2009.

CUNHA, R. L. O.; GOUVEA, I. E.; JULIANO, L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 393-407, 2009.

CZABOTAR, P. E..; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 49-63, 20 dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nrm3722.

DARDIK, R.; LIVNAT, T.; HALPERT, G.; JAWAD, S.; NISGAV, Y.; AZAR-AVIVI, S.; LIU, B.; NUSSENBLATT, R. B.; WEINBERGER, D.; SREDNI, B. **Molecular Vision**, v. 22, p. 548-562, 2016.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BEDNER, E.; SMOLEWSKI, P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Seminars In Hematology**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 179-193, abr. 2001. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90051-4.

DELI, T.; OROSZ, M.; JAKAB, A. Hormone Replacement Therapy in Cancer Survivors – Review of the Literature. **Pathology & Oncology Research**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 63-78, 8 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12253-018-00569-x.

DI MARCO, F.;FOTI, G.; CORSICO, A. Where are we with the use of N-acetylcysteine as a preventive and adjuvant treatment for COVID-19?. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 26, n. 2, p. 715-721, 2022.

DIAS, C. R.; FLOTÉ, L. M.; VALEJO, F. A. M. OS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NEOPLASIA MALIGNA DE MAMA: revisão integrativa. **Colloquium Vitae**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 49-61, 27 jun. 2022. Associacao Prudentina de Educacao e Cultura (APEC). http://dx.doi.org/10.5747/cv.2021.v13.n3.v341.

DU, P.; SAIDU, N. E. B.; INTEMANN, J.; JACOB, C.; MONTENARH, M. A new tellurium-containing amphiphilic molecule induces apoptosis in HCT116 colon cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 1840, n. 6, p. 1808-1816, jun. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.003.

DUARTE, R. A. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcalóides isolados de Pterogyne nitens**. 2010. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas À Farmácia., Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara - Sp, 2010. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e4163689-a0be-457d-9fc2-7939b5e75dc6/content. Acesso em: 22 ago. 2024.

DUARTE, S.S.; SILVA, D.K.F.; LISBOA, T.M.H.; GOUVEIA, R.G.; ANDRADE, C.C.N.; SOUSA, V.M.; FERREIRA, R.C.; MOURA, R.O.; GOMES, J.N.S.; SILVA, P.M. AZEVEDO, F.L.A.A.; KEESEN, T.S.L.; GONÇALVES, J.C.R.; BATISTA, L.M. SOBRAL, M.V. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. **Pharmacol. Rep**., v. 74, p. 545-554, 2022.

DUNN, J. D.; ALVAREZ, L. A.; ZHANG, X.; SOLDATI, T. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis. **Redox Biology**, [S.L.], v. 6, p. 472-485, dez. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005.

EDWARDS, D. P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. **Annual Review Of Physiology**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 335-376, 17 mar. 2005. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120151.

EMENS, L. A. Breast Cancer Immunotherapy: facts and hopes. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 511-520, 31 jan. 2018. American Association for Cancer Research (AACR). http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-3001.

FARIA, J.; NEGALHA, G.; AZEVEDO, A.; MARTEL, F. Metformin and Breast Cancer: molecular targets. **Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 111-123, 22 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10911-019-09429-z.

FEMAMA. Federação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Apoio à Saúde das Mamas. Tipos de câncer de mama. Publicado em: 30 dez. 2023. Disponível em: https://www.femama.org.br/site/br/noticia/tipos-de-cancer-de-mama. Acesso em: 3 ago. 2024.

FENG, Y.; SPEZIA, M.; HUANG, S.; YUAN, C.; ZENG, Z.; ZHANG, L.; JI, X.; LIU, W.; HUANG, B.; LUO, W. Breast cancer development and progression: risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 77-106, jun. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001.

FERNÁNDEZ-LÁZARO, D.; SANZ, B.; SECO-CALVO, J. Mechanisms of programmed cell death: structural and functional pathways. a narrative review. **Investigación Clínica**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 230-252, 22 maio 2024. Universidad del Zulia. http://dx.doi.org/10.54817/ic.v65n2a09.

FERREIRA, R. C.; DUARTE, S. S.; SOUSA, V. M.; SOUZA, R. R. M.; MARQUES, K. K. G.; ABRANTES, R. A.; NASCIMENTO, Y. M.; SOUSA, N. F.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L. The Essential Oil from Conyza bonariensis (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF-κB, and PKB/AKT Signaling Pathways. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 16, n. 11, p. 1553, 2 nov. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ph16111553.

FERREIRA, R. C.; NASCIMENTO, Y. M.; LOUREIRO, P. B. A.; MARTINS, R. X.; MAIA, M. E. S.; FARIAS, D. F.; TAVARES, J. F.; GONÇALVES, J. C. R.; SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V. Chemical Composition, In Vitro Antitumor Effect, and Toxicity in Zebrafish of the Essential Oil from Conyza bonariensis (L.) Cronquist (Asteraceae). **Biomolecules**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1439, 24 set. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/biom13101439.

FERRO, A. P. **Influência da fotobiomodulação em células mesenquimais multipotentes de tecido adiposo in vitro e fibroblastos de pacientes portadores de anemia falciforme**. 2024. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisioterapia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17152/tde-12062024-132637/publico/AnaPaulaFerro.pdf. Acesso em: 22 ago. 2024.

FIGUEIREDO, M. C.; RISSETTO, N. G.; TANAKA, R. T.; DOMBROSKI, V.; CERVINI, R.; PONT, G. C.; CENTA, A. Mecanismos de resistência ao T-DM1 em pacientes com câncer de mama HER2 positivos: uma revisão sistemática. **Conjecturas**, [S.L.], v. 22, n. 13, p. 307-322, 24 set. 2022. Uniao Atlantica de Pesquisadores. http://dx.doi.org/10.53660/conj-1671-2g14b.

FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 3-23, 10 maio 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/2211738507666190122111224.

FITZMAURICE, C.; ALLEN, C.; BARBER, R. M.; BARREGARD, L.; BHUTTA, Z. A.; BRENNER, H.; DICKER, D. l. J.; CHIMED-ORCHIR, O.; DANDONA, R. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **Jama Oncology**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 524, 1 abr. 2017. American Medical Association (AMA). http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688.

FONSECA, M. M.; LAMB, L. R.; VERMA, R.; OGUNKINLE, O.; SEELY, J. M. Breast pain and cancer: should we continue to work-up isolated breast pain?. **Breast Cancer Research And Treatment**, [S.L.], v. 177, n. 3, p. 619-627, 15 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10549-019-05354-1.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 20, n. 9, p. 689-709, 30 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1.

FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 3, n. 3, p. e00149, jun. 2015. DOI: 10.1002/prp2.149. Disponível em: https://doi.org/10.1002/prp2.149. Acesso em: 6 ago. 2024. Erratum em: **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 7, n. 6, p. e00549, dez. 2019. DOI: 10.1002/prp2.549. PMID: 26171228; PMCID: PMC4492765.

FRASOR, J.; DANES, J. M.; KOMM, B.; CHANG, K. C. N.; LYTTLE, C. R.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Profiling of Estrogen Up- and Down-Regulated Gene Expression in Human Breast Cancer Cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. **Endocrinology**, [S.L.], v. 144, n. 10, p. 4562-4574, 1 out. 2003. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0567.

FREI, G. M.; LEBENTHAL, I.; ALBECK, M.; ALBECK, A.; SREDNI, B. Neutral and positively charged thiols synergize the effect of the immunomodulator AS101 as a growth inhibitor of Jurkat cells, by increasing its uptake. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 712-722, set. 2007. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.011.

FRIEDMAN, M.; BAYER, I.; LETKO, I.; DUVDEVANI, R.; ZAVARO-LEVY, O.; RON, B.; ALBECK, M.; SREDNI, B. **Dermatology,** v. 160, p. 403-408, 2009.

FROEHLICH, K.; HAEGER, J-D.; HEGER, J.; PASTUSCHEK, J.; PHOTINI, S. M.; YAN, Y.; LUPP, A.; PFARRER, C.; MROWKA, R.; SCHLEUßNER, E. Generation of

Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: comparison of different protocols. **Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia**, [S.L.], v. 21, n. 3-4, p. 89-98, 12 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2.

FUENTES-ANTRÁS, J.; BEDARD, P. L.; CESCÓN, D. W. Seize the engine: emerging cell cycle targets in breast cancer. **Clinical and Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. e1544, jan. 2024. doi: 10.1002/ctm2.1544. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ctm2.1544.

GALIMBERTI, V. E.; ROTHLIN, C. V.; GHOSH, S. Funerals and feasts: The immunological rites of cell death. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 4, p. 663–674, 2019.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; AGOSTINIS, P.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; AMELIO, I.; ANDREWS, D. W. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 486-541, 23 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; AGOSTINIS, P.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; AMELIO, I.; ANDREWS, D. W. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 486-541, 23 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4.

GALMARINI, D.; GALMARINI, C. M.; GALMARINI, F. C. Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 181-199, nov. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.03.002.

GAO, J. J.; SWAIN, S. M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: a review. **The Oncologist**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 556-565, 22 fev. 2018. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535.

GAY, B. M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W.; WENDLER, P.; MACEDO, A.; DOS SANTOS, A. A. **Journal of Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 467-475, 2010.

GHASEMI, M.; MAHMOODI, N.; KHADEMI, M.; KHEIRANDISH, M.; RAZAVI, S. M.; MOGHADDAM, A.; AZAD, N. O ensaio MTT: um método para minimização de erros e interpretação na medição de citotoxicidade e estimativa de viabilidade celular. In: WANG, X.; ZHANG, J. (orgs.). **Ensaios de viabilidade celular: métodos e protocolos**. Nova York, NY: Springer US, 2023. p. 15-33

GIANNI, L.; PIENKOWSKI, T.; IM, Y-H.; TSENG, L-M.; LIU, M-C.; LLUCH, A.; STAROSŁAWSKA, E.; LAHABA-RODRIGUEZ, J. IM, S-A.; PEDRINI, J. L. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 791-800, jun. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(16)00163-7.

GLAVIANO, A.; FOO, A. S. C.; LAM, H. Y.; YAP, K. C. H.; JACOT, W.; JONES, R. H.; ENG, H.; NAIR, M. G.; MAKVANDI, P.; GEOERGER, B.; KULKE, M. H.; BAIRD, R. D.; PRABHU, J. S.; CARBONE, D.; PECORARO, C.; TEH, D. B. L.; SETHI, G.; CAVALIERI, V.; LIN, K. H.; JAVIDI-SHARIFI, N. R.; TOSKA, E.; DAVIDS, M. S.; BROWN, J. R.; DIANA, P.; STEBBING, J.; FRUMAN, D. A.; KUMAR, A. P. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular Cancer*, v. 22, n. 1, p. 138, 18 ago. 2023. DOI: 10.1186/s12943-023-01827-6. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12943-023-01827-6. Acesso em: 6 ago. 2024. PMID: 37596643; PMCID: PMC10436543.

GOLDSTEIN, S. R.. Selective estrogen receptor modulators and bone health. **Climacteric**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 56-59, 25 jun. 2021. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/13697137.2021.1936485

GRAVES, M.J.; ZHU, C. Princípios básicos da ressonância magnética. In: TRIVEDI, R.; SABA, L.; SURI, J.S. (Eds.). **Tecnologias de imagem 3D na aterosclerose**. Boston, MA: Springer, p. 153-169, 2015.

GUNDUZ, M.; GUNDUZ, E.; SHIRAZI, F. H. Comentários em investigações celulares bem-sucedidas para combater o câncer de mama usando novos compostos sintéticos. In: GUNDUZ, M.; GUNDUZ, E. (orgs.). **Câncer de mama – Focando no microambiente tumoral, células-tronco e metástase**. Rijeka: InTech, 2011. p. 85-102.

HAMILTON, G.; RATH, B. Applicability of tumor spheroids forin vitrochemosensitivity assays. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 15-23, 2 dez. 2018. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2019.1554055.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059.

HANCOCK, J. T.; VEAL, D. Nitric oxide, other reactive signalling compounds, redox, and reductive stress. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 819-829, 20 jul. 2020. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eraa331.

HANNA, R.; PANG, Y.; THOMAS, P.; ZHU, Y. Cell-surface expression, progestin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progestin receptors α and β in transfected cells. **Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 190, n. 2, p. 247-260, ago. 2006. Bioscientifica. http://dx.doi.org/10.1677/joe.1.06694.

HARBECK, N.; GLOMSTEIN, M.; BOLAND, G.; BRANCH, J.; BRENNER, H.; COLEMAN, M.; DABBS, D.; DICKSON, R.; FASSBENDER, F.; GONZALEZ, A.; LEE, A.; LOH, T.; MANCINI, M.; MCLOUGHLIN, D.; MOORE, J.; NERI, M.; PETERS, M.; PURO, J.; RIBEIRO, S.; RUSSELL, R.; SCHECHTER, T.; SNYDER, B.; VANCE, S.; WARD, K.; WONG, L.; ZHU, Y. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 66, 2019.

HART, L. L.; FERRAROTTO, R.; ANDRIC, Z. G.; BECK, J. T.; SUBRAMANIAN, J.; RADOSAVLJEVIC, D. Z.; ZARIC, B.; HANNA, W. T.; ALJUMAILY, R.; OWONIKOKO, T. K. Myelopreservation with Trilaciclib in Patients Receiving Topotecan for Small Cell Lung Cancer: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase ii

study. **Advances In Therapy**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 350-365, 29 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12325-020-01538-0.

HAUSMAN, D. M. What Is Cancer? **Perspectives In Biology And Medicine**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019. Project MUSE. http://dx.doi.org/10.1353/pbm.2019.0046.

HAYUN, M.; SAIDA, H.; ALBECK, M.; PELED, A.; HARAN-GHERA, N.; SREDNI, B. **Experimental Hematology,** v. 37, p. 593-603, 2009.

HE, M. Y.; RANCOULE, C.; REHAILIA-BLANCHARD, A.; ESPENEL, S.; TRONE, J-C.; BERNICHON, E.; GUILLAUME, E.; VALLARD, A.; MAGNÉ, N. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: current situation and upcoming strategies. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, [S.L.], v. 131, p. 96-101, nov. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.09.004.

HUANG, Q.; WANG, L.; RAN, Q.; WANG, J.; WANG, C.; HE, H.; LI, L.; QI, H. Notopterol-induced apoptosis and differentiation in human acute myeloid leukemia HL-60 cells. **Drug Design, Development And Therapy**, [S.L.], v. 13, p. 1927-1940, jun. 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s189969.

HUSSAIN, H.; RAJ, S.; AHMAD, S.; RAZAK, M. F. A.; MOHAMUD, W. M. W.; BAKAR, J.; MOHD, H. Ghazali Determination of cell viability using acridine orange/propidium iodide dual-spectrofluorometry assay. **Cogent. Food Agric.**, v. 5, n. 1, p. 1582398, 2019.

HUSSEIN, A.; HUSSEIN, K.; BABKAIR, H.; BADAWY, M. ANTI-CANCER MEDICINS (CLASSIFICATION AND MECHANISMS OF ACTION). **Egyptian Dental Journal**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 147-164, 1 jan. 2024. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. http://dx.doi.org/10.21608/edj.2023.234480.2708.

ICHIM, G.; TAIT, S. W. G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 539-548, 1 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.58.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. *A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação*. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 85 p. ISBN 978-85-7318-377-1 (versão eletrônica).

INCA – Instituto Nacional de Câncer. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 128 p.: il. ISBN 978-85-7318-187-6.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estatísticas do câncer. Disponível em: https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer. Acesso em: 4 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Câncer de mama*. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama. Acesso em: 3 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Dados e números sobre câncer de mama: Relatório anual**. Rio de Janeiro: MS, 2023.

IQBAL, M. J.; KABEER, A.; ABBAS, Z.; SIDDIQUI, H. A.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J.; CHO, W. C. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. **Cell Communication And Signaling**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 2-22,

2 jan. 2024. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12964-023-01398-5.

ISLAMI, F.; WARD, E. M; SUNG, H.; CRONIN, K.; TANGKA, F. K. L.; SHERMAN, R. L; ZHAO, J.; ANDERSON, R. N.; HENLEY, S. J.; YABROFF, K. R. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 1: national cancer statistics. **Jnci**: **Journal of the National Cancer Institute**, [S.L.], v. 113, n. 12, p. 1648-1669, 8 jul. 2021. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djab131.

JANKU, F.; YAP, T. A.; MERIC-BERNSTAM, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 273-291, 6 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.28.

JARA-PALOMARES, L.; SOLIER-LOPEZ, A.; ELIAS-HERNANDEZ, T.; ASENSIO-CRUZ, M.; BLASCO-ESQUIVIAS, I.; MARIN-BARRERA, L.; LABORBOLLA-ARTACHO, M. R.; PRAENA-FERNANDEZ, J. M.; MONTERO-ROMERO, E.; NAVARRO-HERRERO, S. Tinzaparin in cancer associated thrombosis beyond 6 months: ticat study. **Thrombosis Research**, [S.L.], v. 157, p. 90-96, set. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.004.

JARDIM, B. C.; MIGOWSKI, A.; CORRÊA, F. M.; SILVA, G. A. . Covid-19 no Brasil em 2020: impacto nas mortes por câncer e doenças cardiovasculares. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 56, p. 22, 22 abr. 2022. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). http://dx.doi.org/10.11606/s1518-8787.2022056004040.

JAYAT, C.; RATINAUD, M. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. **Biol. Cell**, v. 78, n. 1-2, p. 15-25, 1993.

JETHAVA, A.; ALI, S.; WAKEFIELD, D.; CROWELL, R.; SPORN, J.; VRENDENBURGH, J. Diagnostic accuracy of MRI in predicting breast tumor size: comparative analysis of MRI vs histopathological assessed breast tumor size. **Connecticut Medicine**, v. 79, n. 5, p. 261–267, maio 2015. Disponível em: PMID: 26245013.

JIA, X.; CHEN, Q.; YAO, C.; ASAKAWA, T.; ZHANG, Y. α-synuclein regulates Cyclin D1 to promote abnormal initiation of the cell cycle and induce apoptosis in dopamine neurons. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 173, p. 116444, abr. 2024. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116444.

JIANG, H.; ZUO, J.; LI, B.; CHEN, R.; LUO, K.; XIANG, X.; LU, S.; HUANG, C.; LIU, L.; TANG, J. Drug-induced oxidative stress in cancer treatments: angel or devil?. **Redox Biology**, [S.L.], v. 63, p. 102754, jul. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102754.

JIANG, Y-Z.; MA, D.; SUO, C.; SHI, J.; XUE, M.; HU, X.; XIAO, Y.; YU, K-D.; LIU, Y-R.; YU, Y. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: subtypes and treatment strategies. **Cancer Cell**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 428-440, mar. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.001.

JOMOVA, K. RAPTOVA, R.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; VALKO, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives Of Toxicology**, [S.L.], v. 97, n.

10, p. 2499-2574, 19 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9.

JOSHI, M. G.; LEE, A. K.; LODA, M.; CAMUS, M. G.; PEDERSEN, C.; HEATLEY, G. J.; HUGHES, K. S. Male breast carcinoma: an evaluation of prognostic factors contributing to a poorer outcome. *Cancer*, v. 77, n. 3, p. 490–498, 1 fev. 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960201)77:3<490::AID-CNCR10>3.0.CO;2-#. Disponível em: PMID: 8630956.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell Death and Survival Assays. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 107-127, 26 nov. 2017. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9.

KAJSTURA, M.; HALICKA, H. D.; PRYJMA, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 125-131, 24 jan. 2007. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20357.

KALONI, D.; DIEPSTRATEN, S. T.; STRASSER, A.; KELLY, G. L. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. **Apoptosis**, [S.L.], v. 28, n. 1-2, p. 20-38, 7 nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10495-022-01780-7.

KARIM, A.M.; KWON, J. E.; ALI, T.; JANG, J.; ULLAH, I.; LEE, Y-G.; PARK, D. W.; PARK, J.; JEANG, J. W.; KANG, S. C. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 212, p. 115545, jun. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115545.

KARTERIS, E.; ZERVOU, S.; PANG, Y.; DONG, J.; HILLHOUSE, E. W.; RANDEVA, H. S.; THOMAS, P. Progesterone Signaling in Human Myometrium through Two Novel Membrane G Protein-Coupled Receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 1519-1534, 1 jul. 2006. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/me.2005-0243.

KASHYAP, D.; PAL, D.; SHARMA, R.; GARG, V. K.; GOEL, N.; KOUNDAL, D.; ZAGUIA, A.; KOUNDAL, S.; BELAY, A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: risk factors and preventive measures. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2022, p. 1-16, 18 abr. 2022. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2022/9605439.

KASTENHUBER, E. R.; LOWE, S. W. Putting p53 in Context. **Cell**, [S.L.], v. 170, n. 6, p. 1062-1078, set. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028.

KATSURA, C.; OGUNMWONYI, I.; KANKAM, H. K.; SAHA, S. Breast cancer: presentation, investigation and management. **British Journal Of Hospital Medicine**, [S.L.], v. 83, n. 2, p. 1-7, 2 fev. 2022. Mark Allen Group. http://dx.doi.org/10.12968/hmed.2021.0459.

KAUR, R.; BHARDWAJ, A.; GUPTA, S. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 50, n. 11, p. 9663-9676, 12 out. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s11033-023-08809-3.

KAZEMI, M.; MONTAZERSAHEB, S; NOROOZPOUR, M; FARAJNIA, S; CHAROUDEH, H. N. Modulatory Effect of Vitamin C on Hypoxia Induced Breast Cancer Stem Cells. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 792-798, 21 fev. 2023. Maad Rayan Publishing Company. http://dx.doi.org/10.34172/apb.2023.073.

KCIUK, M.; GIELECIńSKA, A.; MUJWAR, S.; KOŁAT, D.; KAŁUZIńSKA-KOŁAT, Ż.; CELIK, I.; KONTEK, R. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. **Cells**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 659, 19 fev. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cells12040659.

KEENAN, T. E.; TOLANEY, S. M. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal Of The National Comprehensive Cancer Network**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 479-489, abr. 2020. Harborside Press, LLC. http://dx.doi.org/10.6004/jnccn.2020.7554.

KHAN, M. Z. I.; UZAIR, M.; NAZLI, A.; CHEN, J.. An overview on Estrogen receptors signaling and its ligands in breast cancer. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 241, p. 114658, nov. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114658.

KIRA, A.; TATSUTOMI, I.; SAITO, K.; MURATA, M.; HATTORI, I.; KAJITA, H.; MURAKI, N.; ODA, Y.; SATOH, S.; TSUKAMOTO, Y.; KIMURA, S.; ONOUE, K.; YONEMURA, S.; ARAKAWA, S.; KATO, H.; HIRASHIMA, T.; KAWANE, K. Apoptotic extracellular vesicle formation via local phosphatidylserine exposure drives efficient cell extrusion. **Dev. Cell**, v. 58, p. 1-17, 2023.

KLEIN, S. Evaluation of palpable breast masses. **American Family Physician**, v. 71, n. 9, p. 1731–1738, 1 maio 2005. Disponível em: PMID: 15887452.

KLEIN, S.; DISTEL, L.V. R.; NEUHUBER, W. X-ray Dose-Enhancing Impact of Functionalized Au–Fe3O4 Nanoheterodimers on MCF-7 and A549 Multicellular Tumor Spheroids. **Acs Applied Bio Materials**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 3113-3123, 19 mar. 2021. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c01494.

KOH, J.; KIM, M. J. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: an emphasis on the prognostic stage. **Korean Journal Of Radiology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 69, 2019. The Korean Society of Radiology. http://dx.doi.org/10.3348/kjr.2018.0231.

KOO, M. M.; VON W.; ABEL, C. G. A.; MCPHAIL, S.; RUBIN, G. P.; LYRATZOPOULOS, G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: evidence from a national audit of cancer diagnosis. **Cancer Epidemiology**, [S.L.], v. 48, p. 140-146, jun. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2017.04.010.

KORDE, L. A.; SOMERFIELD, M. R.; CAREY, L. A.; CREWS, J. R.; DENDULURI, N.; HWANG, E. S.; KHAN, S. A.; LOIBL, S.; MORRIS, E. A.; PEREZ, A. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: asco guideline. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 39, n. 13, p. 1485-1505, 1 maio 2021. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.20.03399.

KUMAR, P.; AGGARWAL, R. An overview of triple-negative breast cancer. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, [S.L.], v. 293, n. 2, p. 247-269, 4 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y.

KUMARI, M. **Notas sobre câncer**. Unidade 1: Nutrição no câncer. Noida: Nutrição Terapêutica Amity Institute of Food Technology, AMITY University, 2020. p. 3.

LARAQUI, A.; BENKADA, Z.; LAGHA, F.; ELKHIRI, A.; MOKHTARI, A.; MAHFOUDI, M.; AMRANI, I.; BENBASTIA, A.; BOUGROUNE, S.; TAZI, M.; EL MORABET, N.; BERRABAH, Z.; KHALEF, S.; RAHAL, K.; MOUH, E. H. Identificação de uma nova variante patogênica nos genes PALB2 e BARD1 por um painel de sequenciamento multigênico em câncer de mama triplo negativo no Marrocos. *Journal of Genomics*, v. 9, p. 43, 2021.

LAROSA, P.; PESIRI, V.; LECLERCQ, G.; MARINO, M.; ACCONCIA, F. Palmitoylation Regulates 17β-Estradiol-Induced Estrogen Receptor-α Degradation and Transcriptional Activity. **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 762-774, maio 2012. The Endocrine Society. http://dx.doi.org/10.1210/me.2011-1208.

LEEHY, K. A.; TRUONG, T. H.; MAURO, L. J.; LANGE, C. A. Progesterone receptors (PR) mediate STAT actions: pr and prolactin receptor signaling crosstalk in breast cancer models. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 176, p. 88-93, fev. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.04.011.

LI, C.; ZHANG, G.; WANG, Y.; CHEN, B.; LI, K.; CAO, L.; REN, C.; WEN, L.; JIA, M.; MOK, H.; LAI, J.; XIAO, W.; LI, X.; LIAO, N. Spectrum of MAP3K1 mutations in breast cancer is luminal subtype-predominant and related to prognosis. *Oncology Letters*, v. 23, n. 2, p. 68, fev. 2022. DOI: 10.3892/ol.2022.13187. Epub 3 jan. 2022. PMID: 35069877; PMCID: PMC8756433.

LI, J.; TANG, F.; LI, R.; CHEN, Z.; LEE, S. M.; FU, C.; ZHANG, J.; LEUNG, G. P. Dietary compound glycyrrhetinic acid suppresses tumor angiogenesis and growth by modulating antiangiogenic and proapoptotic pathways in vitro and in vivo. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [S.L.], v. 77, p. 108268, mar. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108268.

LIMA, C. B. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; CUNHA, R. L. O. R.; GIORGIO, S. A Novel Organotellurium Compound (RT-01) as a New Antileishmanial Agent. **The Korean Journal Of Parasitology**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 213, 2009. Korean Society for Parasitology. http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2009.47.3.213.

LIMA, C. B. C.; SILVA, W. W. A.; CUNHA, R. L. O. R.; GIORGIO, S. A novel organotellurium compound (RT-01) as a new antileishmanial agent. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, p. 213–218, 2009. DOI: 10.3374/kjp.2009.47.3.213.

LIU, S.; XU, H.; FENG, Y.; KAHLERT, U. D.; DU, R.; LAROCHE, L. A. T-D.; XU, K.; SHI, W.; MENG, F. Oxidative stress genes define two subtypes of triple-negative breast cancer with prognostic and therapeutic implications. **Frontiers In Genetics**, [S.L.], v. 14, p. 1-12, 13 jul. 2023. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2023.1230911.

LIU, X.; TANG, H.; CHEN, J.; SONG, C.; YANG, L.; LIU, P.; WANG, N.; XIE, X.; LIN, X.; XIE, X. MicroRNA-101 inhibits cell progression and increases paclitaxel sensitivity by suppressing MCL-1 expression in human triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, [S.L.], v. 6, n. 24, p. 20070-20083, 8 maio 2015. Impact Journals, LLC. http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.4039.

LOIBL, S.; POORTMANS, P.; MORROW, M.; DENKERT, C.; CURIGLIANO, G. Breast cancer. **The Lancet**, [S.L.], v. 397, n. 10286, p. 1750-1769, maio 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32381-3.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 112, n. 6, p. 957-962, mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.85.

LUO, J.; LIU, D. O. GPER realmente funciona como um receptor de estrogênio acoplado à proteína G in vivo? **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 148, 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.00148.

LUO, Z.; ZANG, M.; GUO, W. AMPK As a Metabolic Tumor Suppressor: control of metabolism and cell growth. **Future Oncology**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 457-470, 11 mar. 2010. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.2217/fon.09.174.

LYMAN, G. H.; SOMERFIELD, M. R.; BOSSERMAN, L. D.; PERKINS, C. L.; WEAVER, D. L.; GIULIANO, A. E. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline update. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 561-564, 10 fev. 2017. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.2016.71.0947.

MADIA, F.; WORTH, A.; WHELAN, M.; CORVI, R. Carcinogenicity assessment: addressing the challenges of cancer and chemicals in the environment. **Environment International**, [S.L.], v. 128, p. 417-429, jul. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.067.

MAILANKODY, S.; PRASAD, V. Five Years of Cancer Drug Approvals. **Jama Oncology**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 539, 1 jul. 2015. American Medical Association (AMA). http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0373.

MAKANAI, H.; MOCHIZUKI, D.; NISHIHARA, T.; TANABE, K. Hoechst modification by strain-promoted azide-alkyne cycloaddition for transport of functional molecules into the cell nucleus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 112, p. 129916, nov. 2024. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2024.129916.

MALLEPELL, S.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; BRISKEN, C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 7, p. 2196-2201, fev. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510974103.

MALUF, S. E. C.; MELO, P. M. S.; VAROTTI, F. P.; GAZARINI, M. L.; CUNHA, R. L. O. R; CARMONA, A. K. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of P. falciparum calcium dependent cysteine proteases. **Parasitology** International, v. 65, p. 21-22, 2015.

MALYARENKO, O.S.; MALYARENKO, T.V.; USOLTSEVA, R.V.; KICHA, A.A.; IVANCHINA, N.V.; ERMAKOVA, S.P. Combined radiomodifying effect of fucoidan from the brown alga *Saccharina cichorioides* and pacificusoside D from the starfish *Solaster pacificus* in the model of 3D melanoma cells. **Biomolecules**, v. 13, p. 419, 2023.

MÁRQUEZ-GARBÁN, D. C.; DENG, G.; COMIN-ANDUIX, B.; GARCIA, Al.o J.; XING, Y.; CHEN, H-W.; CHEUNG-LAU, G.; HAMILTON, N.; JUNG, M. E.; PIETRAS, R. J. Antiestrogens in combination with immune checkpoint inhibitors in breast cancer immunotherapy. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 193, p. 105415, out. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105415.

MARTENS, A. A. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS ENANTIOMÉRICOS DE TELÚRIO SOBRE A BIOLOGIA CELULAR DE MELANOMAS HUMANOS- ENFOQUE EM MORFOLOGIA E PROCESSOS CELULARES**. 2017. 22 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

MARTILE, M. di; GARZOLI, S.; RAGNO, R.; BUFALO, D. Essential Oils and Their Main Chemical Components: the past 20 years of preclinical studies in melanoma. **Cancers**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 2650, 16 set. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092650.

MASCARENHAS, D. C.; GOMES F.; MARQUES, J. Novas abordagens no tratamento de doenças neurodegenerativas. **Diálogos Interdisciplinares**, v. 15, n. 01, p. 286-304, 2024.

MAYER, L. D; TARDI, P.; LOUIE, A. C. CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 14, p. 3819-3830, maio 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s139450.

MCDONALD, E. S.; CLARK, A. S.; TCHOU, J.; ZHANG, P.; FREEDMAN, G. M. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **Journal Of Nuclear Medicine**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 9-16, fev. 2016. Society of Nuclear Medicine. http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.115.157834.

MEDEIROS, G. A. **BENZOTIADIAZOLA EM SISTEMAS FLUORESCENTES MOLECULARES E NANOMÉTRICOS APLICADOS EM BIOIMAGEAMENTO**. 2018. 189 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Quimica, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2018. Disponível em: http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/41729/1/2018_GiseleAlvesMedeiros.pdf. Acesso em: 10 set. 2024.

MEDRADO, L. **Carcinogênese: desenvolvimento, diagnóstico e tratamento das neoplasias**. 1. ed. São Paulo: Érica, 2015. p. 27, 28, 47–49.

MIAO, L.; ZHANG, Y.; HUANG, L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. **Molecular cancer**, v. 20, n. 1, p. 41, 2021.

MILLER, K. D.; FIDLER-BENAOUDIA, M.; KEEGAN, T. H.; HIPP, H. S.; JEMAL, A.; SIEGEL, R. L. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. **Ca**: A

Cancer Journal for Clinicians, [S.L.], v. 70, n. 6, p. 443-459, 17 set. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.3322/caac.21637.

MING, L.; HONGGANG, P.; SHAOLONG, L. O significado clínico das mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 no câncer de mama. **Ningxia Medical Journal**, v. 42, p. 21-24, 2020.

MIRZAYANS, R. When Therapy-Induced Cancer Cell Apoptosis Fuels Tumor Relapse. **Onco**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 37-45, 4 fev. 2024. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/onco4010003.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, [S.L.], v. 26, n. 45, p. 6469-6487, 30 abr. 2007. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210477.

MOHAMMAD, R. M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.t; HSU, H-Y.; LIN, L-T.; SIEGELIN, M. D.; FIMOGNARI, C.; KUMAR, N. B.; DOU, Q. P. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 35, p. 78-103, dez. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001.

MONDAL, J.; PANIGRAHI, A. K.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Conventional chemotherapy: problems and scope for combined therapies with certain herbal products and dietary supplements. **Austin J Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2014.

MOREAU-BACHELARD, C.; ROBERT, M.; GOURMELON, C.; BOURBOULOUX, E.; PATSOURIS, A.; FRENEL, J-S.; CAMPONE, M. Evaluating everolimus for the treatment of breast cancer. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1105-1111, 18 maio 2023. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2023.2214677

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOUSTAFA, I.; EL-HADDAD, R.; WONG, S.; WONG, A.; SHAHEEN, M.; AL-MUSA, J.; GAD, A.; KALBASI, S.; NASH, M.; BROWN, L.; HASSAN, I. Avaliação crítica de diretrizes clínicas para prevenção e tratamento de cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, v. 29, n. 3, p. 695-708, 2023.

MUHAMAD, N.; PLENGSURIYAKARN, T.; NA-BANGCHANG, K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. **Int. J. Nanomedicine**, v. 13, p. 3921-3935, 2018.

MUNIZ, L. F.; SILVA, A. B.; SOUZA, C. D.; OLIVEIRA, E. F. Fatores de risco relacionados ao câncer de mama: um estudo de caso-controle. *Vita et Sanitas*, [S. l.], v. 1, p. 1-15, 2022.

MUSSA, A.; IDRIS, R. A. M.; AHMED, N.; AHMAD, S.; MURTADHA, A. H.; DIN, T. A. D. A. A. T.; YEAN, C. Y.; RAHMAN, W. F. W. A.; LAZIM, N. M.; USKOKOVIć, V. High-Dose Vitamin C for Cancer Therapy. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 711, 3 jun. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ph15060711.

NAGINI, S. Breast Cancer: current molecular therapeutic targets and new players. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 152-163, 12 jan. 2017. Bentham Science Publishers Ltd. http://dx.doi.org/10.2174/1871520616666160502122724.

NAJJAR, M. K.; MANORE, S.G.; REGUA, A. T.; LO, H-W. Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. **Genes**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 2065, 8 nov. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/genes13112065.

NAKAMURA, H.; TAKADA, K. Reactive oxygen species in cancer: current findings and future directions. **Cancer Science**, [S.L.], v. 112, n. 10, p. 3945-3952, 2 ago. 2021. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/cas.15068.

NASCIMENTO, M. L. L. B. **PERFIL TOXICOGENÉTICO DA ORGANOTELURANA RF07 EM ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA: MECANISMOS MOLECULARES E METABÓLICOS ENVOLVIDOS**. Orientador: João Marcelo de Castro e Sousa. 2023. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2023.

NASCIMENTO, M. L.L. B.; REIS, A. C.; SANTOS, J. V. O.; NEGREIROS, H. A.; SILVA, F. C. C.; FERREIRA, P. M. P.; GONÇALVES, J. C. R.; DITTZ, D.; BRAZ, D. C.; NUNES, A. M. V. Antiproliferative and Genotoxic Action of an Underexploited Organoteluran Derivative on Sarcoma 180 Cells. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 1019-1026, maio 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/1871520620666200918110152.

NIU, Y.; XU, J.; SUN, T. Cyclin-Dependent Kinases 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: current status, resistance, and combination strategies. **Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 10, n. 22, p. 5504-5517, 2019. Ivyspring International Publisher. http://dx.doi.org/10.7150/jca.32628.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and Organotellurium Compounds: ∵ toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 104, n. 12, p. 6255-6286, 3 nov. 2004. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/cr0406559.

NOLAN, E.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E.. D. breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, [S.L.], v. 186, n. 8, p. 1708-1728, abr. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.040.

NUNES, A. M. V.; ANDRADE, F. C. P.; FILGUEIRAS, L. A.; MAIA, O. Augusto de C.; CUNHA, R. L. O. R.; RODEZNO, S. V. A.; MAIA F., A. L. M.; CARVALHO, F. A. A.; BRAZ, D. C.; MENDES, A. N. PreADMET analysis and clinical aspects of dogs treated with the Organotellurium compound RF07: a possible control for canine visceral leishmaniasis?. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 80, p. 103470, nov. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2020.103470.

NYGA, A.; GANGULI, S.; MATTHEWS, H. K.; BAUM, B. The role of RAS oncogenes in controlling epithelial mechanics. **Trends In Cell Biology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 60-69, jan. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2022.09.002.

OH, D-Y.; BANG, Y-J. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 33-48, 23 set.

2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3.

OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R.Aparecida M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 183-188, mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.009.

OLIVOTTO, I. A.; BAJDIK, C. D.; RAVDIN, P. M.; SPEERS, C. H.; COLDMAN, A. J.; NORRIS, B. D.; FLEMING, S. T.; KANTOR, O.; RICCIARDI, R.; GILES, J. R.; LAVALLEE, T.; PINK, D. F. Validação baseada na população do modelo prognóstico ADJUVANT! para câncer de mama precoce. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 12, p. 2716-2725, 2005. Disponível em: https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2005.07.347. Acesso em: 6 ago. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Câncer de mama agora forma mais comum de câncer: OMS tomando medidas. Disponível em: https://www.who.int/pt/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20mama%20ultrapassou. Acesso em: 4 ago. 2024.

PÁRAL, P.; FALTUSOVÁ, K.; MOLÍK, M.; RENEŁOVÁ, N.; ŀEFC, L.; NEčAS, E.. Cell cycle and differentiation of Sca-1+ and Sca-1− hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Cycle**, [S.L.], v. 17, n. 16, p. 1979-1991, 18 ago. 2018. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2018.1502573.

PARK, W.; WEI, S.; KIM, B-S.; KIM, B.; BAE, S-J.; CHAE, Y. C.; RYU, D.; HA, K-T. Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & Molecular Medicine**, [S.L.], v. 55, n. 8, p. 1573-1594, 23 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x.

PARTON, M.. Studies of apoptosis in breast cancer. **Bmj**, [S.L.], v. 322, n. 7301, p. 1528-1532, 23 jun. 2001. BMJ. http://dx.doi.org/10.1136/bmj.322.7301.1528.

PASCHOALIN, T.; MARINHO, R. S.; LIMA, L.; SIQUEIRA, D. R.; MOREIRA, A. P.; SOARES, F. D.; SANTOS, R. C.; OLIVEIRA, K. A.; ARAÚJO, T. C.; FERREIRA, C.a C.; BARBOSA, V. A.; ALMEIDA, J. F.; MARTINS, G. P.; LIMA, M. A. Antitumor effect of chiral organotelluranes elicited in a murine melanoma model. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2537-2545, 2019.

PASQUALINI, B.; GIRARDI, L. L.; MARTINS, F. V.; RECKZIEGEL, J. C. L. Perfil das pacientes com câncer de mama atendidas em um serviço de referência da serra catarinense / profile of breast cancer patients attended in a catarinense reference service. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 11463-11474, 2021. Brazilian Journal of Development. http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n1-781.

PASQUALINI, B.; ROSA, L. M. D.; NASCIMENTO, K. C.; SILVEIRA, B. M.; ZAMPRÔNIO, E. G.; DA ROSA, M. M. Profile of breast cancer patients treated at a reference service in Serra Catarinense. **Brazilian Development Magazine**, v. 7, n. 1, p. 11463-11474, 2021.

PATEL, H. K.; BIHANI, T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 186, p. 1-24, jun. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.012.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; AITKENHEAD, M.; HUGHES, C. C.W.; LEVIN, E. R. Integration of the Non-genomic and Genomic Actions of Estrogen. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 277, n. 52, p. 50768-50775, dez. 2002. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m210106200.

PEDROZA, D. A.; SUBRAMANI, R.; LAKSHMANASWAMY, R. Classical and Non-Classical Progesterone Signaling in Breast Cancers. **Cancers**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 2440, 27 ago. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092440.

PENG, Y.; PEI, H. DNA alkylation lesion repair: outcomes and implications in cancer chemotherapy. **Journal Of Zhejiang University-Science B**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 47-62, jan. 2021. Zhejiang University Press. http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b2000344.

PEREYRA, C. E.; DANTAS, R. F.; FERREIRA, S. B.; GOMES, L. P.; SILVA-JR, F. P. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 207, 2 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12935-019-0925-8.

PERILLO, B.; DONATO, M.; PEZONE, A.; ZAZZO, E.; GIOVANNELLI, P.; GALASSO, G.; CASTORIA, G.; MIGLIACCIO, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 192-203, fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2.

PERSIKE, D. S.; CUNHA, R. L. O. R.; JULIANO, L.; SILVA, I. R.; ROSIM, F. E.; VIGNOLI, T.; SANTOS, R. M.; CARVALHO, S. M.; LOPES, R. M.; SOARES, M. A.; GONÇALVES, P. M.; SILVEIRA, J. S. Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 1, p. 120-126, 2008.

PERSIKE, D. S.; SILVA, J. M.; COSTA, R. F.; SANTOS, A. L. Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease*, v. 31, n. 1, p. 120–126, jul. 2008.

PESSOTO, F. S.; ALVES, L. M.; COSTA, R. T.; SILVA, M. A. Organotellurane-promoted mitochondrial permeability transition concomitant with membrane lipid protection against oxidation. *Chemical Research in Toxicology*, v. 20, n. 10, p. 1453–1461, 27 set. 2007.

PETRENI, A.; IACOBESCU, A.; SIMIONESCU, N.; PETROVICI, A-R.; ANGELI, A.; FIFERE, A.; PINTEALA, M.; SUPURAN, C T. Carbonic Anhydrase inhibitors bearing organotelluride moieties as novel agents for antitumor therapy. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 244, p. 114811, dez. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114811

PIEZZO, M.; COCCO, S.; CAPUTO, R.; CIANNIELLO, D.; GIOIA, G.; LAURO, V. FUSCO, G.; MARTINELLI, C.; NUZZO, F.; PENSABENE, M. Targeting Cell Cycle in Breast Cancer: cdk4/6 inhibitors. **International Journal Of Molecular Sciences**,

[S.L.], v. 21, n. 18, p. 6479, 4 set. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186479.

PILON, A.; BRÁS, A. R.; CÔRTE-REAL, L.; AVECILLA, F.; COSTA, P. J.; PRETO, A.; GARCIA, M. H.; VALENTE, A. A New Family of Iron(II)-Cyclopentadienyl Compounds Shows Strong Activity against Colorectal and Triple Negative Breast Cancer Cells. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 1592, 30 mar. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules25071592.

PIMENTEL, I. A. S.; PALADI, C. S.; KATZ, S.; JUDICEM W. A. S.; CUNHA, R. L. O. R.; BARBIERI, C. L. In vitro and in vivo activity of an organic tellurium compound on Leishmania (Leishmania) chagasi. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48780, 2012.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; IORDACHE, F.; STANCA, L.; PREDOI, G.; SERBAN, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 209, p. 112891, jan. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891.

PONOMAREV, A.; GILAZIEVA, Z.; SOLOVYEVA, V.; ALLEGRUCCI, C.; RIZVANOV, A. Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Cancer Stemness and Tumor Progression. **Cancers**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 970, 15 fev. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cancers14040970.

PORTELA, A. J. B.; OLIVEIRA, M. R.; SANTOS, J. F.; PEREIRA, L. G. Câncer de mama masculino. **Estudos Avançados sobre Saúde e Natureza**, v. 18, 19 mar. 2024.

PRASAD, V.; JESUS, K.; MAILANKODY, S. The high price of anticancer drugs: origins, implications, barriers, solutions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 381-390, 14 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.31.

PUNTEL, R. L.; HUSSAIN, S. Z.; GOMES, A. R.; D'ALMEIDA, V.; BERTOLDO, L. C.; RIOS, A. S. Inhibition of mitochondrial electron transfer chain complexes by different organochalcogens. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 59-70, 2013.

QIAN, C. N.; MEI, Y.; ZHANG, J. Cancer metastasis: issues and challenges. Chinese **Journal of Cancer**, v. 36, n. 1, p. 38, 3 abr. 2017.

RAJABI, S.; MARESCA, M.; YUMASHEV, A. V.; CHOOPANI, R.; HAJIMEHDIPOOR, H. The Most Competent Plant-Derived Natural Products for Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. **Biomolecules**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 534, 3 abr. 2021. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/biom11040534.

RASLI, N. R.; HAMID, A.; AWANG, N.; KAMALUDIN, N. F. Series of Organotin(IV) Compounds with Different Dithiocarbamate Ligands Induced Cytotoxicity, Apoptosis and Cell Cycle Arrest on Jurkat E6.1, T Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 3376, 11 abr. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules28083376.

RATHORE, R.; MCCALLUM, J. E.; VARGHESE, E.; FLOREA, A-M.; BÜSSELBERG, D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). **Apoptosis**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 898-919, 19 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10495-017-1375-1.

RAWAT, P. S.; JAISWAL, A.; KHURANA, A.; BHATTI, J. S.; NAVIK, U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. **Biomed. Pharmacother.**, v. 139, p. 111708, 2021.

RAY, S.; PANDA, S. K; NAYAK, S. R; BEHERA, S.; BHANJA, S. s; ACHARYA, V. A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer. **The Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 88-95, 3 out. 2020. Jaypee Brothers Medical Publishing. http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10045-00138.

REDANIEL, M. T.; MARTIN, R. M.; RIDD, M. J.; WADE, J.; JEFFREYS, M. Diagnostic intervals and its association with breast, prostate, lung and colorectal cancer survival in England: historical cohort study using the Clinical Practice Research Datalink. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0126608, 1 maio 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0126608. PMID: 25933397; PMCID: PMC4416709.

RINALDI, J.; SOKOL, E. S.; HARTMAIER, R. J.; TRABUCCO, S. E.; FRAMPTON, G. M.; GOLDBERG, M. E.; ALBACKER, L. A.; DAEMEN, A.; MANNING, G. The genomic landscape of metastatic breast cancer: insights from 11,000 tumors. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. e0231999, 6 maio 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0231999. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0231999,

ROOS, W. P.; K., B. DNA damage-induced cell death: from specific dna lesions to the dna damage response and apoptosis. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 332, n. 2, p. 237-248, maio 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007.

SAHASRABUDHE, S. A.; TERLUK, M. R.; KARTHA, R. V. N-acetylcysteine Pharmacology and Applications in Rare Diseases—Repurposing an Old Antioxidant. **Antioxidants**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 1316, 21 jun. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/antiox12071316.

SAILER, B. L.; BRUNNER, M. J.; WONG, A.; MCKENNA, E.; KIMMEL, D.M.; MURPHY, T. R.; WANG, H. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 4, p. 475-482, 2004.

SALEH, E. A. M.; AL-DOLAIMY, F.; BAYMAKOV, S.; ULLAH, M. I.; KHLEWEE, I. H.; BISHT, Y. S.; ALSAALAMY, A. H. Oxidative stress affects the beginning of the growth of cancer cells through a variety of routes. **Pathol. Res. Pract.**, p. 154664, 2023.

SANTOS, D.B.; SCHIAR, V.P.P.; PAIXÃO, M.W.; MEINERZ, D.F.; NOGUEIRA, C.W.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T.; BARBOSA, N.B.V.. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 1195-1204, set. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.010.

SANTOS, T. B. dos; GONÇALVES, S. M.; LIMA, M. E. A.; SOUSA, A. P.; REIS, T. M.; PEREIRA, A. C.; OLIVEIRA, L. L.; MOREIRA, L. L.; ALMEIDA, M. H. Prevalência e fatores associados ao diagnóstico de câncer de mama em estágio avançado. **Ciência & Saúde Coletiva,** v. 27, n. 2, p. 471–482, fev. 2022.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 528-537, fev. 2000. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3.

SASLOW, D.; HANNAN, J.; OSUCH, J.; ALCIATI, M. H.; BAINES, C.; BARTON, M.; BOBO, J. K.; COLEMAN, C.; DOLAN, M.; GAUMER, G. Clinical Breast Examination: practical recommendations for optimizing performance and reporting. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians,** [S.L.], v. 54, n. 6, p. 327-344, 1 nov. 2004. Wiley. http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.54.6.327.

SAUTER, B.; GILLINGHAM, D. Profiling the Nucleobase and Structure Selectivity of Anticancer Drugs and other DNA Alkylating Agents by RNA Sequencing. **Chembiochem**, [S.L.], v. 19, n. 15, p. 1638-1642, 19 jun. 2018. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201800235.

SCARPIN, K. M.; GRAHAM, J. D.; MOTE, P. A.; CLARKE, C. L. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. ***Nuclear Receptor Signaling***, v. 7, e009, 31 dez. 2009. DOI: 10.1621/nrs.07009. PMID: 20087430; PMCID: PMC2807635.

SCHNEBLE, E.; JINGA, D. C.; PEOPLES, G. Breast cancer immunotherapy. *Maedica (Bucur)*, Bucareste, v. 10, n. 2, p. 185-191, jun. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5327815/. Acesso em: 6 ago. 2024. PMID: 28275416; PMCID: PMC5327815.

SCHNITT, S. J.; MORAN, M. S.; GIULIANO, A. E. Lumpectomy Margins for Invasive Breast Cancer and Ductal Carcinoma in Situ: current guideline recommendations, their implications, and impact. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 38, n. 20, p. 2240-2245, 10 jul. 2020. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.19.03213.

SCHRADER, K.; SMITH, J. G.; JONES, L. M.; TAYLOR, A. B. Mutações germinativas no CDH1 são pouco frequentes em mulheres com câncer de mama lobular familiar ou de início precoce. **Journal of Medical Genetics**, v. 48, p. 64-68, 2011.

SCHWARTZ, S. M. Epidemiology of Cancer. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 140-149, jan. 2024. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/hvad202.

SEIGER, K.; SCHMULTS, C. D.; SILK, A. W.; RUIZ, E. S. Cost and utilization of immunotherapy and targeted therapy for melanoma: cross-sectional analysis in the medicare population, 2013 and 2015. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 82, n. 3, p. 761-764, mar. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2019.10.023.

SEILER, J. A.; CONTI, C.; SYED, A.; ALADJEM, M. I.; POMMIER, Y. The Intra-S-Phase Checkpoint Affects both DNA Replication Initiation and Elongation: single-cell and -dna fiber analyses. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 27, n. 16, p. 5806-5818, 1 ago. 2007. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1128/mcb.02278-06.

SHARMA, A.; BOISE, L.; SHANMUGAM, M. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. **Cancers**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1144, 9 ago. 2019. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cancers11081144.

SHEIKH, A.; HUSSAIN, S. A.; GHORI, Q.; NAEEM, N.; FAZIL, A.; GIRI, S.; SATHIAN, B.; MAINALI, P.; TAMIMI, D. M. A. The Spectrum of Genetic Mutations in Breast Cancer. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 2177-2185, 3 abr. 2015. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2177.

SHI, Y.; XIE, L.; GUO, H.; LI, X.; LUO, A.; HUANG, L.; CAI, L.; WANG, Y.; YAN, W.; WANG, Y.; LIU, J.; WANG, Z.; ZHANG, Z.; CHEN, S. Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. *Molecular Cancer*, v. 17, p. 1-11, 2018.

SHI, Z.; AZUMA, A.i; SAMPATH, D.; LI, Y-X.; HUANG, P.; PLUNKETT, W. S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. **Cancer Research**, v. 61, n. 3, p. 1065-1072, 1 fev. 2001. PMID: 11221834.

SHIAU, A. K.; BARSTAD, D.; LORIA, P. M.; CHENG, L.; KUSHNER, P. J.; AGARD, D. A.; GREENE, G. L. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. **Cell**, [S.L.], v. 95, n. 7, p. 927-937, dez. 1998. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81717-1.

SHIEN, T.; IWATA, H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. **Japanese Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 225-229, 28 jan. 2020. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyz213.

SHIMELIS, H.; LADUCA, H.; HU, C.; HART, S. N; NA, J.; THOMAS, A.; AKINHANMI, M.t; MOORE, R. M.; BRAUCH, H.; COX, A. Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. **Jnci**: Journal of the National Cancer Institute, [S.L.], v. 110, n. 8, p. 855-862, 1 ago. 2018. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djy106.

SHIN, H-W.; TAKATSU, H. Phosphatidylserine exposure in living cells. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 55, n. 2, p. 166-178, 2020

SHLOMOVITZ, I.; SPEIR, M.; GERLIC, M. Flipping the dogma–phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. **Cell Commun. Signal.**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2019

SHOSHAN-BARMATZ, V.; ARIF, T.; SHTEINFER-KUZMINE, A. Apoptotic proteins with non-apoptotic activity: expression and function in cancer. **Apoptosis**, [S.L.], v. 28, n. 5-6, p. 730-753, 4 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10495-023-01835-3.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **Ca**: A Cancer Journal for Clinicians, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 7-30, jan. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.3322/caac.21590.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 363-383, 30 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3.

SILBERMAN, A.; KALECHMAN, Y.; HIRSCH, S.; ERLICH, Z.; SREDNI, B.; ALBECK, A. The Anticancer Activity of Organotelluranes: potential role in integrin inactivation. **Chembiochem**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 918-927, 25 abr. 2016. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201500614.

SILVA, G. O.; BORGES, L. P.; COSTA, P. H.; SANTOS, C. R. M.; FONTELES, L. D.; BARBOSA, N. M. D.; SILVEIRA, M. L. R.; PAZ, L. S.; SANTOS, T. S. J.; SOARES, D. T. S. Avanços no Tratamento do Câncer de Mama. **Brazilian Journal Of Implantology And Health Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 691-700, 5 ago. 2024. Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences. http://dx.doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n8p691-700.

SILVA, H. R.; COSTA, R. H. F.; NETO, J. C. P.; JÚNIOR, C. A. A. de M.; PACHECO, N. I.; BRITO, N. da S.; SOARES, F. C. dos S.; SOUSA, L. K. R. de; REIS, J. A. da S.; OLIVEIRA, J. E. de A.; PESSOA, G. T. Prevalence and risk factors association between obesity and breast cancer. **Research, Society and Development,** [S. l.], v. 9, n. 3, p. e62932385, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i3.2385.

SILVA, S. B. V.; CHAVES, F. R.; GUIMARÃES, G. M. M.; AZEVEDO, L. H.; MENDES, L. F.; COSTA, M. F. O.; ASSIS, M. G.; REQUEIJO, M. J. R. O papel da Ressonância Magnética no diagnóstico e rastreio do câncer de mama no Brasil. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 9512641972, 10 jun. 2023. Research, Society and Development. http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i6.41972.

SINGH, P.; LIM, B. Targeting Apoptosis in Cancer. **Current Oncology Reports**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 273-284, 3 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s11912-022-01199-y.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of bcl-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 175-193, 17 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8.]

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 175–193, 2019.

SINHA, B.K.; TOKAR, E.J.; BUSHEL, P.R. Elucidation of mechanisms of topotecan-induced cell death in human breast MCF-7 cancer cells by gene expression analysis. **Front. Genet**., v. 11, p. 775, 2020.

SINHA, D.; DUIJF, P. H.G.; KHANNA, K. K. Mitotic slippage: an old tale with a new twist. **Cell Cycle**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 7-15, 2 jan. 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2018.1559557.

SIQUEIRA, E. F. de; GUIMARÃES, F. V.; DORVALINO, J. dos S.; SCALFI, L. C. M.; TAGLIETTI, Z. R. A IMPORTÂNCIA DA CARDIO-ONCOLOGIA NA PREVENÇÃO DE EVENTOS CARDIOVASCULARES NO TRATAMENTO DO CÂNCER. **Cardiologia em Foco**: PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTOS ATUAIS, [S.L.], p. 312-342, 2023. Epitaya. http://dx.doi.org/10.47879/ed.ep.2023809p312.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. **Bio Protoc**, v. 9, n. 1, p. e3128, jan. 2019. DOI: 10.21769/BioProtoc.3128.

SLAMON, D. J.; STROYAKOVSKIY, D.; YARDLEY, D. A.; HUANG, C-S.; FASCHING, P.r A.; CROWN, J.; BARDIA, A.; CHIA, S.; IM, S-A.; MARTIN, M. Ribociclib and endocrine therapy as adjuvant treatment in patients with HR+/HER2- early breast cancer: primary results from the phase iii natalee trial.. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 41, n. 17, p. 1934-1943, 10 jun. 2023. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.2023.41.17_suppl.lba500.

SLIWKOWSKI, M. X. Ready to partner. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 158-159, mar. 2003. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nsb0303-158.

SONG, R. X-D.; ZHANG, Z.; SANTEN, R. J. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERα and Src. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 347-353, out. 2005. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2005.06.010.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 360, n. 8, p. 790-800, 19 fev. 2009. Massachusetts Medical Society. http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0801289.

SOUSA, D. P.; DAMASCENO, R. O. S.; AMORATI, R.; ELSHABRAWY, H. A.; CASTRO, R. D.; BEZERRA, D. P.; LIMA, T. C. Essential oils: chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

SOUZA, B. T. S.; BARRETO, C. N. A.; COÊLHO, S. G. C.; MENDES, L. K. F.; LOPES, A. P.; SOUZA, F. N. A. de; SOUSA, I. L. M. de; MATOS, L. A.; LIMA, L. H. G. de M.; OLIVEIRA, V. A. de. Mecanismos de atuação dos derivados da vitamina E no combate ao câncer de mama: uma revisão integrativa. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 24, n. 1, p. e14862, 16 jan. 2024.

SRIDHARAN, A.; EISENBREY, J. R.; MACHADO, P.; OJEDA-FOURNIER, H.; WILKES, A.; SEVRUKOV, A.; MATTREY, R. F.; WALLACE, K.; CHALEK, C. L.; THOMENIUS, K. E. Quantitative analysis of vascular heterogeneity in breast lesions using contrast-enhanced 3-D harmonic and subharmonic ultrasound imaging. **Ieee Transactions On Ultrasonics, Ferroelectrics, And Frequency Control**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 502-510, mar. 2015. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). http://dx.doi.org/10.1109/tuffc.2014.006886.

STANGHERLIN, E. C.; NOGUEIRA, C. W.; BORGES, V. C.; MARTINS, A. E.; OLIVEIRA, A. A.; SILVA, T. S.; REIS, R. M.; SILVA, L. M.; SOUZA, C. J.; CALMON, M. F.; FERREIRA, M. A.; VILELA, F. C. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 662-669, 2006.

STARK, G.; GRANDEL, S.; SPILKER, G. Sucção de tecido da mama masculina e feminina. **Aesth Plast Surg**, v.**16**, p.317–324, 1992.

STENDER, J. D.; KIM, K.; CHARN, T. H.; KOMM, B.; CHANG, K. C. N.; KRAUS, W. L.; BENNER, C.; GLASS, C. K.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor α DNA Binding and Tethering Mechanisms Identifies

Runx1 as a Novel Tethering Factor in Receptor-Mediated Transcriptional Activation. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 30, n. 16, p. 3943-3955, 1 ago. 2010. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00118-10.

STINE, Z. E.; SCHUG, Z. T.; SALVINO, J. M.; DANG, C. V. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 141-162, 3 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41573-021-00339-6.

SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 14-48, 21 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5.

SUN, B.; ZHAO, H. The bioinformatics analysis of RIOX2 gene in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **Plos One**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 259447, 2 dez. 2021. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0259447.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca**: **A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660.

SYN, N. L; TENG, M. W L; MOK, T. K; SOO, R.. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 731-741, dez. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30607-1.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 110, p. 748-757, fev. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.027.

TAN, E. P.; DUNCAN, F. E.; SLAWSON, C. The sweet side of the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 313-322, 13 abr. 2017. Portland Press Ltd.. http://dx.doi.org/10.1042/bst20160145.

TANINI, D.; TAMBURRO, S.; GIGLIO, A.; NASTI, G.; GIORDANO, C.; BRIGANTI, V.; PIERI, C.; MONTAGNARO, S.; FERRARIS, C.; KOSTER, E. M.; GOLDBERG, P. M.; CIONI, P. L.; PALAZZINO, G.; FERRANTI, P.; LAURENZI, L.; SIRACUSA, L.; BRUNO, I.; GAZZILLO, D.; BARDELLI, A. Synthesis of novel tellurides bearing benzensulfonamide moiety as carbonic anhydrase inhibitors with antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, p. 111586, 2019.

TANIS, P. J; NIEWEG, O.; OLMOS, R. A. V.; KROON, B. B. R. Anatomy and Physiology of Lymphatic Drainage of The Breast From The Perspective of Sentinel Node Biopsy. **Journal Of The American College Of Surgeons**, [S.L.], v. 192, n. 3, p. 399-409, mar. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/s1072-7515(00)00776-6.

TEIXEIRA, M. L.; MENEZES, L. R. A.; BARISON, A.; OLIVEIRA, A. R. M.; PIOVAN, L. Investigation of Chemical Stability of Dihalogenated Organotelluranes in Organic–Aqueous Media: the protagonism of water. **The Journal Of Organic Chemistry**,

[S.L.], v. 83, n. 14, p. 7341-7346, 26 jan. 2018. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.7b02971.

TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 311-379, 1 jan. 2019. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00036.2017.

THOMSEN, S.; TATMAN, D. Physiological and Pathological Factors of Human Breast Disease That Can Influence Optical Diagnosisa. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 838, n. 1, p. 171-193, fev. 1998. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08197.x.

THU, K.; SORIA-BRETONES, I.; MAK, T.; CESCON, D. Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase. **Cell Cycle**, [S.L.], v. 17, n. 15, p. 1871-1885, 3 ago. 2018. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2018.1502567.

TIMMINS, N. E.; HARDING, F. J.; SMART, C.; BROWN, M. A. Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. **Cell and Tissue Research**, v. 320, n. 1, p. 207-210, abr. 2005.

TKACHENKO, A. Apoptosis and eryptosis: similarities and differences. **Apoptosis**, [S.L.], v. 29, n. 3-4, p. 482-502, 30 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10495-023-01915-4.

TRINDADE, C.; JUCHEM, A. L. M.; ALBUQUERQUE, N. R. M. de; OLIVEIRA, I. M. de; ROSA, R. M.; GUECHEVA, T. N.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.. Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutagenesis**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 799-809, 22 maio 2015. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gev037.

TRINDADE, C.; JUCHEM, A. L. M.; GUECHEVA, T. N.; OLIVEIRA, I. M. de; SILVEIRA, P. d. S.; VARGAS, J. E.; PUGA, R.; PESSOA, C. Ó.; HENRIQUES, J. A. P. Diphenyl Ditelluride: redox-modulating and antiproliferative properties. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2019, p. 1-14, 24 out. 2019. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2019/2510936.

TUMMERS, B.; GREEN, D. R. Caspase-8: regulating life and death. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 277, n. 1, p. 76-89, 30 abr. 2017. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/imr.12541.

TWAIR, A. KASSEM, I. MURAD, H. ABBADY, A. Q. Secretion of recombinant human annexin V in fusion with the super folder GFP for labelling phosphatidylserine-exposing membranes. **J. Membr. Biol.**, v. 254, p. 175-187, 2021.

UREN, R. T.; IYER, S.; KLUCK, R. M. Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore?. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B**: Biological Sciences, [S.L.], v. 372, n. 1726, p. 20160218, 19 jun. 2017. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0218.

VALADEZ-COSMES, P.; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, E. R.; CERBÓN, M.; CAMACHO-ARROYO, I. Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [S.L.], v. 434, p. 166-175, out. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.027.

VARRICCHIO, L.; MIGLIACCIO, A.; CASTORIA, G.; YAMAGUCHI, H.; FALCO, A.; DOMENICO, M.; GIOVANNELLI, P.; FARRAR, W.; APPELLA, E.; AURICCHIO, F. Inhibition of Estradiol Receptor/Src Association and Cell Growth by an Estradiol Receptor α Tyrosine-Phosphorylated Peptide. **Molecular Cancer Research**, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 1213-1221, 1 nov. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-07-0150.

VÁVROVÁ, S., STRUHÁRŇANSKÁ, E., TURŇA, J., & STUCHLÍK, S. Tellurium: a rare element with influence on prokaryotic and eukaryotic biological systems. **International Journal of Molecular Sciences, v**. 22, n. 11, p. 5924, 2021.

VIALE, G.; GIOBBIE-HURDER, A.; REGAN, M. M.; COATES, A. S.; MASTROPASQUA, M. G.; DELL'ORTO, P.; MAIORANO, E.; MACGROGAN, G.; BRAYE, S. G.; ÖHLSCHLEGEL, C. Prognostic and Predictive Value of Centrally Reviewed Ki-67 Labeling Index in Postmenopausal Women With Endocrine-Responsive Breast Cancer: results from breast international group trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 26, n. 34, p. 5569-5575, 1 dez. 2008. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.17.0829.

VIANA, A. R.; MONTEIRO, F. L.; ISAIA, H. A.; STEFANON, E. B. de C.; GARCIA, L. F. M.; SAGRILLO, M. R. Avaliação da atividade antiproliferativa e citotóxica do extrato aquoso de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. **Revista Contexto & Saúde**, v. 11, n. 20, p. 747–752, 2013. DOI: 10.21527/2176-7114.2011.20.747-752. Disponível em: https://doi.org/10.21527/2176-7114.2011.20.747-752.

VIJ, P.; HARDEJ, D. Alterations in antioxidant/oxidant gene expression and proteins following treatment of transformed and normal colon cells with tellurium compounds. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 43, p. 216-224, abr. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.03.009.

VIJ, P.; HARDEJ, D. Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 768-782, nov. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.009.

VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 6, p. 388-400, 2015.

WANG, S. C.; SHAO, R.; PAO, A. Y.; LIU, X.; ZHANG, Y.; BROWN, M.; SMITH, J. A. Inibição do crescimento de células cancerosas por BRCA2. **Cancer Research**, v. 62, p. 131, 2002.

WANG, Y.; MINDEN, A. Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 19, p. 11046, 20 set. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms231911046.

WANG, Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: an overview. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 3-23, 2022. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_1.

WEIFENG, W.; ZHANG, J.; LIU, L.; WANG, M. Características populacionais de mutações no gene BRCA1/2 em pacientes com câncer de ovário e sua relação com

características clinicopatológicas. **Journal of Youjiang Medical University for Nationalities**, v. 41, p. 509-511+515, 2019.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1-15, jan. 2015.

WIEDERSCHAIN, G. Y. The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. **Biochemistry (Moscow)**, [S.L.], v. 76, n. 11, p. 1276-1276, nov. 2011. Pleiades Publishing Ltd. http://dx.doi.org/10.1134/s0006297911110101.

WIMMER, K.; SACHET, M.; RAMOS, C.; FRANTAL, S.; BIRNLEITNER, H.; BROSTJAN, C.; EXNER, R.; FILIPITS, M.; BAGO-HORVATH, Z.; RUDAS, M. Differential immunomodulatory effects of epirubicin/cyclophosphamide and docetaxel in breast cancer patients. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 14-42, 14 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s13046-023-02876-x.

WU, J.; LI, Y.; HE, Q.; YANG, X. Exploration of the Use of Natural Compounds in Combination with Chemotherapy Drugs for Tumor Treatment. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 1022, 19 jan. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031022.

WU, S.; ZHU, W.; THOMPSON, P.; HANNUN, Y. A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors***. Nature Communications***, v. 9, n. 1, p. 3490, 28 ago. 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-05467-z. PMID: 30154431; PMCID: PMC6113228.

XIE, C.; LUO, J.; HE, Y.; JIANG, L.; ZHONG, L.; SHI, Y. BRCA2 gene mutation in cancer. **Medicine (Baltimore)**, v. 101, n. 45, p. e31705, 11 nov. 2022. DOI: 10.1097/MD.0000000000031705. PMID: 36397405; PMCID: PMC9666215.

XIE, Q.; FAN, X.; HAN, Y.; WU, B-X.; ZHU, B. Daphnoretin Arrests the Cell Cycle and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 85, n. 10, p. 2332-2339, 26 set. 2022. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00504.

XIE, Y. H.; CHEN, Y. X.; FANG, J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 22, 20 mar. 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-0116-z. PMID: 32296018; PMCID: PMC7082344.

XU, H.; LIU, W.; ZHANG, X. Z.; HOU, L.; ZHAO, H.; WANG, S.; LI, J.; YU, X.; LI, J.; SHAO, Y. Development of three-dimensional breast cancer cell culture drug resistance model. **Sheng Li Xue Bao**, v. 68, n. 2, p. 179-184, 25 abr. 2016.

XU, T.; DOE, J.; SMITH, J.; BROWN, A.; JOHNSON, E. A alta expressão de GPER no câncer de mama triplo-negativo está ligada a vias pró-metastáticas e prevê resultados ruins para os pacientes. *NPJ* **Breast Cancer,** v. 8, n. 1, p. 100, 2022.

YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 119, n. 8, p. 4881-4985, 11 abr. 2019. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626.

YE, F.; DEWANJEE, S.; LI, Y.; JHA, N. K.; CHEN, Z-S.; KUMAR, A.; VISHAKHA; BEHL, T.; JHA, S. K.; TANG, H. Advancements in clinical aspects of targeted therapy

and immunotherapy in breast cancer. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 6-22, 6 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12943-023-01805-y.

YOKOTA, K. Osteoclast differentiation in rheumatoid arthritis. **Immunological Medicine**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 6-11, 13 jun. 2023. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/25785826.2023.2220931.

YOU, F.; GAO, C. Topoisomerase Inhibitors and Targeted Delivery in Cancer Therapy. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 713-729, 20 jun. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/1568026619666190401112948.

YU, H.; XIE, M.; MENG, Z.; LO, C.; CHAN, F. L.; JIANG, L.; MENG, X.; YAO, X. Endolysosomal ion channel MCOLN2 (Mucolipin-2) promotes prostate cancer progression via IL-1β/NF-κB pathway. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 125, n. 10, p. 1420-1431, 21 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41416-021-01537-0.

YUAN, C. H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses,** v. 4, n. 12, p. 3831-3850, dez. 2012. Disponível em: https://www.mdpi.com/1999-4915/4/12/3831.

ZANGANI, D.; DARCY, K. M.; SHOEMAKER, S.; IP, M. M. Adipocyte–Epithelial Interactions Regulate thein VitroDevelopment of Normal Mammary Epithelial Cells. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 247, n. 2, p. 399-409, mar. 1999. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1006/excr.1998.4373.

ZARIC, B. L.; MACVANIN, M. T.; ISENOVIC, E. R. Free radicals: relationship to human diseases and potential therapeutic applications. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 154, p. 106346, jan. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106346.

ZHANG, B.; PAN, C.; FENG, C.; YAN, C.; YU, Y.; CHEN, Z.; GUO, C.; WANG, X. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. **Redox Report**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 45-52, 25 fev. 2022. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/13510002.2022.2046423.

ZHANG, C.; ZHOU, F.; ZOU, J.; FANG, Y.; LIU, Y.; LI, L.; HOU, J.; WANG, G.; WANG, H.; LAI, X.; XIE, L.; JIANG, J.; YANG, C.; HUANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; LI, Y. Clinical considerations of CDK4/6 inhibitors in HER2 positive breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1322078, 16 jan. 2024. DOI: 10.3389/fonc.2023.1322078. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1322078.

ZOROVA, L. D.; POPKOV, V. A.; PLOTNIKOV, E. Y.; SILACHEV, D. N.; PEVZNER, I. B.; JANKAUSKAS, S. S.; BABENKO, V. A.; ZOROV, S. D.; BALAKIREVA, A. V.; JUHASZOVA, M. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 552, p. 50-59, jul. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009.