

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Estudos *in vitro* de Novas Terapêuticas Contra o Câncer de Mama

Victoria Mascarenhas Borba

Pelotas, 2017

Victoria Mascarenhas Borba

Estudos *in vitro* de Novas Terapêuticas Contra o Câncer de Mama

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Fabiana Kömmling Seixas.
Orientador de Estágio: Dra. Karine Rech Begnini.

Pelotas, 2017

Victoria Mascarenhas Borba

Estudos *in vitro* de Novas Terapêuticas Contra o Câncer de Mama

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 01 de Dezembro de 2017.

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Fabiana Kömmling Seixas (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago.
Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

.....
MSc. Mariana Souza Sonego.
Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B726e Borba, Victoria Mascarenhas

Estudos in vitro de novas terapêuticas contra o câncer de mama / Victoria Mascarenhas Borba ; Fabiana Kömmling Seixas, orientadora. — Pelotas, 2017.

53 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Atividade citotóxica. 2. Anticâncer. 3. Câncer de mama. 4. Compostos organocalcogênicos. 5. Telúrio. I. Seixas, Fabiana Kömmling, orient. II. Título.

CDD : 616.99449

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Rejane e Joel por todo o apoio
e por acreditarem nos meus sonhos.*

Agradecimentos

À Deus, pela minha vida e pelas pessoas tão especiais que colocou nela.

Aos meus amados pais, Rejane e Joel, por todo amor, dedicação, educação, por sempre me incentivarem e acreditarem nos meus sonhos e pelas palavras de carinho que nunca me faltaram. Também ao meu irmão Vitor, pela compreensão, parceria, amizade e apoio.

À minha avó Cerli, pela ajuda, carinho, compreensão e por sempre estar presente em minha vida.

Ao Vinicius Espindola, meu namorado e melhor amigo pelo incentivo, por acreditar em mim, pelo apoio, conselhos, risadas, paciência, amor e companheirismo em todas as horas e por compreender quando não pude me fazer presente.

À minha grande família, pelas palavras de incentivo.

Às amigas Paula Tainá, Luana Pintanel e Daniele Mereb pelo apoio, por acreditarem em mim, por serem presentes na minha vida e por ficarem felizes pelas minhas conquistas.

Aos meus amigos Bruno Santos, Mariana Rachinhas, Vitória Freda, Larissa Soares, Adrielle Oliveira e Guilherme Schulz que estão há anos ao meu lado e, mesmo distante em alguns momentos, sei que torceram por mim tanto quanto torço por eles.

À minha orientadora Dra. Fabiana Seixas e ao Prof. Dr. Tiago Collares por terem aberto as portas pra mim e permitido que eu trabalhasse com o que sempre quis, pela confiança, orientações, oportunidades, disponibilidade e por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos membros atuais e antigos do GPO pela amizade, pelas risadas, pelo café, pela ajuda, pelos momentos de descontração e por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido.

Às “cultivetes” Karine Begnini, Rosiane Mastelari, Adriely Oliveira, Liziane Pereira, Josiane Tessmann, Mariana Sonogo, Martha Ruiz, Julieti Buss, Natália Segatto, Izadora Peter, Camila Bender. Aprendi muito com cada uma de vocês. Obrigada pelos ensinamentos, pelas dúvidas sanadas, pelo apoio e pela ajuda que recebi durante a execução deste trabalho.

A todos os professores da Biotecnologia pelos ensinamentos e pela dedicação.

A todos que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, fazendo parte de mais uma etapa de minha vida.

Muito Obrigada!

*“What we know is a drop of water,
what we ignore is the ocean.”*

Isaac Newton.

Resumo

BORBA, Victoria Mascarenhas. **Estudos *in vitro* de Novas Terapêuticas Contra o Câncer de Mama**. 2017. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum e o que mais mata mulheres no mundo todo. Atualmente, as opções de tratamento dessa doença ainda possuem graves efeitos adversos, principalmente pelo fato dos fármacos não possuírem seletividade sobre as células tumorais. Devido aos efeitos secundários, a busca por novos compostos mais seletivos, com menos efeitos adversos, maior potência terapêutica e um menor índice de resistência é de extrema relevância no contexto científico mundial. Neste sentido, os compostos organocalcogênios são moléculas formadas pelos elementos calcogênios, que compõem o grupo 16 da tabela periódica. Essas moléculas têm demonstrado uma diversidade de atividades biológicas interessantes, como atividade antiviral, antioxidante, antidepressiva e antitumoral. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à busca de novos compostos com potencial antitumoral e estratégias terapêuticas *in vitro* para tratamento de diferentes tipos de câncer. No intuito de dar seguimento às pesquisas do grupo nessa área, e tendo em consideração o potencial farmacoterapêutico interessante dos compostos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial citotóxico dessas moléculas em células de câncer de mama humano e murino. Neste estudo, investigou-se os efeitos antiproliferativos de dois compostos organocalcogênios contendo telúrio em sua estrutura em células de adenocarcinoma de mama humano de subtipo luminal (linhagem MCF-7), células de adenocarcinoma de mama humano de subtipo *Claudin-low* (linhagem MDA-MB-231) e em células de câncer de mama murino de grau IV (linhagem 4T1). Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o teste colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e, após isso, realizado o cálculo de inibição de 50% (IC₅₀), para determinar qual a concentração dos compostos que inibe 50% do crescimento celular. Os resultados demonstraram que os compostos organocalcogênios testados, diminuíram significativamente a viabilidade das células de câncer de mama humano e murino *in vitro* de forma dependente da dose. Os valores de IC₅₀ variaram de 3,74 a 39,81 μM em 48 horas de tratamento. Os dados aqui obtidos demonstram que essas moléculas podem representar uma fonte interessante na pesquisa de novos agentes terapêuticos para o câncer humano.

Palavras chaves: atividade citotóxica; anticâncer; câncer de mama; compostos organocalcogênios; telúrio.

Abstract

BORBA, Victoria Mascarenhas. **In vitro studies of New Therapeutics Against Breast Cancer**. 2017. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Breast cancer is the most common type of cancer and deadly type of cancer for women on the world. Currently, the treatment options of this disease still have serious adverse effects, mainly because the drugs do not have selectivity on the tumor cells. Due to side effects, the search for new, more selective compounds with fewer adverse effects, greater therapeutic potency and a lower resistance index is extremely relevant in the global scientific context. In this sense, the organocalcogenic compounds are molecules formed by the calcogen elements, which compose group 16 of the periodic table. These molecules have demonstrated a diversity of interesting biological activities, such as antiviral activity, antioxidant, antidepressant and antitumor. Our research group has been dedicated to the search for new compounds with antitumor potential and in vitro therapeutic strategies for the treatment of different types of cancer. In order to follow the group's research in this area, and taking into consideration the interesting pharmacotherapeutic potential of the compounds, the objective of the present study was to evaluate the cytotoxic potential of these molecules in human and murine breast cancer cells. In this study, we investigated the antiproliferative effects of two organocalcogen compounds containing tellurium in their structure in human breast adenocarcinoma cells of the luminal subtype (MCF-7 cell line), human breast adenocarcinoma cells of the Claudin-low subtype (MDA- MB-231 cell line) and in grade IV murine breast cancer cells (4T1 cell line). For determination of cell viability, the colorimetric reduction test of MTT (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used and, after that, calculation of inhibition of 50% (IC₅₀), to determine which compound concentration inhibits 50% of cell growth. The results demonstrated that the organocalcogenic compounds tested significantly decreased the viability of human and murine breast cancer cells in vitro in a dose-dependent manner. IC₅₀ values ranged from 3,74 to 39,81 μM in 48 hours of treatment. The data obtained here demonstrate that these molecules may represent an interesting source in the search for new therapeutic agents for human cancer.

Key words: cytotoxic activity; anticancer; breast cancer; organochalcogen compounds; tellurium; organotellurium compounds.

Lista de Figuras

Figura 1	Fatores de risco mais comuns associados ao câncer de mama.....	8
Figura 2	Estrutura dos compostos orgânicos de telúrio utilizados.....	19
Figura 3	Imagem microscópica da linhagem celular de câncer de mama humano MCF-7.....	20
Figura 4	Imagem microscópica da linhagem celular de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231.....	20
Figura 5	Imagem microscópica da linhagem celular de câncer de mama murino de grau IV 4T1.....	21
Figura 6	Transformação do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan.....	23
Figura 7	Avaliação da porcentagem de inibição da proliferação celular da linhagem MCF-7.....	26
Figura 8	Avaliação da porcentagem de inibição da proliferação celular da linhagem MDA-MB-231.....	27
Figura 9	Avaliação da porcentagem de inibição da proliferação celular da linhagem 4T1.....	27

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificação de subtipos moleculares do câncer de mama.....	5
Tabela 2	Linhagens celulares utilizadas e suas características.....	22
Tabela 3	Valores IC ₅₀ (μM) dos compostos organocalcogênicos.....	25

Lista de Abreviaturas e Siglas

μM	Micromolar
Abs	Absorbância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer Associated Gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer Associated Gene 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EO	Estresse Oxidativo
EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g/L	Grama por Litro
GPx	Glutathione Peroxidase
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócito
HPV	Papilomavírus Humano
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanômetro

OMS	Organização Mundial da Saúde
PABCAM	Programa Avançado de Biologia Celular Aplicado à Medicina
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento beta
TNM	Tumor Nódulo Metástase
TTN	Tumores Triplo Negativos
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Câncer de Mama.....	3
2.1.1 Subtipos Moleculares do Câncer de Mama	4
2.1.2 Epidemiologia	7
2.1.3 Fatores de Risco.....	8
2.1.4 Diagnóstico e Tratamento.....	10
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio x Câncer	14
2.3 Compostos Orgânicos Contendo Telúrio	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Síntese dos Compostos Orgânicos Contendo Telúrio	19
4.2 Cultivo Celular.....	20
4.3 Determinação de Citotoxicidade - Ensaio colorimétrico de Redução do MTT	22
4.4 Cálculo IC ₅₀	24
4.5 Análise Estatística.....	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Determinação da Citotoxicidade - Ensaio colorimétrico de MTT.....	25
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	31
Referências	32

1 INTRODUÇÃO

O câncer se apresenta como um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011), sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, especialmente em países subdesenvolvidos (JEMAL; BRAY; FERLAY, 1999; RAU et al., 2015). Esse tipo de tumor se origina quando as células do tecido mamário passam a crescer fora de controle (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017) e é considerado como uma doença multifatorial, envolvendo fatores biológico-endócrinos, vida reprodutiva e comportamento (INCA, 2016). Dessa forma, o risco de uma mulher ser diagnosticada com a doença é determinado por fatores genéticos e estilo de vida (THOMPSON; EASTON, 2004).

Apesar das alternativas terapêuticas existentes atualmente, essas são frequentemente acompanhadas de fortes efeitos adversos, em consequência dos fármacos não atuarem de maneira totalmente seletiva sobre as células neoplásicas (GUDGEON, 2014). Tendo isso em vista, a busca por novas estratégias terapêuticas mais seletivas, com menos efeitos adversos, maior potência terapêutica e menores índices de resistência é de extrema relevância no contexto científico mundial.

Compostos organocalcogênios são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (COMASSETO et al., 1996; ZENI; BRAGA; STEFANI, 2003). Relatos na literatura demonstram algumas das atividades relevantes dessas moléculas, como atividade antiviral (SANCINETO et al., 2015), antioxidante (BRAGA et al., 2009), antidepressiva (BRÜNING et al., 2011) e antitumoral (DA ROSA et al., 2016).

O Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), da Universidade Federal de Pelotas, tem se dedicado à pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias *in vitro* para terapêutica de diversos tipos de neoplasias como adenocarcinoma de colon (DE VASCONCELOS et al., 2013), câncer de bexiga (BEGNINI et al., 2014; TESSMANN et al., 2017), câncer de pulmão (SCHULTZE et al., 2014), câncer de mama (YURGEL et al., 2014; SCHULTZE et al., 2017), dentre outros. No intuito de prosseguir as pesquisas do grupo nessa área, e considerando-se o potencial farmacoterapêutico promissor que diferentes compostos organocalcogênicos apresentam frente a diversas linhagens tumorais (ABONDANZA et al., 2008; SHAABAN et al., 2014; DA ROSA et al., 2016; TABARELLI et al., 2017), o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial citotóxico dessas moléculas em linhagem celular de carcinomas de mama humano (linhagens MCF-7 e MDA-MB-231) e murino (linhagem 4T1).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de Mama

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). As neoplasias malignas são consideradas como um dos principais problemas de saúde pública mundial e é a segunda maior causa de morte nos Estados Unidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Atualmente, o câncer é considerado como sendo um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Dentre os casos totais de câncer por ano, cerca de 30% desses são casos de câncer de mama (INCA, 2016).

O câncer de mama se origina quando as células do tecido mamário passam a crescer fora de controle, ocorrendo quase que inteiramente em mulheres, mas apesar de raro, os homens também podem desenvolver a doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). O câncer de mama é uma doença heterogênea, que pode ser dividida em um número variável de subtipos clínicos (ANDERSON et al., 2014).

O tipo histológico de câncer de mama é determinado pelas células específicas na mama que são afetadas, aqueles que têm origem nas células epiteliais, são chamados de carcinomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). A maioria dos cânceres de mama são chamados de adenocarcinoma, que são aqueles que

começam em células que compõem o tecido glandular. O câncer de mama pode começar a partir de diferentes partes do órgão, sendo que a maioria (cerca de 80%) se inicia nos ductos lactíferos (carcinoma ductal), ou nas glândulas mamárias (carcinoma lobular) (INCA, 2016).

Existem também outros tipos de câncer de mama, que são menos comuns, como os sarcomas, angiossarcomas e doença de Paget que começam nas células do músculo, gordura ou tecido conjuntivo. Em alguns casos, um único tumor de mama pode ser uma combinação de diferentes tipos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Além da classificação histológica, os tumores podem ser subdivididos pelo tipo molecular. Em 2012, a OMS publicou a Classificação para Tumores de Mama, na qual reconhece mais de 20 subtipos diferentes da doença (INCA, 2016). Os tumores histologicamente semelhantes podem ter prognósticos diferentes e podem responder à terapia de forma diferente (ROUZIER et al., 2005).

2.1.1 Subtipos Moleculares do Câncer de Mama

A importância da classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama se deve ao fato de que subgrupos distintos devem receber diferentes tratamentos clínicos, por se portarem de formas distintas. Nos últimos anos foram observados avanços significativos no tratamento dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama (VICTORINO et al., 2015).

Na clínica, os tumores de mama podem ser agrupados em subtipos moleculares de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), e quanto a presença ou ausência de superexpressão do receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e quanto a expressão do marcador de proliferação tumoral Ki-67 (VODUC et al., 2010). Atualmente, os tumores de mama podem ser agrupados em diferentes subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2- positivo e triplo-negativo (UNTCH et al., 2013), e recentemente, outro subtipo foi descoberto, denominado *Claudin-low* (Tabela 1) (CIRQUEIRA et al., 2011).

Tabela 1 – Classificação de subtipos moleculares do câncer de mama.

Classificação	Receptor Hormonal
Luminal A	RE+, RP+/-, HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
HER2 Positivo	RE-, RP- e HER2+
Triplo Negativo	RE-, RP-, HER2-
<i>Claudin-low</i>	RE-, RP-, HER2-, E-caderina-

RE: Receptor de estrogênio; RP: Receptor de Progesterona; HER2: Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2. Fonte: Adaptado de VODUC (2010); GOLDHIRSCH (2013); CIRQUEIRA (2011); ANDERSON (2014).

Os tumores de subtipo luminal (A e B) representam 45% dos tumores de mama (CARVALHO, 2010), sendo o subgrupo luminal A caracterizado pela expressão positiva dos receptores hormonais, sem superexpressão de HER2, juntamente com baixa expressão do marcador Ki-67, baixo índice mitótico e representa cerca de 60% dos carcinomas de mama (CARVALHO, 2010; CIRQUEIRA et al., 2011; VICTORINO et al., 2015); Enquanto que o subgrupo luminal B pode ser ainda subdividido em luminal B com expressão negativa de HER2 ou luminal B com superexpressão de HER2. Em ambos os subgrupos há positividade para RE.

O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico, além de apresentarem alta expressão de ki-67 e alto índice mitótico (CHEANG et al., 2009; CARVALHO, 2010; CIRQUEIRA et al., 2011;

VICTORINO et al., 2015). De forma geral, os subtipos luminais possuem um bom prognóstico, porém, o luminal B carrega um pior prognóstico com relação ao subtipo luminal A; Parte dessa diferença se dá à variação na resposta ao tratamento (CARVALHO, 2010).

O subgrupo HER2 positivo apresenta positividade para a superexpressão de HER2 e negatividade para RE e RP. Por fim, o subtipo molecular triplo negativo é definido por ausência de RE, RP e ausência de superexpressão HER2 (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007; GOLDBIRSCH et al., 2013; VICTORINO et al., 2015). Este subtipo corresponde a 20-25% dos carcinomas de mama e não possui associação com idade, raça ou outros fatores de risco (CAREY et al., 2006; CARVALHO, 2010).

No final da década de 1990, os mastologistas se conscientizaram a respeito dos tumores triplo negativos, reconhecendo tais tumores como biologicamente mais agressivos e mais difíceis de serem tratados, devido à falta de expressão dos alvos terapêuticos convencionais (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007; STIVAL et al., 2012).

Os tumores triplo negativos (TTN), também chamados de *basal-like*, representam 15% dos tumores de mama (CARVALHO, 2010) e apresentam características mais agressivas, como aparecimento em idade mais precoce, estágio avançado ao diagnóstico, alta graduação histológica e nuclear, alto índice mitótico, maior frequência de metástases regionais e à distância, além de uma menor sobrevida (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007; STIVAL et al., 2012). Esse subtipo tem como característica a ausência de expressão dos receptores hormonais RE e RP e não superexpressão de HER2, e expressa proteínas comumente presentes nas células progenitoras ou basais (CARVALHO, 2010).

O câncer de mama de subtipo *Claudin-low* foi reconhecido exibindo um fenótipo triplo negativo, no entanto, apenas uma minoria dos tumores triplo negativos são *Claudin-low* (DIAS et al., 2017). Esse subtipo de tumor geralmente é negativo para RE, RP, HER2, claudina 3, claudina 4, claudina 7 e E-caderina. A baixa expressão de E-caderina em tumores de mama tem sido demonstrado como

indicador de progressão e metástase, sendo associada com um mau prognóstico por essa ser responsável pela manutenção das junções célula-célula (GOULD ROTHBERG; BRACKEN, 2006; WENDT et al., 2011). Pacientes diagnosticados com esse subtipo têm uma pior sobrevida geral quando comparados com pacientes com câncer de mama de subtipo luminal (DIAS et al., 2017).

2.1.2 Epidemiologia

Excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo, representando cerca de 30% dos casos novos a cada ano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011; SOLOMON; LEE, 2012; DUMALAON-CANARIA et al., 2014; LOPES et al., 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Além disso, esse tipo de neoplasia é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, especialmente em países subdesenvolvidos (JEMAL; BRAY; FERLAY, 1999; RAU et al., 2015), e sabe-se que uma entre oito mulheres será diagnosticada ao longo da vida (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009; HARBECK; GNANT, 2016). O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Depois de aumentar continuamente por mais de duas décadas, as taxas de incidência de câncer de mama diminuíram 2,2% ao ano de 1999 a 2005 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). A taxa de cura do câncer de mama também tem aumentado nas últimas décadas, principalmente devido à detecção precoce do mesmo (SOLOMON; LEE, 2012).

No Brasil, segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2016, houve uma estimativa de 57.960 novos casos. Em 2012, foram estimados 500 mil óbitos por câncer de mama em mulheres em todo mundo. Essas mortes correspondem a 15% de todos os óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2016). De acordo com o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM, 2013), no ano de 2013, 14.388 pessoas morreram de câncer de mama no Brasil.

Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (74,30/100 mil habitantes), Sudeste (68,08/100 mil habitantes), Centro-Oeste (55,87/100 mil habitantes) e Nordeste (38,74/100 mil habitantes). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (22,26/100 mil habitantes) (INCA, 2016).

De acordo com dados internacionais, estima-se que 252.710 novos casos de câncer de mama serão diagnosticados em mulheres e 2,470 em homens nos EUA em 2017 e 41.070 (40.610 mulheres e 460 homens) pessoas morrerão de câncer de mama no mesmo ano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

2.1.3 Fatores de Risco

O câncer de mama é um tipo de câncer considerado multifatorial, envolvendo fatores biológico-endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida (INCA, 2016). Os fatores de risco podem ser considerados como modificáveis (que incluem causas relacionadas ao estilo de vida, como a inatividade física) e não modificáveis (fatores genéticos, sexo, idade) (FERRUCCI et al., 2011) (Figura 1).

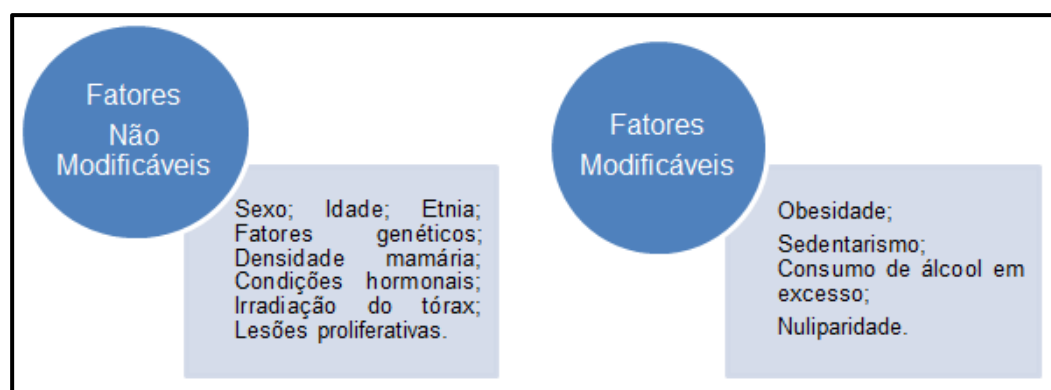


Figura 1 - Fatores de risco mais comuns associados ao câncer de mama. À esquerda, fatores de risco não modificáveis; à direita, fatores de risco modificáveis. Fonte: INCA; American Cancer Society.

Os fatores modificáveis potencialmente associados ao aumento do risco de câncer de mama incluem ganho ou excesso de peso, uso de hormônio pós-menopausa, inatividade física e consumo de álcool. Além disso, pesquisas recentes sugerem que o fumo em longo prazo também pode aumentar o risco de câncer de

mama, particularmente entre as mulheres que começam a fumar antes da primeira gravidez. Ainda, a interrupção dos padrões de sono também pode estar associado a um risco aumentado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Dentre os fatores de risco não modificáveis, pode-se destacar a idade avançada, histórico pessoal ou familiar de câncer de mama ou de ovário; mutações hereditárias nos genes BRCA1, BRCA2 ou outros genes de suscetibilidade ao câncer de mama; certas condições de mama benignas; história de carcinoma ductal ou lobular *in situ*; radiação de dose elevada no tórax quando jovem; alta densidade tecidual do peito; e diabetes tipo 2 (BERGER et al., 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Alguns estudos moleculares epidemiológicos relacionando o Vírus do Papiloma Humano (HPV) e o câncer de mama indicam que o DNA do HPV está presente em alta frequência em amostras de câncer de mama, porém é raro em tecidos normais de mama (KROUPIS et al., 2006; LAWSON; GÜNZBURG; WHITAKER, 2006; HENG et al., 2009; BOBEK et al., 2011). OHBA et al., (2014) demonstraram que o HPV pode desencadear o início da carcinogênese de mama através da superexpressão de APOBEC3B, que leva a mutações excessivas e ciclo celular desregulado.

Ainda se tratando de fatores de risco não modificáveis, os fatores reprodutivos também podem aumentar o risco, devido à exposição hormonal. Por exemplo: uma história menstrual longa, uso recente de anticoncepcionais orais nunca tendo filhos, ter o primeiro filho após os 30 anos e altos níveis naturais de hormônios sexuais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O histórico familiar é um dos fatores de risco de câncer de mama mais bem estabelecidos (HULKA; MOORMAN, 2001). Mulheres que possuam irmã ou mãe que tenha sido diagnosticada com câncer de mama têm o risco de aproximadamente duas a três vezes maior de desenvolver a doença (THOMPSON; EASTON, 2004).

Estudos demonstram que mulheres com mutações no gene BRCA1, apresentam 87% de chance de desenvolver carcinoma de mama, e 65% de chance

de desenvolver um segundo carcinoma mamário se viverem até 70 anos, enquanto que mulheres com mutação no gene BRCA2, possuem cerca de 90% de chance de desenvolverem um carcinoma de mama durante sua vida (MCKEON, 1999; ALVARENGA et al., 2003; DANTAS et al., 2009).

Ademais, um estudo comprovou que o risco ao longo da vida de desenvolver diferentes tipos de câncer está fortemente correlacionado com o número total de divisões das células normais de cada tecido (TARABICHI; DETOURS, 2016).

2.1.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico de câncer de mama é realizado por uma tripla avaliação que inclui avaliação clínica, imagem de mama e diagnóstico de tecido (avaliação citológica ou histológica) (KESHTGAR et al., 2010).

A avaliação da mama por métodos de imagem pode ser feita através de mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética. Esses são os principais métodos que desenvolvem o melhor papel na detecção e no diagnóstico de doenças relacionadas à mama (SOUZA, 2016). Além desses, podem ser realizados biópsia e exames laboratoriais (NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION, 2017). Os meios mais eficazes para a detecção precoce de câncer de mama são o exame clínico de mamas e a mamografia. (SILVA; RIUL, 2011).

A mamografia se trata do método de escolha para o rastreamento populacional do câncer de mama em mulheres assintomáticas e é a primeira técnica de imagem aconselhada pra avaliar a maioria das alterações clínicas mamárias (CHALA; BARROS, 2007). Ainda, há uma grande concordância de que a mamografia de rastreamento reduz a mortalidade pelo câncer de mama em mulheres assintomáticas (FLETCHER; ELMORE, 2003).

A mamografia bienal para mulheres entre 50 a 69 anos é a estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil para o rastreamento do câncer de mama (INCA, 2016). Estudos demonstram a importância da triagem de câncer de mama, sendo possível detectar tumores em estágio inicial, resultando assim em um

ganho de sobrevivência de 5 anos após o diagnóstico de cânceres invasivos (CEDOLINI et al., 2014).

O prognóstico do câncer de mama e as opções de tratamento geralmente se baseiam no estadiamento do câncer, que é feito através do sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástase) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010). Esse sistema é composto por três informações: tamanho do tumor, doença com disseminação para os linfonodos regionais e presença de metástase à distância (SINGLETARY; CONNOLLY, 2006; CARVALHO, 2010).

Outros fatores importantes incluem disseminação linfovascular, classificação histológica, estado do receptor hormonal, a superexpressão de ERBB2, comorbidades e idade da menopausa do paciente (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). Além desses, outros fatores importantes na determinação do prognóstico em câncer de mama são a presença dos receptores hormonais (RE e RP) e a superexpressão de HER2 (CARVALHO, 2010).

Tendo em vista a heterogeneidade do câncer de mama, existem diversas abordagens terapêuticas para essa doença. A melhor opção de tratamento para o câncer é geralmente uma combinação de várias modalidades como cirurgia, terapia hormonal, radioterapia, imunoterapia, e quimioterapia (NIK-ZAINAL et al., 2012). A quimioterapia é utilizada como uma das principais alternativas terapêuticas no combate ao câncer, tendo como objetivo destruir as células tumorais, preservando as saudáveis; No entanto, as atuais opções terapêuticas são frequentemente acompanhadas de fortes efeitos adversos, em consequência dos fármacos não atuarem de maneira totalmente seletiva sobre as células neoplásicas (GUDGEON, 2014). Junto a isso, a eficácia da quimioterapia não tem aumentado e os efeitos colaterais indesejáveis ainda são elevados (SOLOMON; LEE, 2012). Outras desvantagens da quimioterapia incluem a variação na absorção dos medicamentos, o manejo dos efeitos adversos e, principalmente, a adesão do paciente e o custo dos medicamentos (LIU et al., 1997; DEMOLINER; CORTE, 2010).

No Brasil, a radioterapia é empregada em aproximadamente 60% de todos os casos de tumores malignos diagnosticados, inclusive naqueles mais prevalentes no

país, como os de próstata, pulmão, mama e colo uterino. Essa opção de tratamento pode ser utilizada de forma exclusiva, associada à cirurgia (no pré ou pós-operatório) ou à quimioterapia (SALVAJOLI, 2012).

O planejamento do tratamento radioterápico para pacientes com câncer de mama é tecnicamente desafiador devido ao tamanho e forma variáveis do peito, bem como a reprodutibilidade e devido ao movimento respiratório (BALAJI et al., 2016). Pacientes que sobreviveram a um câncer durante a infância ou a idade adulta jovem, tratados com radiação, correm um risco muito elevado de sequelas crônicas e tumores secundários (DEMOOR-GOLDSCHMIDT; SUPIOT; MAHÉ, 2012). Como exemplo, estudos demonstraram que pacientes que recebem radioterapia para câncer de próstata localizado têm um risco aumentado de câncer de bexiga em comparação com pacientes submetidos somente à cirurgia, isso se deve ao efeito secundário da radiação (NIEDER; PORTER; SOLOWAY, 2008).

Durante a radioterapia, deve-se priorizar poupar órgãos em risco, como pulmões, coração e mama contralateral para evitar complicações a longo prazo e alcançar efeitos estéticos satisfatórios (BALAJI et al., 2016). As vantagens adicionais de técnicas mais robustas de radioterapia são a sua capacidade de fornecer distribuições de dose diferencial, que permitem a entrega simultânea de impulso integrado (BALAJI et al., 2016). Essas técnicas também diminuem a toxicidade da radioterapia, porém ainda são pouco utilizadas no Brasil devido aos custos, dificuldade no reembolso e muitas vezes pelo volume de pacientes (SALVAJOLI, 2012).

A hormonioterapia é a classe terapêutica mais efetiva no tratamento de pacientes que apresentam tumores que tenham a expressão dos receptores hormonais. Esse tipo de terapia, também chamada de também chamadas de terapia-alvo, são tratamentos que buscam atingir propriedades específicas das células tumorais. Pacientes cujo câncer é positivo para receptores de estrógeno ou progesterona parecem ser as que mais se beneficiam da terapia hormonal e tem um prognóstico mais favorável (CARVALHO, 2010; SOUZA, 2016).

De acordo com KALIKS (2015), a presença dos receptores hormonais, ou de apenas um deles, indica um benefício da utilização da hormonioterapia como parte do tratamento em qualquer fase da doença, seja administrada de forma adjuvante ao tratamento cirúrgico no caso de doença localizada, ou no caso de doença metastática.

O trastuzumabe, a terapia alvo mais eficaz desenvolvida para o tratamento do câncer de mama até agora, é um anticorpo monoclonal humanizado, que possui afinidade ao domínio extracelular de HER2 (CARLI et al., 2012). Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente determinado e pode envolver a inibição de HER2 e da via PI3K-AKT, atenuação da sinalização celular, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e inibição da angiogênese tumoral (VALABREGA; MONTEMURRO; AGLIETTA, 2007; CARLI et al., 2012;). Esse fármaco é utilizado no tratamento de câncer de mama metastizado que superexpresse HER2, e que já tenha recebido outras alternativas de tratamento antitumoral.

O lapatinibe pertence a uma classe de tratamento oncológico denominada terapia alvo dirigida (DEMOLINER; CORTE, 2010). Por ser uma terapia alvo, apresenta pouca ação nas células saudáveis, ocasionando menos efeitos secundários que os quimioterápicos convencionais. O lapatinibe, tem como alvo inibir o crescimento das células tumorais associadas à HER2 *in vitro* (DEMOLINER; CORTE, 2010; SOUZA, 2016). Esse tratamento foi aprovado pelo FDA em 2007 para o tratamento do câncer de mama com superexpressão do HER2, em mulheres que já fizeram quimioterapia e usaram trastuzumabe (SOUZA, 2016). As principais reações adversas são a diarreia, síndrome mão-pé, náuseas, vômitos, taquicardia ou bradicardia e diminuição da pressão arterial e a hepatotoxicidade, com possível modificação das funções hepáticas (DEMOLINER; CORTE, 2010).

Como mencionado, até mesmo terapias-alvo apresentam reações adversas. Sendo assim, esses fatores demonstram claramente a necessidade de buscar substâncias com maior seletividade celular, com menos efeitos adversos, maior potencial antiproliferativo e menores índices de resistência.

2.2 Espécies Reativas de Oxigênio x Câncer

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas, que são produzidas por organismos vivos como resultado de reações metabólicas nas mitocôndrias, metabolismo celular normal e fatores ambientais. Essas moléculas podem danificar os ácidos nucleicos e as proteínas, alterando assim suas funções (GUPTA et al., 2014). Em níveis baixos, EROs desempenham papéis vitais na estimulação de cascatas de sinalização em células vegetais e animais em resposta a mudanças nas condições ambientais intra e extracelulares (JABS, 1999). Sob um estresse ambiental sustentado, as EROs são produzidas por um longo tempo e, portanto, danos significativos podem ocorrer na estrutura celular e funcionamento normal, podendo induzir mutações somáticas e transformação neoplásica (FANG; SEKI; MAEDA, 2009; KHANDRIKA et al., 2009).

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os metabólitos reativos, chamados oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (EROs), e sua eliminação por mecanismos de proteção, referidos como antioxidantes (KOVÁ, 2010; REUTER et al., 2010). Esse desequilíbrio leva a danos de biomoléculas importantes e células, com potencial impacto em todo o organismo. Este é um fenômeno associado a mecanismos patogênicos de várias doenças, incluindo aterosclerose, doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e Parkinson, câncer, diabetes mellitus, doenças inflamatórias, bem como doenças psicológicas ou processos de envelhecimento (KOVÁ, 2010).

A relação entre inflamação e câncer foi sugerida por dados epidemiológicos e experimentais e confirmada por terapias anti-inflamatórias que mostram eficácia na prevenção e tratamento de câncer (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Os processos associados à proliferação, apoptose e senescência podem ser o resultado da ativação das vias de sinalização em resposta a alterações intracelulares nos níveis de EROs (SAUER; WARTENBERG; HESCHELER, 2001).

Com relação ao estado redox de células tumorais, sabe-se que existem duas características das células tumorais em comparação com as células normais, que

são um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e uma diminuição da capacidade de eliminação de EROs (BRIGELIUS-FLOHÉ; KIPP, 2009). As células cancerígenas utilizam as EROs para estimular a proliferação, invasão, migração e angiogênese, mas o mais importante é que elas desenvolvem mecanismos para evadir a apoptose (BRIGELIUS-FLOHÉ; KIPP, 2009).

Uma grande variedade de cânceres estão envolvidos com as EROs, como câncer de mama (BROWN; BICKNELL, 2001), câncer de estômago (OLIVEIRA et al., 2003), câncer de pulmão (AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008), melanoma (FRUEHAUF; TRAPP, 2008), linfoma (VAN DE WETERING et al., 2008), dentre outros (REUTER et al., 2010).

2.3 Compostos Orgânicos Contendo Telúrio

Os compostos organocalcogênios são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (COMASSETO et al., 1996; ZENI; BRAGA; STEFANI, 2003). Essas moléculas são formadas pelos elementos Oxigênio (O), Enxofre (S), Selênio (Se), Telúrio (Te) e Polônio (Po), e estão localizados no grupo 16 da tabela periódica (MORETTO, 2005).

Atualmente os compostos organocalcogênios têm recebido atenção especial, principalmente devido às propriedades biológicas interessantes das moléculas que contêm esses átomos em sua estrutura (DA ROSA et al., 2016). Relatos na literatura demonstram algumas das atividades relevantes dessas moléculas, como atividade antiviral (SANCINETO et al., 2015), antioxidante (BRAGA et al., 2009), antidepressiva (BRÜNING et al., 2011) e antitumoral (DA ROSA et al., 2016).

Compostos orgânicos que contenham o átomo de telúrio em sua estrutura têm demonstrado diversas propriedades interessantes, como atividade imunomoduladora (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004), antioxidante (AVILA et al., 2012) e anticancerígena (ABONDANZA et al., 2008). Essas propriedades farmacológicas inerentes aos compostos de organotelúrio podem ser atribuídas à sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies

reativas de nitrogênio (ERNs) (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004; BRIVIBA et al., 1998).

Os compostos de organotelúrio também podem mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx), que são excelentes catalisadores para reações antioxidantes, e protegem o organismo contra efeitos potencialmente prejudiciais de EROs, sendo este o mecanismo ao qual a maioria dos autores atribui sua atividade antioxidante (BRAGA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial antitumoral de compostos orgânicos contendo telúrio sobre linhagens celulares de câncer de mama visando futura aplicação terapêutica.

3.2 Objetivos Específicos

- a) avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos orgânicos contendo telúrio sobre linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano de subtipo luminal (MCF-7) através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).
- b) avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos orgânicos contendo telúrio sobre linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano de subtipo *Claudin-low* (MDA-MB-231) através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).
- c) avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos orgânicos contendo telúrio sobre linhagens celulares de câncer de mama murino (4T1) através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

- d) calcular a concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}), a partir dos dados obtidos no ensaio de redução do MTT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos Compostos Orgânicos Contendo Telúrio

Os compostos foram sintetizados pelo laboratório LabSelen-NanoBio da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O procedimento de síntese foi realizado de acordo com metodologia previamente reportada por TABARELLI et al., (2017). Os compostos escolhidos para serem utilizados nesse estudo foram os compostos *(S)*-(2-azido-1-phenyl-3-telurophenyl)-propane (composto **1a**) e *(S)*-(2-azido-1-phenyl-3-teluro-*p*-methoxy-phenyl)-propane (composto **1b**) (Figura 5) ambos contendo o átomo calcogênio telúrio em sua estrutura. Os mesmos foram selecionados de acordo com ensaios realizados em um estudo prévio, no qual as moléculas aqui estudadas demonstraram não ser tóxicas em ensaios *in vivo* utilizando camundongos *swiss* e foram as que obtiveram melhor desempenho em células de câncer de pulmão (TABARELLI et al., 2017).

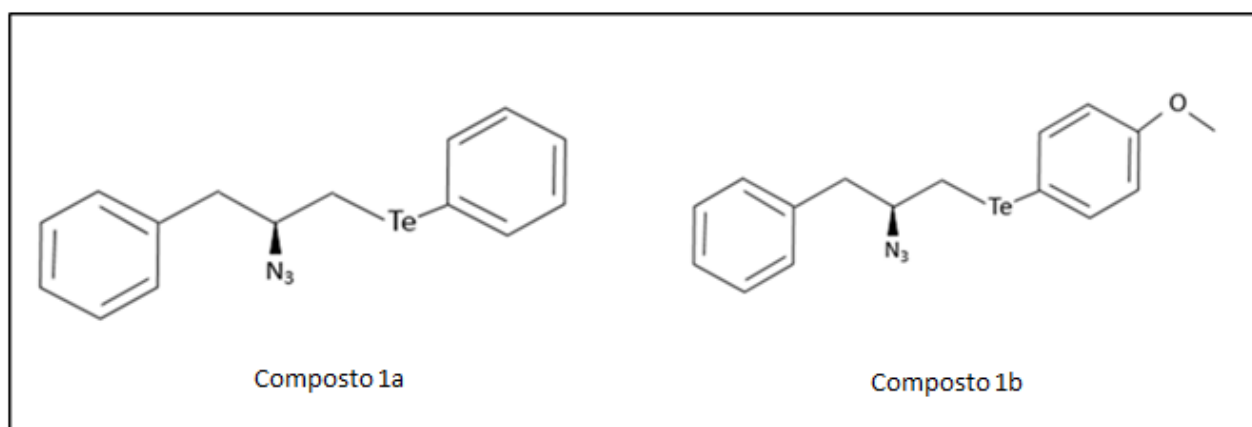


Figura 2 - Estrutura dos compostos orgânicos de telúrio utilizados.

4.2 Cultivo Celular

O cultivo celular de mamíferos fornece uma ferramenta importante para avaliar a citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica (PAILLARD et al., 1999).

Neste trabalho, utilizou-se a linhagem tumoral de mama MCF-7 como equivalente ao subtipo molecular luminal (Figura 2) e MDA-MB-231 como equivalente ao subtipo *Claudin-low* (Figura 3) e a linhagem celular de câncer de mama murino de grau IV (4T1) (Figura 4).

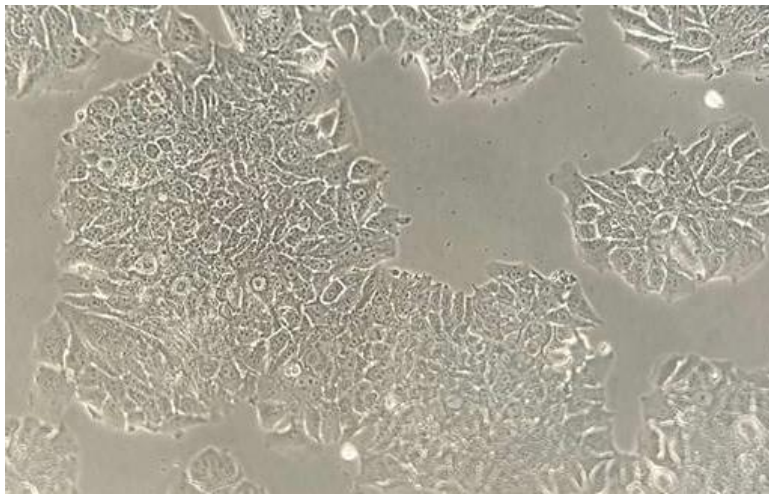


Figura 3 - Imagem microscópica da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 subtipo luminal. Fonte: Própria. Aumento: 40x.

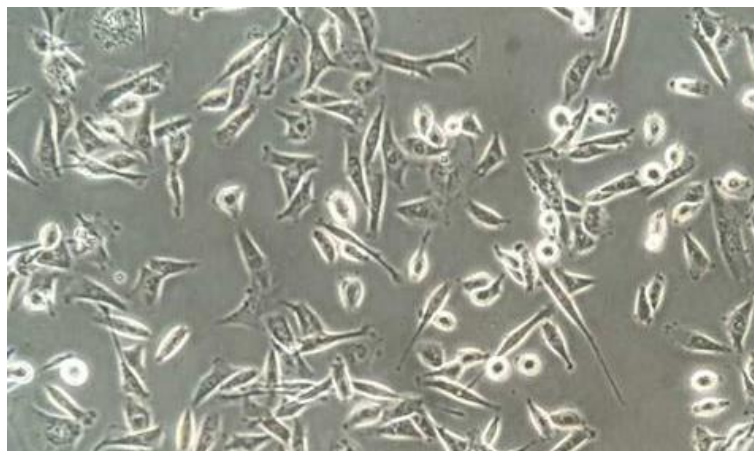


Figura 4 - Imagem microscópica da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 subtipo *Claudin-low*. Fonte: Própria. Aumento: 40x.

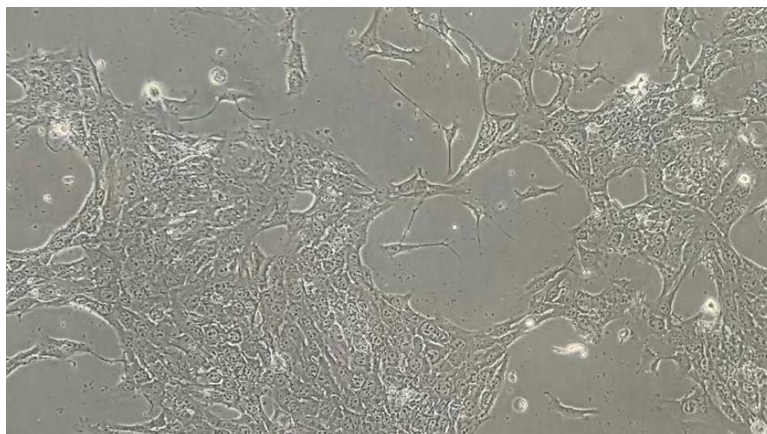


Figura 5 - Imagem microscópica da linhagem celular de câncer de mama murino de grau IV 4T1. Fonte: Própria. Aumento: 40x.

As linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano de subtipo luminal (MCF-7), adenocarcinoma de mama humano de subtipo *Claudin-low* (MDA-MB-231) e linhagem celular de câncer de mama murino (4T1) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As linhagens MCF-7 e 4T1 foram cultivadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), obtidos da *Vitrocell Embriolife* (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, USA), respectivamente. Enquanto que a linhagem tumoral MDA-MB-231 foi cultivada com o meio de cultura Leibovitz, suplementado com 0,2g/L de bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB) também obtidos da obtidos da *Vitrocell Embriolife* (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, USA). As células foram mantidas em atmosfera controlada, com 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para as linhagens MCF-7 e 4T1.

Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas e suas respectivas características.

Linhagem	Espécie	Meio de Cultura	Condições de Cultivo	Característica da Célula
MCF-7	Humana	RPMI + 10% SFB	37°C, 95% de umidade, 5% CO ₂	Células aderentes de adenocarcinoma de mama de subtipo luminal.
MDA-MB-231	Humana	Leibovitz + 10% SBF + 0,2g/L de bicarbonato de sódio	37°C, sem necessidade de CO ₂	Células aderentes de adenocarcinoma de mama de subtipo <i>Claudin-low</i> .
4T1	Camundongo	RPMI + 10% SFB	37°C, 95% de umidade, 5% CO ₂	Células epiteliais aderentes de câncer de mama murino em fase IV.

Fonte: Própria.

4.3 Determinação de Citotoxicidade - Ensaio colorimétrico de Redução do MTT

O ensaio de MTT (*brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio*) (Sigma) é um teste colorimétrico utilizado para avaliação da viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas nas células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, que são os cristais de formazan $\{E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan\}$, esses cristais são insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983). A figura 6 demonstra a formação dos cristais de formazan a partir do MTT pelas desidrogenases mitocondriais.

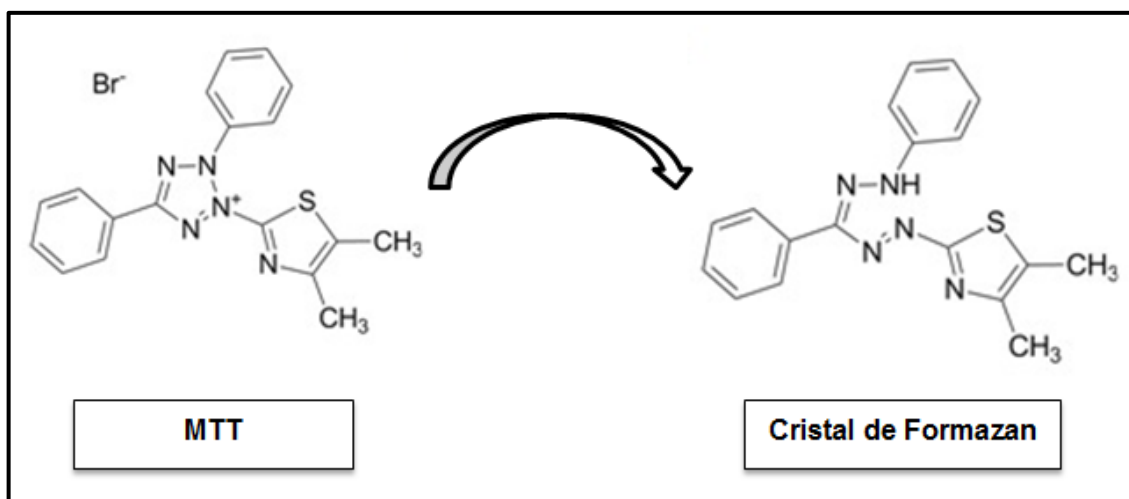


Figura 2 - Transformação do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan. Neste ensaio, o sal de MTT de coloração amarela é transformado em cristais de formazan de cor azul-púrpura pelas desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis. Fonte: Própria.

Para esse ensaio, as células foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células por poço e distribuídas em uma placa de cultura celular de 96 poços com $100 \mu\text{L}$ de meio de cultivo em cada cavidade. A placa foi incubada na estufa, por 24h, para sedimentação das células. Após, as células foram submetidas ao tratamento com os diferentes compostos, nas concentrações de $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $12,5 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$. As moléculas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionadas ao meio suplementado com 10% de SFB nas concentrações desejadas. A concentração final de DMSO no poço não excedeu 0,2% e um grupo adicional foi exposto a uma concentração equivalente deste solvente. Nos poços controles, $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura são adicionados. Todos os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento, em triplicata e em três repetições de experimentos independentes e a citotoxicidade foi avaliada após 48 horas de exposição aos tratamentos.

Após o período de incubação, o meio foi removido e posteriormente foi adicionado $180 \mu\text{L}$ de meio e $20 \mu\text{L}$ de MTT em cada poço (5 mg de MTT/ml solução). As células foram incubadas por mais 3h e o meio foi descartado. Foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan e a placa foi agitada por 10 minutos. Após isso, foi realizada a leitura do experimento em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) a um comprimento de onda de 492 nm .

A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada através da fórmula: % de inibição = $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492} \text{ células controles}) \times 100$.

4.4 Cálculo IC₅₀

A concentração que inibe 50% (IC₅₀) é uma medida da eficácia de uma substância de inibir uma função biológica específica, como por exemplo, inibição do crescimento. Essa é uma medida quantitativa que indica o quanto de uma molécula ou fármaco é preciso para inibir metade de um processo biológico. Dessa forma, esse valor reflete a potência de um composto, ou seja, quanto menor o valor do IC₅₀, maior a potência do composto de inibir 50% de uma função biológica. Geralmente os valores são expressos como concentração molar (BECK et al., 2004). Para o cálculo, foram utilizados os dados obtidos no ensaio de redução do MTT.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey* para comparações múltiplas, fazendo uso do *software GraphPad.Prism* versão 6. $P < 0,05$ foram considerados significantes em todas as análises. Os dados foram expressos como média \pm EPM. Para o cálculo do IC₅₀, foi utilizado o *software Statistix*.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da Citotoxicidade - Ensaio colorimétrico de MTT

Os resultados obtidos no ensaio de redução do MTT (Figuras 7-9) demonstram que o composto **1a** e **1b** diminuíram significativamente a viabilidade das células de câncer de mama *in vitro* de uma maneira dependente da dose. Os compostos sintetizados foram capazes de inibir 50% da viabilidade das células tumorais com valores de IC₅₀ variando de 3,74 a 39,81µM após 48 horas de tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores IC₅₀ (µM) dos compostos organocalcogênicos em linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e 4T1 após exposição durante 48h.

Composto	MCF-7	MDA-MB-231	4T1
1a	39,81 ± 13,38	17,59 ± 2,37	38,01 ± 12,72
1b	16,96 ± 4,77	3,74 ± 3,77	15,84 ± 11,47

A molécula **1b** demonstrou uma maior citotoxicidade sobre as células de câncer de mama humano e murino. Os valores de IC₅₀ alternaram de 16,96 ± 4,77µM na célula MCF-7, 3,74 ± 3,77µM na linhagem tumoral triplo negativo MDA-MB-231 e 15,84 ± 11,47µM na célula murina 4T1 (Tabela 3). A mesma molécula foi capaz de inibir o crescimento em até 85,6% na linhagem MCF-7, 92,5% na linhagem

MDA-MB-231 e 93,5% na linhagem 4T1 após 48 horas de tratamento com 100 μM do composto (Figuras 7-9).

Os valores de IC_{50} para a molécula **1a** variaram de $39,81 \pm 13,38\mu\text{M}$ na célula MCF-7, $17,59 \pm 2,37\mu\text{M}$ na célula MDA-MB-231 e de $38,01 \pm 12,72\mu\text{M}$ na célula 4T1 (Tabela 3). Além disso, a molécula foi capaz de inibir o crescimento celular em até 68,8% na linhagem MCF-7, 92,4% na linhagem MDA-MB-231 e 84,8% na linhagem 4T1 após 48 horas de tratamento com $100\mu\text{M}$ do composto (Figuras 7-9).

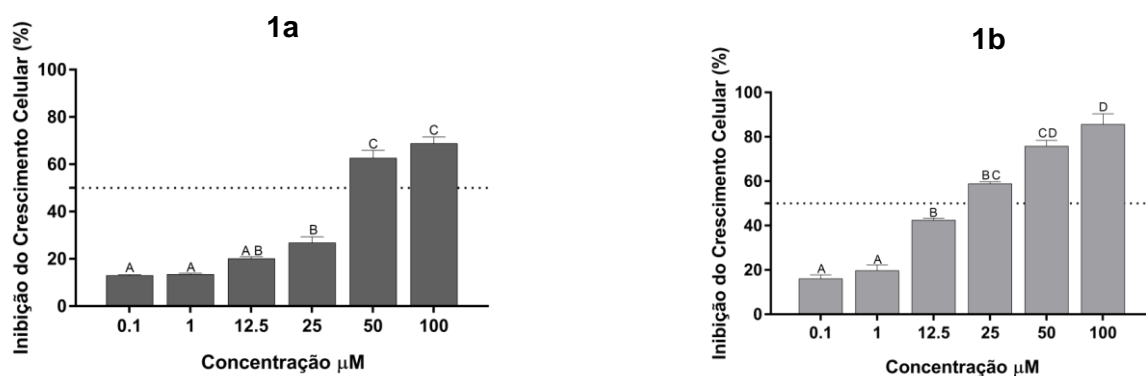


Figura 7. Inibição da viabilidade celular da linhagem MCF-7 investigada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como médias \pm EPM de três experimentos independentes. As letras indicam diferenças significativas entre as concentrações do tratamento. $P < 0,05$ foram considerados significativos.

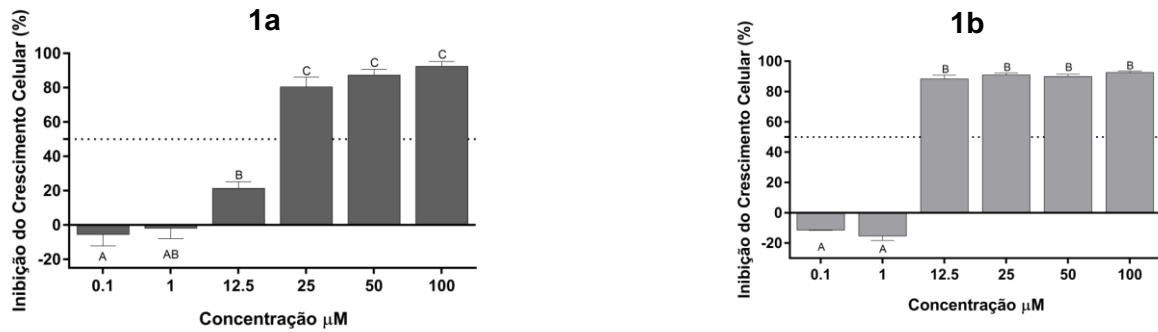


Figura 8. Inibição da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 investigada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como médias \pm EPM de três experimentos independentes. As letras indicam diferenças significativas entre as concentrações do tratamento. $P < 0,05$ foram considerados significativos.

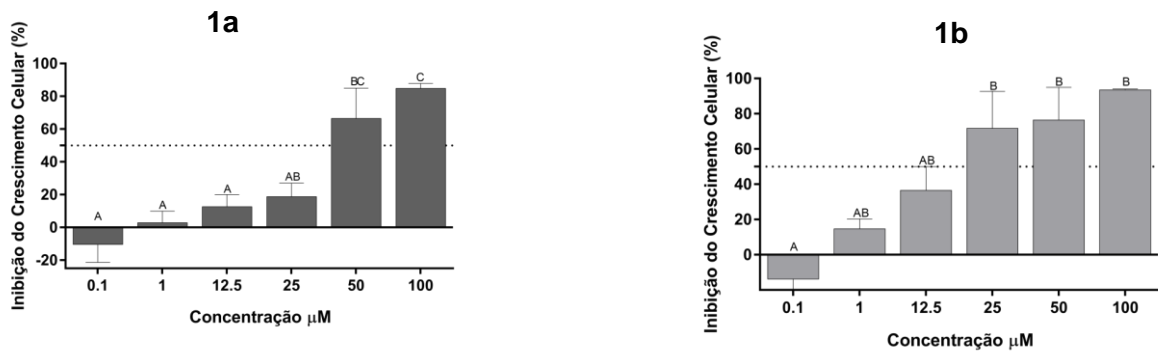


Figura 9. Inibição da viabilidade celular da linhagem 4T1 investigada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como médias \pm EPM de três experimentos independentes. As letras indicam diferenças significativas entre as concentrações do tratamento. $P < 0,05$ foram considerados significativos.

6 DISCUSSÃO

Os compostos organocalcogênios têm recebido atenção especial, principalmente devido às propriedades biológicas interessantes das moléculas que contêm esses átomos em sua estrutura (DA ROSA et al., 2016). O telúrio é considerado um elemento não-essencial, e esta pode ser a razão pela qual este elemento é quase negligenciado nas investigações biológicas e frequentemente associado à toxicidade (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). A atividade antitumoral dos compostos organocalcogênios já foi demonstrada em diversos estudos (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004; ABONDANZA et al., 2008; SHAABAN et al., 2014; TABARELLI et al., 2017).

Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa investigou a atividade antioxidante e antitumoral de compostos organocalcogênios, obtendo resultados promissores em células de câncer de pulmão (TABARELLI et al., 2017) e células de câncer de bexiga (DA ROSA et al., 2016). Estudos envolvendo compostos organocalcogênios contendo telúrio em sua estrutura em câncer de mama são escassos, sendo necessária uma maior atenção a esses compostos devido às suas propriedades farmacológicas ainda não investigadas e a grande representatividade desse tipo de câncer na população mundial.

Neste trabalho, foram testados dois compostos orgânicos contendo telúrio em sua estrutura, em células tumorais de câncer de mama. Foi demonstrado aqui, que os compostos **1a** e **1b** diminuíram significativamente a viabilidade das células de câncer de mama *in vitro* de uma maneira dependente da dose (Figuras 7-9). Os dois

compostos foram capazes de inibir mais de 50% da viabilidade celular das 3 linhagens celulares tumorais avaliadas. O composto **1b** se mostrou mais eficiente, pois apresentou uma maior capacidade de inibição da viabilidade celular em todas as linhagens testadas e seus valores de IC₅₀ foram menores que os valores de IC₅₀ do composto **1a** (Tabela 3), demonstrando assim, uma maior potência quando comparado ao composto **1a**. Esses resultados estão de acordo com dados apresentados por diversos outros estudos (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004; SHAABAN et al., 2014; DA ROSA et al., 2016; SILBERMAN et al., 2016).

Shaaban et al., (2014) sintetizou uma série de compostos contendo enxofre, selênio e telúrio em sua estrutura e os testaram em várias linhagens celulares tumorais. Enquanto que os compostos com enxofre e selênio não mostraram nenhuma atividade expressiva, os compostos contendo telúrio em sua estrutura exibiram atividade citotóxica significativa. De forma interessante, alguns dos compostos demonstraram uma possível ação seletiva, demonstrando uma menor citotoxicidade em células de cultivo primário de fibroblastos humanos do que nas células tumorais.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que compostos organocalcogênios possuem atividade antitumoral. DA ROSA et al., (2016) avaliou a atividade antitumoral de compostos organocalcogênios contendo selênio, enxofre e telúrio sobre linhagem celular de câncer de bexiga 5637 e demonstraram que o composto que continha o átomo calcogênio Te em sua estrutura, diminuiu significativamente a viabilidade celular *in vitro* de maneira dose-tempo dependente. No mesmo estudo, foi demonstrada atividade antioxidante satisfatória apenas de um composto, o qual continha em sua estrutura o átomo Te. Além disso, também foi demonstrado por TABARELLI et al., (2017), utilizando os mesmos compostos aqui estudados, que os compostos que continham telúrio na estrutura apresentaram um efeito antioxidante maior em comparação com os compostos contendo outros átomos de calcogênios.

ABONDANZA et al., (2008) também investigaram a efetividade de um composto contendo telúrio em sua estrutura para produzir efeitos letais em linhagem celular de leucemia (HL-60) e sua capacidade de modular a expressão da oncoproteína Bcl-2. Os resultados desse estudo sugerem que o composto

organocalcogênio induziu a morte celular por apoptose em células tumorais de leucemia humana HL-60, esse resultado pode ser mediado pela *down* regulação de expressão de Bcl-2, que possui um papel importante na regulação de morte celular programada e tem sido considerada como potencial alvo para terapia do câncer.

Essas descobertas estão de acordo com vários relatórios da literatura, no qual compostos contendo telúrio demonstram ser agentes antioxidantes efetivos, mais do que seus análogos contendo enxofre e selênio (NOBRE et al., 2014). Esta propriedade os torna atraentes como protetores contra EROs, tais como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e radicais peroxil, e como inibidores da peroxidação lipídica em sistemas químicos e biológicos (BRIVIBA et al., 1998; KANSKI et al., 2001). Acredita-se que tais compostos possam alterar significativamente o equilíbrio redox pré-existente na célula no sentido de oferecer mais condições oxidantes. Neste contexto, as condições de oxidação são usadas para “empurrar” oxidativamente células cancerosas estressadas até o “limiar redox” e assim induzir morte celular por apoptose (COMPARSI et al., 2015).

A maior atividade citotóxica do composto 1b frente ao composto 1a pode ser devido a presença do substituinte metoxi, visto que estudos prévios evidenciaram que a adição desse substituinte conferiu uma maior atividade antiproliferativa de em relação ao composto parente correspondente, demonstrando que a introdução de grupos metoxi pode melhorar a atividade anticancerígenas dos compostos (ZHAO et al., 2017).

Assim, o presente trabalho demonstrou que o possível efeito antitumoral de compostos orgânicos contendo Te em sua estrutura, pode ser devido à potencial capacidade antioxidante desses compostos. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor entendimento do mecanismo de morte induzido pelos compostos organocalcogênios sobre as células de câncer de mama.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que os compostos organocalcogênios aqui testados possuem efeito citotóxico sobre células de câncer de mama. Ainda que prévios, nossos resultados indicam que os compostos organocalcogênios contendo Te em sua estrutura representam uma classe importante e promissora para a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes farmacoterapêuticos.

Tendo em vista os resultados promissores do presente trabalho, temos como perspectiva, continuar investigando os compostos aqui estudados, a fim de:

- a) realizar estudos de relação estrutura/atividade;
- b) investigar a citotoxicidade dos compostos aqui expostos, em células não-tumorais;
- c) avaliar o perfil apoptótico das linhagens celulares de mama submetidas ao tratamento com os diferentes compostos organocalcogênios através do ensaio de citometria de fluxo;
- d) avaliar o perfil de expressão gênica das linhagens de câncer de mama para genes envolvidos em processos de apoptose, de ciclo celular e de enzimas antioxidantes, após tratamento com os compostos organocalcogênios e dessa forma, investigar melhor os processos de morte celular envolvidos.

Referências

- ABONDANZA, T. S. et al. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2540–2545, 2008.
- ALVARENGA, M. et al. Contribuição do patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, 2003.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2009. **American Cancer Society**, p. 1–72, 2009.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Staging 7th Edition. **American Joint Committee on Cancer**, p. 1–2, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2017. **Cancer Facts & Figures 2017**, 2017.
- ANDERSON, W. F. et al. How many etiological subtypes of breast cancer: Two, three, four, or more? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 8, p. 1–11, 2014.
- AVILA, D. S. et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1903–1910, 2012.
- AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2008.
- BALAJI, K. et al. Radiation therapy for breast cancer: Literature review. **Medical Dosimetry**, v. 41, n. 3, p. 253–257, 2016.
- BECK, B. et al. Assay Operations for SAR Support. n. Md, p. 1–7, 2004.
- BEGNINI, K. R. et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- BERGER, N. A. et al. Cancer in the elderly. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 117, p. 147-55–6, 2006.
- BOBEK, V. et al. High Prevalence of Human Papillomaviruses in Fresh Frozen Breast Cancer Samples. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2011.
- BRAGA, A. L. et al. Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, n. 1, p. 43–45, 2009.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1555–1568, 2009.

- BRIVIBA, K. et al. Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 817–823, 1998.
- BROWN, N. S.; BICKNELL, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress - its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 3, n. 5, p. 1–5, 2001.
- BRÜNING, C. A. et al. Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, n. 2–3, p. 145–149, 2011.
- CAREY, L. A. et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Jama**, v. 295, n. 21, p. 2492, 2006.
- CARLI, P. et al. Target therapy in elderly breast cancer patients. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 83, n. 3, p. 422–431, 2012.
- CARVALHO, S. M. T. Avaliação de fatores prognósticos em tumores de mama nos estádios IIA e IIIB e sua correlação com sobrevida. p. 99, 2010.
- CEDOLINI, C. et al. Type of breast cancer diagnosis, screening, and survival. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 4, p. 235–240, 2014.
- CHALA, L. F.; BARROS, N. DE. Avaliação das mamas com métodos de imagem. **Radiologia Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 4–6, 2007.
- CHEANG, M. C. U. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009.
- CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, p. 499–503, 2011.
- CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 3, p. 235–244, 2007.
- COMASSETO, J. V. et al. Vinylic Selenides and Tellurides - Preparation, Reactivity and Synthetic Applications. 1996.
- COMPARI, B. et al. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS ATRIBUIDAS AO DITELURETO DE DIFENILA. p. 31–56, 2015.
- DA ROSA, R. M. et al. Synthesis, Antioxidant and Antitumoral Activities of 5'-ArylChalcogeno-3-AminoThymidine (ACAT) derivatives. **Med. Chem. Commun.**, 2016.
- DANTAS, É. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 95–102, 2009.
- DE VASCONCELOS, A. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 4, p. 289–297, 2013.
- DEMOLINER, L. P.; CORTE, T. W. F. ATENÇÃO FARMACÊUTICA PARA

PACIENTES USUÁRIOS DE LAPATINIBE. **Revista da Graduação**, p. 1–13, 2010.

DEMOOR-GOLDSCHMIDT, C.; SUPIOT, S.; MAHÉ, M. A. Cancers du sein après radiothérapie: Facteurs de risque et proposition de définition du sein chez la jeune fille prépubère comme organe à risque. **Cancer/Radiotherapie**, v. 16, n. 2, p. 140–151, 2012.

DIAS, K. et al. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2017.

DUMALAON-CANARIA, J. A. et al. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. **Cancer Causes and Control**, v. 25, n. 7, p. 771–785, 2014.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 290–302, 2009.

FERRUCCI, L. M. et al. Causal attribution among cancer survivors of the 10 most common cancers. **Journal of Psychosocial Oncology**, v. 29, n. 2, p. 121–140, 2011.

FLETCHER, S. W.; ELMORE, J. G. Mammographic screening for breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 17, p. 1672–80, 2003.

FRUEHAUF, J. P.; TRAPP, V. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? **Expert review of anticancer therapy**, v. 8, n. 11, p. 1751–1757, 2008.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.

GOULD ROTHBERG, B. E.; BRACKEN, M. B. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: A systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 100, n. 2, p. 139–148, 2006.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUDGEON, A. Side-effects of systemic therapy for the management of breast cancer. **South African Medical Journal**, v. 104, n. 5, p. 381, 2014.

GUPTA, R. K. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 11, p. 376–390, 2014.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 2016.

HENG, B. et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1345–1350, 2009.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: Hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, n. 1, p. 103–116, 2001.

INCA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC DO CÂNCER: ABORDAGENS BÁSICAS PARA O CONTROLE DO CÂNCER**. [s.l: s.n.].

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. **Biochemical pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 231–45, 1999.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics: 2011. **CA Cancer J Clin**, v. 49, n. 2, p. 1,33-64, 1999.

KANSKI, J. et al. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3- [4- (N , N-dimethylamino) benzenetellurenyl] propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. **Cell**, v. 911, p. 12–21, 2001.

KESHTGAR, M. et al. Current status and advances in management of early breast cancer. **International Journal of Surgery**, v. 8, n. 3, p. 199–202, 2010.

KHANDRIKA, L. et al. Oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 282, n. 2, p. 125–136, 2009.

KOVÁ, Z. Ď. U. R. A. Č. Some Current Insights into Oxidative Stress. v. 8408, p. 459–469, 2010.

KROUPIS, C. et al. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 727–731, 2006.

LAWSON, J. S.; GÜNZBURG, W. H.; WHITAKER, N. J. Viruses and human breast cancer. **Future microbiology**, v. 1, n. 1, p. 33–51, 2006.

LIU, G. et al. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 15, n. 1, p. 110–115, 1997.

LOPES, C. M. et al. Clinical, histomorphological, and therapeutic prognostic factors in patients with invasive triple negative breast cancer. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 6, p. 397–406, 2015.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of Breast Cancer. v. 81, n. 11, p. 1339–1346, 2010.

MCKEON, F. Killing the umpire: cooperative defects in mitotic checkpoint and BRCA2 genes on the road to transformation. **Breast Cancer Res**, v. 1, n. 1, p. 8–10, 1999.

MORETTO, M. B. Efeito de compostos organocalcogênicos e derivados da guanina em modelos de dano cerebral em ratos. 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NIEDER, A. M.; PORTER, M. P.; SOLOWAY, M. S. Radiation Therapy for Prostate Cancer Increases Subsequent Risk of Bladder and Rectal Cancer: A Population Based Cohort Study. **The Journal of Urology**, v. 180, n. 5, p. 2005–2010, 2008.

NIK-ZAINAL, S. et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 979–993, 2012.

NOBRE, P. C. et al. Organochalcogen compounds from glycerol: Synthesis of new antioxidants. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6242–6249, 2014.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255–6285, 2004.

OHBA, K. et al. In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2014.

OLIVEIRA, C. P. M. S. et al. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer : reduction of oxidative stress. v. 9, n. 3, p. 446–448, 2003.

RAU, K. et al. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox ®) combined with cyclophosphamide and 5-fluorouracil is effective and safe as salvage chemotherapy in taxane-treated metastatic breast cancer : an open-label , multi-center , non-comparative phase II study. ???, p. 1–8, 2015.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 16, p. 5678–5685, 2005.

SALVAJOLI, J. V. O papel da radioterapia no tratamento do câncer: avanços e desafios. **Revista Onco&**, p. 32–36, 2012.

SANCINETO, L. et al. Design and Synthesis of DiselenoBisBenzamides (DISEBAs) as Nucleocapsid Protein 7 (NCp7) Inhibitors with anti-HIV Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 9601–9614, 2015.

SAUER, H.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J. Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. **Cell Physiol Biochem**, v. 11, p. 173–186, 2001.

SCHULTZE, E. et al. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 55–63, 2014.

SCHULTZE, E. et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcome the triple-negative breast cancer cell resistance to tretinoin and show synergistic effect on cytotoxicity induced by doxorubicin and 5-fluorouracil. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. September, p. 404–409, 2017.

SHAABAN, S. et al. Sulfur, selenium and tellurium pseudopeptides: Synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 3610–3619, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2017. v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SILBERMAN, A. et al. The Anticancer Activity of Organotelluranes: Potential Role in Integrin Inactivation. **ChemBioChem**, v. 17, n. 10, p. 918–927, 2016.

SILVA, P. A. DA; RIUL, S. DA S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 6, p. 1016–21, 2011.

SINGLETERY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging - Working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **CA Cancer J Clin**, v. 56, n. 1, p. 37–47, 2006.

SOLOMON, V. R.; LEE, H. Anti-breast cancer activity of heteroaryl chalcone derivatives. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 3, p. 213–220, 2012.

SOUZA, S. L. DE O. AVANÇOS DA TERAPIA MODERNA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA. v. 53, n. 1, p. 47–53, 2016.

STIVAL, R. A. et al. Impacto do fenótipo triplo-negativo no prognóstico de pacientes com câncer de mama de uma unidade de referência no Brasil central. **Rev Bras Mastologia**, v. 22, n. 1, p. 6–12, 2012.

TABARELLI, G. et al. Synthesis and Antitumoral Lung Carcinoma A549 and Antioxidant Activity Assays Of New Chiral β -Aryl-Chalcogenium Azide Compounds. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 27, p. 8423–8430, 2017.

TARABICHI, M.; DETOURS, V. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **F1000Research**, v. 5, n. August, p. 2044, 2016.

TESSMANN, J. W. et al. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 37–46, 2017.

THOMPSON, D.; EASTON, D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 221–236, 2004.

UNTCH, M. et al. 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: Primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - Opinion of a German team of experts (Zurich 2013). **Breast Care**, v. 8, n. 3, p. 221–229, 2013.

VALABREGA, G.; MONTEMURRO, F.; AGLIETTA, M. Trastuzumab: Mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 6, p. 977–984, 2007.

VAN DE WETERING, C. I. et al. Manganese superoxide dismutase gene dosage affects chromosomal instability and tumor onset in a mouse model of T cell lymphoma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1677–1686, 2008.

VICTORINO, V. J. et al. Expressão de PGC-1 em subtipos moleculares do câncer de mama PGC-1 expression in breast cancer subtypes. p. 55–64, 2015.

VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684–1691, 2010.

WENDT, M. K. et al. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 14, p. 2423–2435, 2011.

YURGEL, V. C. et al. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1583–1591, 2014.

ZENI, G.; BRAGA, A. L.; STEFANI, L. A. Palladium-Catalyzed Coupling of sp² - Hybridized Tellurides. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, p. 731–738, 2003.

ZHAO, J. et al. Improve the anticancer potency of the platinum(II) complexes through functionalized leaving group. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, n. July, p. 20–28, 2017.