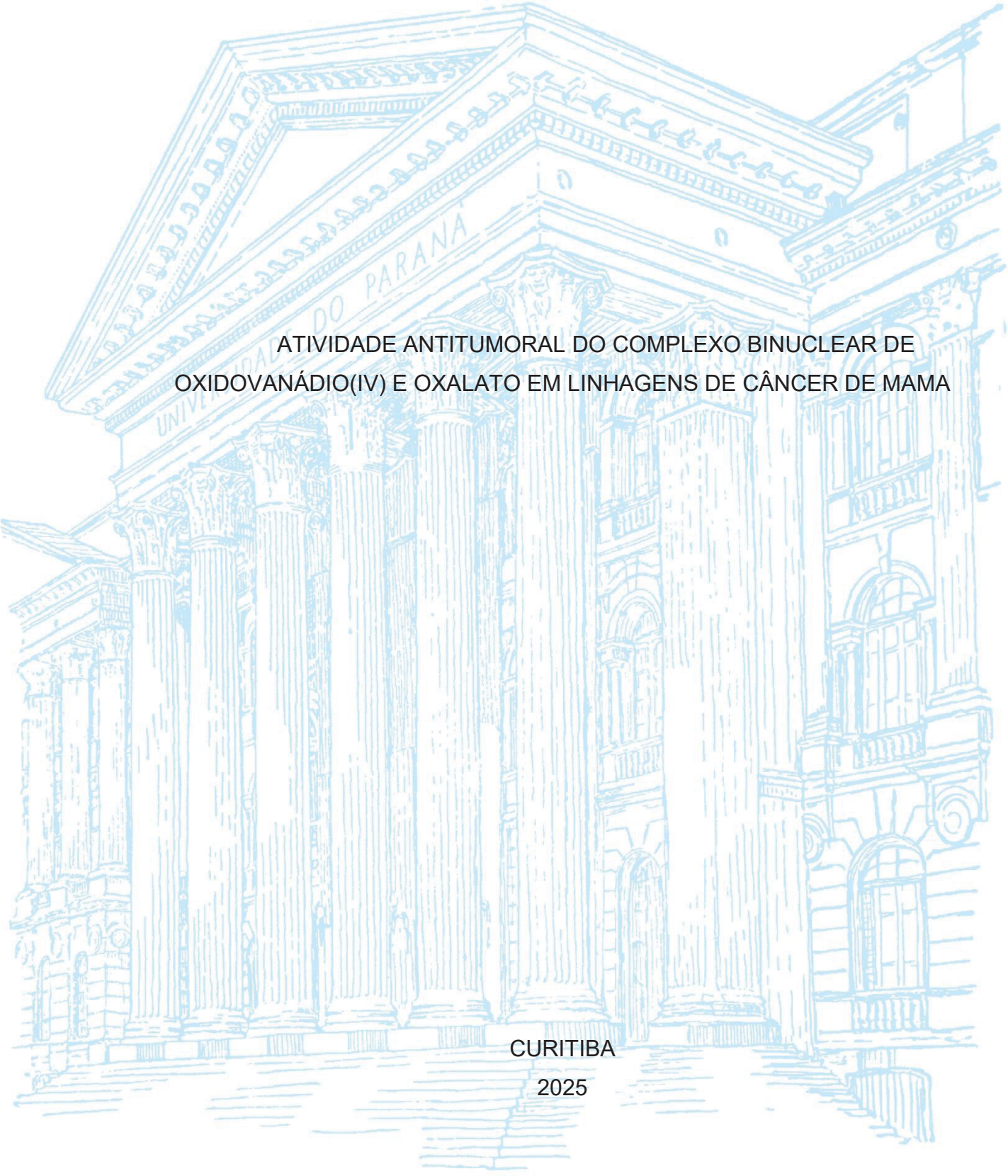
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARIN MACIEL WURZER



ATIVIDADE ANTITUMORAL DO COMPLEXO BINUCLEAR DE OXIDOVANÁDIO(IV) E OXALATO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

CURITIBA

2025

KARIN MACIEL WURZER

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO COMPLEXO BINUCLEAR DE OXIDOVANÁDIO (IV) E OXALATO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Giseli Klassen

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Giovana Gioppo Nunes

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Wurzer, Karin Maciel
Atividade antitumoral do complexo binuclear de oxidovanádio (IV) e oxalato em linhagens de câncer de mama / Karin Maciel Wurzer. – Curitiba, 2025.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Giseli Klassen.
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Giovana Gioppo Nunes.

1. Mamas - Cancer. 2. Neoplasias de mama triplo negativas. 3. Quimioterapia. I. Klassen, Giseli., 1966-. II. Nunes, Giovana Gioppo. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KARIN MACIEL WURZER**, intitulada: **Atividade antitumoral do complexo binuclear de oxidovanádio (IV) e oxalato em linhagens de câncer de mama**, sob orientação da Profa. Dra. GISELI KLASSEN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica
27/02/2025 16:48:18.0
GISELI KLASSEN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/03/2025 09:13:12.0
JULIANA FERREIRA DE MOURA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
27/02/2025 16:27:45.0
ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 424288
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp
e insira o codigo 424288

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

Agradeço a todos da minha família, principalmente ao meu pai Marcos, minha mãe Josiane, e ao meu irmão Carl. Também, ao meu namorado Gustavo e todos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando incondicionalmente.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Giseli Klassen por me guiar e me inspirar em toda essa trajetória, pelos ensinamentos, dedicação e confiança, que me ajudaram muito a crescer profissionalmente.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Giovana Gioppo Nunes, do Departamento de Química da UFPR pelos conselhos, ensinamentos e orientação em toda parte química do meu trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Lia Sumie Nakao, por toda ajuda e apoio em vários experimentos desse trabalho.

Agradeço à Mestre Bianca Rigonatto Brito pela amizade, parceria, apoio, explicação e ajuda no estudo e realização de experimentos relacionados à química.

Agradeço ao João Vitor Bariani pela amizade, parceria, apoio e ajuda nos experimentos relacionados a este trabalho.

As professoras Juliana Ferreira de Moura e Adriana Frohlich Mercadante pelo aceite do convite para participar da banca de avaliação dessa dissertação.

Agradeço à UFPR por toda a infraestrutura e equipamentos disponibilizados em especial ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioquímica e Biologia Molecular que possibilitaram a realização desse trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento que proporcionaram realizar essa pesquisa, em especial à CAPES, pela bolsa de pesquisa, ao CNPq, à Fundação Araucária e aos demais órgãos de fomento à pesquisa pelos recursos necessários à realização desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que estiveram presentes na realização deste sonho e me ajudaram nessa importante etapa da minha vida.

Obrigada!!

RESUMO

Até 2045, estima-se que ocorram 6 milhões de novos casos de câncer no mundo, dos quais 1 milhão serão de câncer de mama (CM). No brasil, dos 184 mil novos diagnósticos de câncer, quase 50 mil estarão relacionados ao câncer de mama. O subtipo de CM mais agressivo é o triplo negativo (TN) que apesar de representar em torno de 15% dos casos, não tem terapia específica e apresenta baixa taxa de sobrevivência, necessitando, portanto, de novos tipos de tratamento. Os compostos de oxidovanádio podem ter diversas formulações e muitos possuem potencial anticâncer ao ativar fatores de transcrição e vias de sinalização celular, resultando em supressão do crescimento tumoral e morte celular. Este trabalho teve por objetivo avaliar o complexo binuclear de oxidovanádio(IV) de fórmula (ET3NH)2 [{VO(OH}2)(OX)2 (μ–OX)] OR VOX2), onde ox = oxalato (V_2). Sendo assim, foi avaliada a citotoxicidade desse composto em células de câncer de mama humano MDA-MB-231, murino 4T1, luminal MCF7 e HB4a por MTT e o V_2 mostrou efeito citotóxico tanto para a linhagem controle (HB4a) quanto para as linhagens de câncer. Para a linhagem MDA-MB-231 foi realizado o protocolo do ensaio de *wound healing* e verificou-se que o composto diminui a migração celular. Porém não houve aumento da expressão de *CDH1* (gene da E-caderina) pelo ensaio de qPCR, o que significa provável ausência de efeito anti-metastático. O breve estudo de expressão gênica na linhagem TN humana identificou o aumento da expressão dos genes *BAX* e *CASP8* que significam que ocorreu apoptose e *RIPK3*, *RIPK1* e *MLKL*, sendo então sugestivo da morte celular do tipo necroptose. Foi também avaliado o estresse oxidativo nas linhagens, possuindo uma relação inversamente proporcional à toxicidade observada. Por fim, foi avaliada a combinação entre o composto e os quimioterápicos paclitaxel e doxorrubicina, mostrando um sinergismo com o V_2 para ambos na indução da morte celular.

Palavras-chave: Câncer de mama; triplo negativo, oxidovanádio(IV); bioligante; quimioterapia.

ABSTRACT

By 2045, 6 million new cancer cases are expected worldwide, of which 1 million will be breast cancer (BC). In Brazil, out of 184,000 new cancer diagnoses, nearly 50,000 will be related to breast cancer. The most aggressive BC subtype is triple-negative (TN), which, despite accounting for approximately 15% of cases, lacks specific therapy and has a low survival rate, thus requiring new treatment options. Oxidovanadium compounds can have various formulations, and many exhibit anticancer potential by activating transcription factors and cellular signaling pathways, leading to tumor growth suppression and cell death. This study aims to evaluate the binuclear oxidovanadium(IV) complex with the formula (ET3NH)2 [{VO(OH}2)(OX)2 (μ–OX)] OR VOX2), where ox = oxalate (V_2).Cytotoxicity in human breast cancer cell lines MDA-MB-231, murine 4T1, luminal MCF7, and HB4a was assessed using the MTT assay, and V_2 demonstrated cytotoxic effects on both normal and cancer cell lines. The wound healing assay was performed for the MDA-MB-231 cell line, revealing that the compound reduces cell migration. But no *CDH1* gene of e-cadherin was observed, then no ani-metastatic effect could be involved. Additionally the brief gene expression study identified increased expression of *BAX* and *CASP8* indicated apoptosis and *RIPK3*, *RIPK1*, and *MLKL* genes in the TN human cell line, suggesting necroptosis. Oxidative stress was also evaluated in the cell lines, showing an inverse relationship with the observed toxicity. Finally, the combination of the compound with the chemotherapeutic agents paclitaxel and doxorubicin was assessed, revealing a synergistic effect with V_2 for both drugs.

Keywords: Breast cancer; triple-negative; oxidovanadium(IV); bioligand; chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura química dos quimioterápicos orgânicos empregados no tratamento do câncer de mama TN.....19

FIGURA 2- Esquema demonstrativo da via intrínseca e extrínseca da apoptose.....22

FIGURA 3- Mecanismo molecular da necroptose 24

FIGURA 4- Mecanismos de necroptose e apoptose com envolvimento de ERO.....27

FIGURA 5- Mecanismo dos efeitos do vanadato (V (5+)), vanadil (V (4+)) e peroxovanadato (PV) no estresse oxidativo intracelular 31

FIGURA 6- Estrutura química da cis-diamindicloroplatina(II), cisplatina e da carboplatina 34

FIGURA 7- Estrutura do (bis-4,7-dimetil-1,10-fenantrolina sulfato-oxidovanadio(IV), Metvan 42

FIGURA 8- Fórmula estrutural do ânion decavandato $[V_{10}O_{28}]^{6-}$, denominado decavanadato ou V_{10}.....43

FIGURA 9- Diagrama ORTEP de $(Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(C_2O_4)\}_2(\mu\text{-}C_2O_4)]$, V_2, evidenciando as ligações de hidrogênio entre os cátions e o ânion.....45

FIGURA 10- Efeito citotóxico e curva de IC_{50} do V_2 sobre a linhagem controle HB4a e sobre as linhagens de câncer de mama MCF7, 4T1 e MDA-MB-231. 56

FIGURA 11- Efeito da IC_{50} do complexo V_2 na proliferação da linhagem MDA-MB-231 ao longo do tempo. 58

FIGURA 12- Expressão relativa dos genes de necroptose (*RIPK1, MLKL* e *RIPK3*), apoptose (*CASP8, BAX* e *TP53*), e metástase (*CDH1*) na linhagem MDA-MB-231.....59

FIGURA 13- Inibição da migração da linhagem MDA-MB-231 tratada com V_2.....60

FIGURA 14- Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzida pelo complexo V_2 em diferentes linhagens celulares ao longo do tempo.....61

FIGURA 15 - Inibição do estresse oxidativo pela Glutationa (GSH) na linhagem MDA-MB 231 induzida pelo complexo V_2 e H_2O_2 62

FIGURA 16- Curva de concentração dos quimioterápicos doxorrubicina (a) e paclitaxel (b) para determinação da IC_{50}. 63

FIGURA 17 - Ação sinérgica do V_2 na linhagem celular MDA-MB-231 com doxorrubicina e paclitaxel.....63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Compostos de vanádio. Comparação de diferentes IC_{50} em diferentes tipos de câncer..... 44
TABELA 2 - Origem e características das linhagens celulares de mama não tumoral (HB4a) e tumorais (MCF7, MDA-MB-231 e 4T1).....49
TABELA 3 - Iniciadores utilizados na análise de expressão gênica em células MDA-MB-231.....51
TABELA 4 - Comparação dos valores de IC_{50} nas linhagens de mama.....57

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

RE	- Receptor de estrógeno
RP	- Receptor de progesterona
RH+	- Presença de receptor hormonal
ERBB2	- Gene que codifica a proteína HER2
ERBB2+	- Superexpressão do gene ERBB
HER2	- Possui a proteína HER2
HER2+	- Superexpressão da proteína HER2
ERBB-	- Não superexpressa o gene ERBB
RE+	- Presença de receptor de estrógeno
REα	- Receptor de estrógeno alfa
TN	- Triplo Negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12
2.1 CÂNCER DE MAMA E SUBTIPOS CLÍNICOS 12
2.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR 14
2.3 METÁSTASES 16
2.4 ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO E NÃO METASTÁTICO 17
2.5 QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER DE MAMA 18
2.6 VIAS DE MORTE CELULAR 20
2.7 ESTRESSE OXIDATIVO E SUA RELAÇÃO COM A NECROPTOSE 24
2.8 SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES E MECANISMO DA GLUTATIONA 32
2.9 CONTRIBUIÇÕES DA QUÍMICA INORGÂNICA PARA A TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA 33
2.10 CLASSIFICAÇÃO DO VANÁDIO COMO ÍON DURO OU MACIO: RELEVÂNCIA PARA A BIODISPONIBILIDADE, REATIVIDADE E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS. 38
2.11 SINERGISMO DE METAIS COM QUIMIOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA 40
2.12 OXIDOCOMPOSTOS DE VANÁDIO E SEU POTENCIAL ANTICÂNCER 41
2.13 COMPLEXO BINUCLEAR DE OXIDOVANÁDIO(IV) COM LIGANTES OXALATO (V_2) 44
3.JUSTIFICATIVA 46
4.OBJETIVOS 47
4.1.1 Objetivo geral 47
4.1.2 Objetivos específicos 48
5.MATERIAL E MÉTODOS 48
5.1 CULTIVO CELULAR 48
5.2. ENSAIO DE VIABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE IC_{50} 49
5.3 CURVA DE TEMPO NA CONCENTRAÇÃO DE IC_{50} 50
5.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR 50

5.5 PCR EM TEMPO REAL..... 50
5.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO 52
5.7 ENSAIO COM GLUTATIONA (GSH)..... 52
5.8 ENSAIO DE SINERGISMO COM OS QUIMIOTERÁPICOS DOXORRUBICINA E PACLITAXEL..... 53
5.9 SÍNTESE DO COMPOSTO BINUCLEAR DE OXIDOVANÁDIO(IV) E OXALATO (V_2)..... 53
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 54
6. RESULTADOS..... 55
6.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE TEMPO..... 55
6.2 PCR EM TEMPO REAL..... 58
6.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR..... 59
6.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO 60
6.5 ENSAIO DE SINERGISMO COM OS QUIMIOTERÁPICOS DOXORRUBICINA E PACLITAXEL..... 62
7. DISCUSSÃO 64
8. CONCLUSÃO 71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 72

1.INTRODUÇÃO

Em 2022 mais de 4 milhões de mulheres morreram em decorrência de câncer no mundo, sendo que destas, mais de 600 mil por causa do câncer de mama (CM). No Brasil, das 132.000 mulheres que morreram em decorrência de câncer, 22.000 foram a óbito em decorrência do CM, o que reforça a importância de estratégias mais eficazes de tratamento para reduzir a mortalidade associada a essa doença (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2022).

O câncer de mama é dividido em quatro subtipos moleculares: Luminal A e Luminal B, que são menos agressivos (tratados por terapia hormonal), HER2 positivo (tratado com anticorpo trastuzumab) e triplo negativo, o mais agressivo, sendo tratado somente com quimioterápicos (NEDELJKOVIĆ. M, *et al.* 2019), (BIANCHINI. G, *et al*. 2016).

A síntese de compostos químicos com potencial atividade anti-tumoral têm sido fonte de novos quimioterápicos mais eficientes, com menos efeitos colaterais. Compostos contendo o grupo oxidovanádio, $(V{=}O)^{2+}$, possuem atividades promissoras em diferentes estágios da carcinogênese, apresentando excelentes resultados em estudos *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se capazes de reduzir o número de tumores por animal (CARVALHO. F, *et al.* 2023). Neste trabalho, o objetivo foi estudar o efeito citotóxico e anti-metastático de um complexo binuclear de oxidovanádio(IV) contendo oxalatos como ligantes (V_2) em células de câncer de mama, o provável mecanismo molecular de ativação de morte celular, além do sinergismo entre o composto de vanádio com quimioterápicos já conhecidos como paclitaxel e doxorrubicina.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA E SUBTIPOS CLÍNICOS

De acordo com o Globocan, até 2050, irão ocorrer mais de 7 milhões de mortes por câncer entre as mulheres, sendo que destes mais de 1 milhão será

devido ao CM. Já no Brasil, as estimativas mais recentes fornecidas pelo INCA abrangem o triênio 2023-2025, durante o qual serão esperados aproximadamente 74.000 novos casos de câncer de mama por ano (Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2025).

A mama é composta por glândulas de tamanhos e densidades variáveis, estando localizadas superficialmente ao músculo peitoral maior. As células produtoras de leite localizam-se em lóbulos, estando intercalados com tecido adiposo. O leite é produzido na estrutura celular denominada de ácino, sendo excretado por meio de ductos que terminam no mamilo (BISWAS. S, *et al.* 2022). Os tumores malignos da mama são adenocarcinomas (96%) e raramente sarcomas (4%), sendo divididos em in situ ou invasivos. No primeiro tipo ocorre uma proliferação neoplásica que fica limitada aos ductos ou aos lóbulos pela membrana basal, sendo denominado *in situ*. Já o carcinoma invasor atravessa a membrana e alcança o estroma (YODER, *et al.* 2007). A histologia mais comum do CM é o carcinoma ductal invasivo (CDI), abrangendo de 50 a 75% dos cânceres. O CDI se inicia em um ducto mamário, rompe a parede desse ducto e cresce no tecido adiposo da mama, podendo se metastizar para outras partes do corpo por meio do sistema linfático e da circulação sanguínea. Já o tipo lobular invasivo representa cerca de 5 a 15% de todos os CM invasivos e costuma ser mais difícil de ser detectado no exame físico e nos exames de imagens e mamografia (ARPS. D, *et al*. 2013).

Existem alguns fatores de risco que podem conferir maior susceptibilidade ao desenvolvimento do CM, sendo demonstrado que 5 a 10% dos casos podem ser atribuídos ao histórico familiar e mutações genéticas. Neste caso, a maioria dos pacientes carrega uma mutação em *BRCA1* e/ou *BRCA2*, sendo genes associados ao reparo do DNA e ativação do ponto de verificação do ciclo celular respectivamente (CLUSAN. L, *et al*. 2023). O restante é atribuído a fatores como idade avançada, histórico de lesões mamárias, alta densidade mamária, diabetes tipo 2, dieta com alto teor de gordura e pobre em fibras, obesidade, ingestão recorrente de bebidas alcoólicas, exposição a radiação ionizante, tabagismo, uso de hormônios, gestação tardia ou ausente, menarca precoce, menopausa tardia (LOIBL. S, *et al*. 2021).

Ainda, o CM possui um estadiamento de I-IV, em que IV indica metástase distante e I é definido como um tumor de mama menor que 2 cm, sem envolvimento de linfonodos, sendo que nos estágios IV tem sobrevida global diminuída (WAKS. A, *et al.* 2019).

2.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

Até pouco tempo, a classificação histológica isoladamente não atendia as demandas por entendimento dos mecanismos moleculares do CM. Esse cenário começou a ser alterado tendo como base os estudos de expressão gênica de Perou, *et al.* (2000), em que foram analisados 8 mil genes dando origem à classificação molecular atual do CM, o qual pode ser dividido em 4 subtipos, sendo eles: luminal A e B, HER2 positivo e triplo negativo (SHAATH. H, *et al.* 2021).

Os subtipos luminais são os mais comuns, cerca de 70% dos casos, em comparação com os 15% dos outros subtipos. Os subtipos luminais apresentam o melhor prognóstico com expressão do receptor de estrógeno (RE) ou receptor de progesterona (RP) em pelo menos 1% das células tumorais, sendo denominados como RH+. A terapia envolve o uso de agentes endócrinos orais, ingeridos diariamente durante 5 anos. Dentre os agentes endócrinos está o tamoxifeno, o qual inibe competitivamente a ligação do estrógeno ao seu receptor, sendo eficaz em mulheres na pré e pós menopausa. Cinco anos de tamoxifeno para pacientes com câncer de mama RH+ reduzem a taxa de recorrência do câncer de mama em aproximadamente 50% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico, em comparação com nenhuma terapia endócrina.

Ainda, os inibidores de aromatase, como o anastrozol, exemestano e letrozol, agem inibindo a conversão de andrógenos em estrógeno, sendo eficaz para mulheres na pós menopausa. Porém, existem efeitos colaterais associados a essas terapias, sendo as mais comuns calorões, artralgias ou mialgias e menos comuns doenças tromboembólicas, no caso do uso do tamoxifeno e osteoporose e fratura de início recente no caso dos inibidores de aromatase (WAKS. A, *et al.* 2019).

O subtipo Luminal pode ser subdividido em A ou B, sendo que o subtipo A tem origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares, com

presença de RE e RP em grande quantidade de células, e ausência de superexpressão HER2. Os subtipos luminal A ou B correspondem a cerca de 30 a 40% dos casos e a avaliação de Ki67, um marcador de proliferação celular, é baixa.

Já o subtipo luminal B, ocorre em cerca de 20 a 30% dos CM, também se origina em células epiteliais luminais ricas em RE e RP, porém a proteína HER2 pode ser detectada e o ritmo de proliferação avaliado pelo Ki67 é mais elevado, sendo assim de pior prognóstico em relação aos tumores luminal A (ONKAR. S, *et al.* 2022). Com isso, esse subtipo pode adquirir maior resistência ao medicamento tamoxifeno, se beneficiando da associação entre quimioterápicos e antiestrogênicos (KENNECKE, *et al*. 2010).

O terceiro subtipo apresenta superexpressão do HER-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2), que tem superexpressão do gene *ERBB2* e está associado a um prognóstico ruim na ausência de terapia sistêmica, representando de 15 à 20% dos casos. Tumores com amplificação ou superexpressão do gene *ERBB2* são ERBB2+. Pacientes com câncer de mama amplificado ou superexpresso por *ERBB2* possuem terapia específica, com os anticorpos anti-HER2 (como trastuzumabe e pertuzumabe), direcionados ao domínio extracelular da proteína HER2, e inibidores de tirosina quinase como lapatinibe e neratinibe.

O estudo de WAKS. A, *et al.* (2019) destaca que o transtuzumabe possui eficácia comprovada em tratamentos com regimes adjuvantes e neoadjuvantes à quimioterapia em pacientes com baixo risco com tumores menores que 2 cm e linfonodos negativos, evidenciando o quimioterápico paclitaxel. Por outro lado, o autor destaca que pertuzumabe e neratinibe oferecem benefícios adicionais em cenários mais específicos (alto risco e características hormonais), sendo que suas indicações são limitadas por toxicidade, custo e ausência de benefícios claros na sobrevida global. Sendo assim, o tratamento atualmente é ajustado conforme o risco, balanceando eficácia e efeitos adversos.

Por fim, cerca de 15% dos cânceres de mama são TN, não possuem terapia específica, e apenas 30% das pacientes sobrevivem mais que 5 anos depois do diagnóstico. Isso ocorre pelo fato de não possuírem receptores de estrógeno e progesterona, o que significa que a terapia hormonal padrão é ineficaz e não superexpressa HER2, portanto, as terapias com anticorpos monoclonais também

não são apropriadas (RAYOL. M, *et al*. 2022). Além disso, os casos de TN demonstram uma taxa de proliferação rápida e ao contrário dos outros subtipos, as curvas de sobrevivência mostram um aumento inicial na recidiva e uma diminuição subsequente na sobrevivência dentro dos primeiros 3 a 5 anos após o diagnóstico, sendo o tratamento atual padrão baseado na quimioterapia com taxanos e antraciclinas como por exemplo paclitaxel e doxorrubicina (CAPUOZZO. M, *et al*. 2024). Sendo assim, como o reparo deficiente de danos ao DNA está presente na maioria dos TN, os estudos com quimioterapia a base de platina têm sido de grande interesse

2.3 METÁSTASES

As metástases compreendem a causa de 90% das mortes associadas ao câncer e ocorrem quando uma célula cancerosa do tumor primário invade localmente o tecido circundante, adentra a microvasculatura do sistema linfático e sanguíneo, transloca-se para tecidos distantes, onde se adapta e prolifera, dando origem a um tumor secundário (CHAFFER. L, *et al.* 2011). Para que este processo ocorra, as células metastáticas devem adquirir algumas características, como por exemplo perda ou diminuição na expressão de genes responsáveis pela adesão entre células adjacentes ou entre células e a matriz extracelular (MEC), como por exemplo a E-caderina (gene *CDH1*) (HANAHAN. D, *et al.* 2011). Além disso, a expressão gênica das metaloproteases de matriz (MMP) 2 e 9, também contribui para as metástases uma vez que são responsáveis pela degradação da MEC e invasão de células cancerígenas.

Numerosos estudos associaram a inibição de MMPs por inibidores sintéticos e naturais com uma inibição correspondente da invasão celular (DERYUGINA. E, *et al*. 2006). A distribuição de células tumorais pelo organismo não é um processo aleatório, onde a quimio-atração entre moléculas expressas pelo tumor e por moléculas expressas em diferentes locais do corpo, se torna um evento importante no desencadeamento das metástases (SUN. X, *et al*. 2010).

Pacientes com câncer de mama podem apresentar metástases mais frequentemente, ósseas, pulmonares, hepáticas e cerebrais, o que é denominado

heterogeneidade metastática, levando à diferentes respostas ao tratamento e prognóstico da paciente. A sobrevivência das pacientes varia de acordo com o órgão afetado, sendo em média a sobrevida global de 5 anos para metástases ósseas, pulmonares, hepáticas e cerebrais. Também, existe uma correlação entre os subtipos e as metástases, uma vez que subtipos mais agressivos como o TN tendem a ser mais suscetíveis (IBRAGIMOVA. M, *et al.* 2023) ;(LIANG. Y, *et al*. 2020).

2.4 ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO E NÃO METASTÁTICO

O CM é extremamente heterogêneo o que dificulta um bom diagnóstico e prognóstico. Com isso, a diferenciação entre o CM metastático e não metastático é importante para definir a abordagem terapêutica a ser seguida. Para o CM não metastático, os principais objetivos da terapia são erradicar o tumor da mama e dos linfonodos regionais e prevenir as metástases. Com isso, o tratamento para CM não metastático encontra-se na terapia sistêmica e/ou local. A terapia local está associada a ressecção cirúrgica do tumor ou retirada de linfonodos axilares, podendo ocorrer radiação pós-operatória. Já a terapia sistêmica pode ser de 2 tipos: pré-operatória (neoadjuvante) ou pós-operatória (adjuvante) ou ambas, sendo determinada pelo subtipo.

Para o RH+, orienta-se a terapia endócrina, sendo que alguns pacientes necessitam de quimioterapia. Já para HER2+ a terapia é baseada em anticorpos dirigida à essa proteína à base de trastuzumabe concomitantemente com quimioterapia com possibilidade de terapia endócrina se houver juntamente RH+.

Já para o CM metastático, também ocorre a terapia local, com processos cirúrgicos e radiação, porém são utilizadas como paliativo. Para o CM metastático com RH+/*ERBB2*- o tratamento baseia-se em terapia endócrina associada com um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) 4/6, como por exemplo abemaciclibe, palbociclibe ou ribociclibe, sendo que após adquirirem resistência à terapia endócrina, utiliza-se a quimioterapia com enfoque na quimioterapia

combinada ao invés de terapia com agente único, garantindo menor toxicidade e melhor qualidade de vida.

No caso do CM metastático triplo-negativo, a quimioterapia é a única opção (WAKS. A, *et al.* 2019). Outra abordagem terapêutica para o CM, principalmente para o TN é a terapia imunológica, uma vez que a descoberta de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL's) no CM demonstrou o caráter imunogênico como um fator benéfico para esse tipo de terapia.

A análise de amostras de tumores mamários revelou que indivíduos com subtipos HER2 e tumores TN apresentaram maior número de TIL's do que aqueles com subtipos RH+. Diferentes alvos podem estar envolvidos no combate a subtipos específicos do CM, como por exemplo a inibição das vias envolvidas em sobrevivência celular sendo elas PI3K, AKT e mTOR, inibição de cinases dependentes de ciclina (CDK4/6) e linfócitos infiltrantes (TILs). Já no caso do TN, abordagens mais específicas podem ser adotadas, incluindo o bloqueio de ponto de verificação imunológico envolvendo PD-1 e PL-1 com atezolizumabe e pembrolizumabe, inibidores de VEGF e angiogênese (YE. F, *et al.* 2023).

2.5 QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER DE MAMA

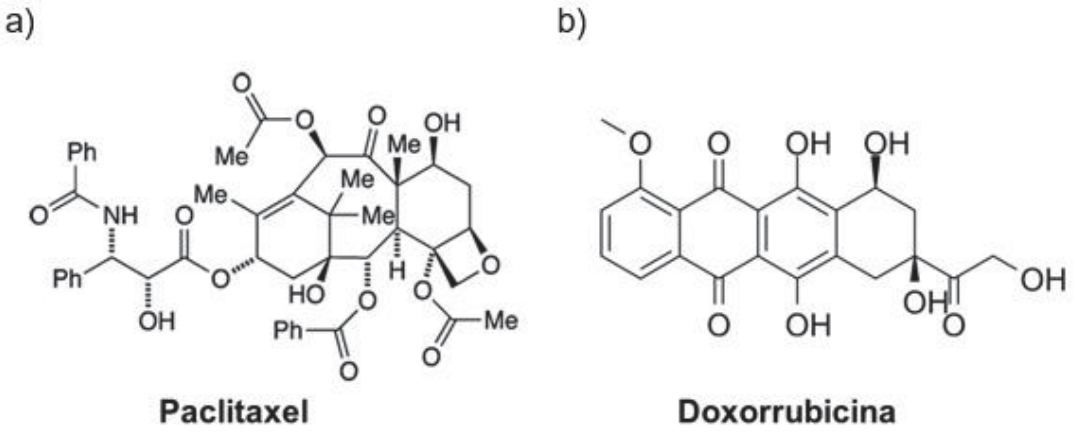
Apesar dos riscos associados a curto e longo prazo, a quimioterapia continua sendo essencial para prevenir a recorrência em pacientes com CM em estágios I-III. É a única terapia sistêmica com eficácia demonstrada no câncer de mama TN e um adjuvante importante à terapia endócrina ou à terapia direcionada a HER2+. Um estudo de aproximadamente 100.000 mulheres inscritas em ensaios randomizados de quimioterapia para CM precoce demonstraram que um regime de quimioterapia contendo antraciclina em altas doses, em comparação com nenhuma quimioterapia, reduziu significativamente a mortalidade por câncer de mama em 10 anos em aproximadamente um terço, assim como a terapia endócrina adjuvante para tumores RH+ (CURIGLIANO. G, *et al*. 2023).

Os tratamentos com quimioterapia para o câncer de mama podem ocorrer tanto no pré-operatório (primário ou neoadjuvante) quanto no pós-operatório (adjuvante). Esses tratamentos são definidos levando em consideração fatores

clínicos e biológicos do tumor além das características do paciente. Sendo assim, os principais critérios incluem: estadiamento do tumor e extensão da doença, subtipo molecular do tumor. Os quimioterápicos de escolha geralmente incluem ciclofosfamidas, agentes de platina como por exemplo a carboplatina e cisplatina, taxanos como o paclitaxel e as antraciclinas como a doxorrubicina (Figura 1) (CURIGLIANO. G, *et al*. 2023). O paclitaxel e a doxorrubicina são dois agentes quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, especialmente no câncer de mama, possuindo mecanismos de ação distintos (SLEDGE. W, *et al*. 2003).

O paclitaxel, inicialmente chamado de taxol, é um composto diterpenoide natural extraído do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, uma árvore nativa dos Estados Unidos, descoberto em 1970. Como um agente anti-microtúbulo, o paclitaxel promove a montagem de microtúbulos, aumenta a atividade dos dímeros de tubulina e estabiliza os microtúbulos existentes, ao mesmo tempo que inibe sua desmontagem. A estabilidade aumentada dos microtúbulos na presença de paclitaxel resulta na parada do ciclo celular na fase G2, levando à inibição da replicação celular. Além disso, o paclitaxel pode distorcer os fusos mitóticos e levar à fragmentação dos cromossomos (FARRAR. M, *et al.* 2023).

FIGURA 1- Estrutura química dos quimioterápicos orgânicos empregados no tratamento do câncer de mama TN, paclitaxel (a) e doxorrubicina (b). Fonte: (FARRAR. M, *et al.* 2023).



A doxorrubicina é um medicamento antraciclínico extraído pela primeira vez do *Streptomyces peucetius var. caesius* na década 1970, atuando na célula na interrupção do reparo do DNA mediado pela topoisomerase II e geração de radicais livres, gerando danos às membranas celulares, DNA e proteínas (THORN. C, *et al.* 2011).

Porém, estes quimioterápicos apresentam efeitos colaterais severos, incluindo sinais de toxicidade imediata e crônica. Os sintomas agudos incluem fadiga, náuseas, vômitos, diarréria intensa, perda de cabelo, feridas na mucosa oral, dormência em mãos e pés, perda de memória e alterações gastrointestinais graves (SCHIRRMACHER. V, *et al.* 2018). Já os efeitos crônicos incluem cardiotoxicidade, neurotoxicidade, paralisia, coma, mielossupressão e neuropatia periférica, o que limita a eficácia dos regimes de tratamento (MARUPUDI. N, *et al.* 2007). Estudos demonstram que a quimioterapia combinada, na qual dois ou mais medicamentos anticâncer são coadministrados, pode superar esse problema porque o sinergismo leva a diminuição da dose do quimioterápico, além de reduzir a resistência, tornando interessante sua combinação com novos compostos (HESTI. W, *et al.* 2024).

2.6 PRINCIPAIS VIAS DE MORTE CELULAR

O equilíbrio entre a proliferação e morte celular (MC) é essencial para manutenção da homeostase fisiológica e para defesa contra lesões e mutações. Sendo assim, pode-se dividir as vias de MC em duas: morte acidental decorrente de lesões como a necrose ou apoptose e morte regulada envolvidas no desenvolvimento do organismo e renovação tecidual, como por exemplo, a apoptose e necroptose. No caso do câncer, ocorre a inativação dessas vias, impedindo a morte de células mutadas ou danificadas o que permite a sobrevivência de células geneticamente instáveis, facilitando a progressão tumoral (TONG. X, *et al.* 2022).

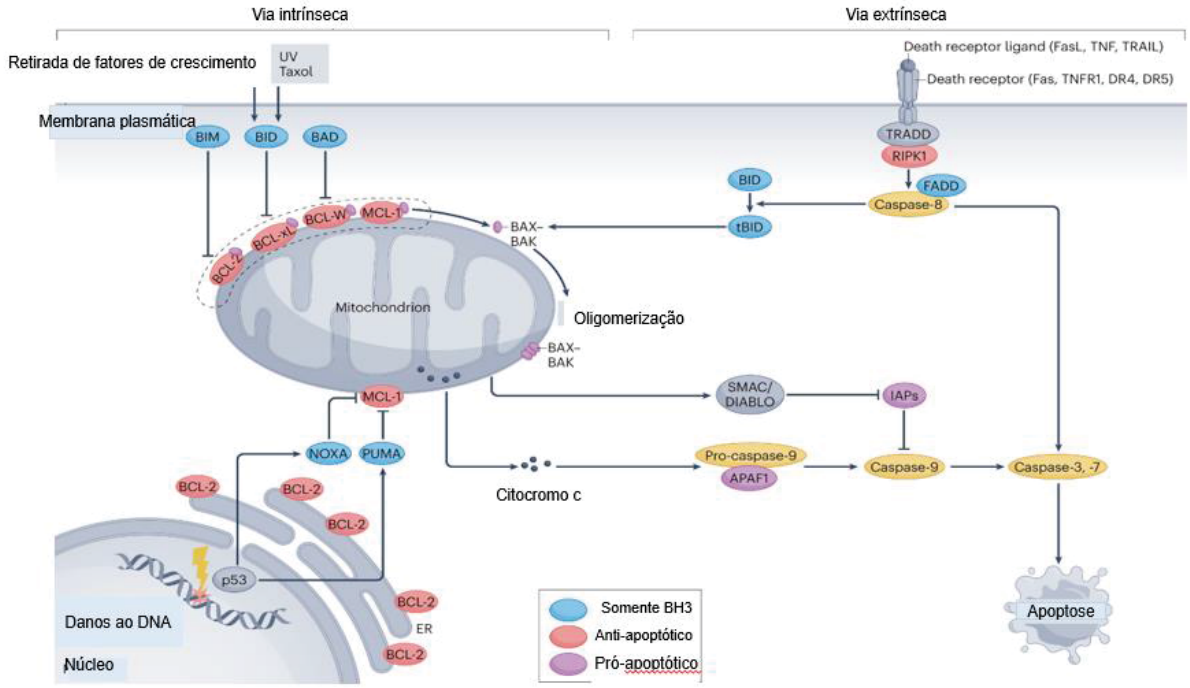
A morte acidental decorrente de lesões irreversíveis como por exemplo isquemia, exposições a substâncias tóxicas, infecções e trauma, leva a célula a um processo de morte patológica chamado de necrose. As principais características

desse tipo de morte incluem perda da integridade da membrana, expansão do conteúdo citoplasmático devido ao desequilíbrio iônico, processo inflamatório, dano mitocondrial severo com depleção de ATP, tumefação celular, eosinofilia decorrente da perda de RNA citoplasmático e das proteínas citoplasmáticas desnaturadas e figuras de mielina provindas de fosfolipídios de membranas plasmáticas lisadas. Ainda, ocorrem alterações nucleares, como encolhimento (picnose) fragmentação (carioréxis) sendo que com o passar do tempo, o núcleo vai desaparecendo gradualmente (cariólise) (YUAN. J, *et al.* 2023).

O mecanismo de morte após uma lesão irreversível além da necrose, também pode ser por apoptose. Apesar de possuírem características distintas, a necrose e apoptose podem coexistir em um mesmo tecido, o que leva a célula a optar por um ou outro mecanismo depende de fatores como intensidade da lesão e dos receptores que são acionados. A apoptose depende de ATP e, por isso, as agressões que a provocam não podem bloquear completamente a produção de energia, caso contrário ocorrerá necrose (YUAN. J, *et al*. 2023). Ao contrário da necrose a apoptose, um tipo de morte celular regulada, é caracterizada morfologicamente por encolhimento celular provindos da eliminação de eletrólitos e água por meio de canais específicos, incluindo aquaporinas, condensação da cromatina, formação de bolhas na membrana, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, podendo ser dividida em duas vias: a via extrínseca e a intrínseca.

A via extrínseca é estimulada por moléculas tais como o fator de necrose tumoral (TNFα), ligante Fas (FasL) ou ligante indutor de apoptose ligado ao TNF (TRAIL) aos receptores de superfície celular que são TNF1(TNFR1), Fas e receptor de morte (DR4/5), respectivamente. Isso leva à ativação da caspase-8, que induz a apoptose por duas vias: ativação direta de caspases efetuadoras 3, 6 e 7, responsáveis pelo aumento de atividades de proteases que completam o processo, independente da participação das mitocôndrias. Sendo que a segunda via se dá pela clivagem da proteína pró-apoptótica BID originando um fragmento que se liga as proteínas BCL2 resultando em aumento da permeabilidade mitocondrial, onde inicia-se a via intrínseca (Figura 2) (PENG. F, *et al*. 2022; YUAN. J, *et al*.2023).

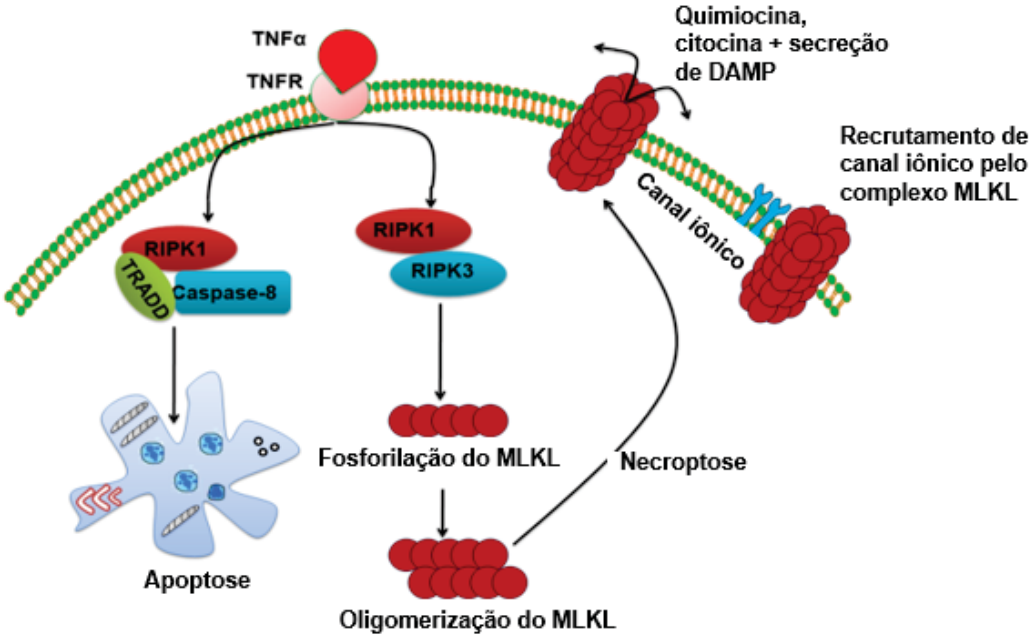
FIGURA 2 - Esquema demonstrativo da via intrínseca e extrínseca da apoptose. Fonte: (YUAN. J, *et al.* 2023).



A via intrínseca é mediada pelas mitocôndrias, pois quando são agredidas por inúmeros agentes, sofrem aumento da permeabilidade da membrana externa e liberam no citosol moléculas pró-apoptóticas. Essas moléculas pró-apoptóticas são: citocromo C que se associa no citosol à APAF1, forma o complexo denominado de apoptossomo, que por sua vez ativa a caspase 9, dando origem a “roda da morte”, iniciando assim a apoptose. A proteína SMAC/DIABLO, responsável por inibir a IAP (inibidora natural da apoptose), permite a ativação de caspases. O AIF (*apoptopsis inducing factor*) que ativa a caspase 9 e algumas endonucleases. Ainda, existem muitas moléculas no citosol que atuam estimulando ou inibindo a apoptose, como por exemplo a proteína antiapoptótica BCL-2 cuja função principal é impedir a liberação do citocromo C das mitocôndrias, o que bloqueia a ativação da cascata de caspases. Existe também as proteínas pró-apoptóticas como a proteína BAX, que possui um domínio que se liga a BCL2 e induz a abertura dos poros, e saída do citocromo C, SMAC e AIF, induzindo a apoptose (Figura 2) (YUAN. J, *et al*. 2023).

Outra via de morte celular regulada é a necroptose, sendo caracterizada como mecanismo de morte celular programada necrótica. Morfologicamente esse tipo de morte se assemelha a necrose pois ocorre perda de ATP, tumefação celular e de organelas, liberação de enzimas lisossomais e ruptura da membrana plasmática. É uma morte altamente regulada, envolvendo proteínas da família de quinases RIPK (receptor de interação com proteína quinase), sendo eles RIPK1, RIPK3 e a pseudocinase MLKL (proteína semelhante ao domínio da quinase de linhagem mista). Quando a atividade da caspase-8 é inibida, as proteínas RIPK1 e RIPK3 formam um complexo chamado necrossoma, que promove a fosforilação da MLKL**.** A MLKL fosforilada oligomeriza e transloca-se para a membrana plasmática, onde forma poros ou recruta canais iônicos. Isso resulta na liberação de moléculas intracelulares, incluindo DAMPs (padrões moleculares associados a danos), quimiocinas e citocinas, promovendo inflamação. A necroptose aproxima-se da apoptose pois é desencadeada por eventos de transdução de sinal, porém sem ativação das caspases. No caso da ativação da via apoptótica, após a ligação do TNF-α ao receptor TNFR, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, como TRADD e RIPK1, que ativam a caspase-8, resultando na apoptose (Figura 3) (DHURIYA. Y, *et al*. 2018; DEL RE. D, *et al*. 2019).

FIGURA 3 - Mecanismo molecular da necroptose. Fonte: (DHURIYA. Y, *et al*. 2018).



2.7 ESTRESSE OXIDATIVO E SUA RELAÇÃO COM A NECROPTOSE

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas que caracterizam por possuírem no mínimo um átomo de oxigênio, mas que possuem atividade muito elevada quando comparadas com o O_2 molecular. Os ERO incluem radicais livres (oxigênio singlete, radical hidroxila e superóxido) e uma espécie não radical, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RAUF. A, *et al*. 2023).

Essas espécies são instáveis pois contém um ou mais elétrons desemparelhados e podem reagir com outras moléculas, seja doando seu elétron desemparelhado ou retirando-o de outra molécula para aumentar a estabilidade. Dessa forma, o radical livre converte a molécula ao qual ele reagiu em outro radical livre, originando um processo em cadeia. Nos eucariontes os ERO são produzidos principalmente por reações bioquímicas nas mitocôndrias.

As enzimas NADPH oxidades (NOXs) e a cadeia transportadora de elétron mitocondrial são as principais fontes enzimáticas endógenas de superóxido e peróxido de hidrogênio. No entanto, os ERO também vêm de fontes como peroxissomos, xantina oxidase (XO), lipo e ciclooxigenase e citocromo P450 no retículo endoplasmático. Nas mitocôndrias, os níveis fisiológicos de superóxido e peróxido de hidrogênio participam de reações de oxidorredução, porém em

situações de estresse oxidativo, sua produção é aumentada, levando a um desequilíbrio entre a produção de ERO e ação do sistema de defesa antioxidante (JUAN. C, *et al*. 2021). ERO são moléculas de sinalização que induzem diferenciação celular e apoptose, contribuindo para o processo natural de envelhecimento. Participam também de contrações musculares, regulação do tônus muscular e ainda possuem atividade bactericida.

O oxigênio molecular (O_2) é a principal fonte de ERO nas células. No processo normal de respiração celular, na cadeia transportadora de elétrons a intenção é a redução da molécula de O_2 para produzir água. Com isso, o O_2 é reduzido a H_2O com aceitação de 4 elétrons e 4 prótons. Como os elétrons são passados um a um, ocorrem fases intermediárias. No processo de aceite do primeiro elétron pelo O_2, ocorre a formação de superóxido e este é reduzido pelo segundo elétron originando o peroxido de hidrogênio, H_2O_2. Esta espécie é então reduzida pelo terceiro elétron resultando em H_2O e na radical hidroxila, que por sua vez é reduzida pelo quarto elétron formando a segunda molécula de água. (JUAN. C. A, *et al*. 2021).

Os elétrons que escapam da cadeia de transporte de elétrons, na membrana interna da mitocôndria reagem com o oxigênio para produzir um ânion superóxido. Este ânion é instável e não pode atravessar membranas, mas é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio, que é permeável à membrana. O superóxido pode participar da reação de Haber-Weiss para formar o radical hidroxila. Este radical também pode ser formado na presença de metais de transição, na reação de Fenton.

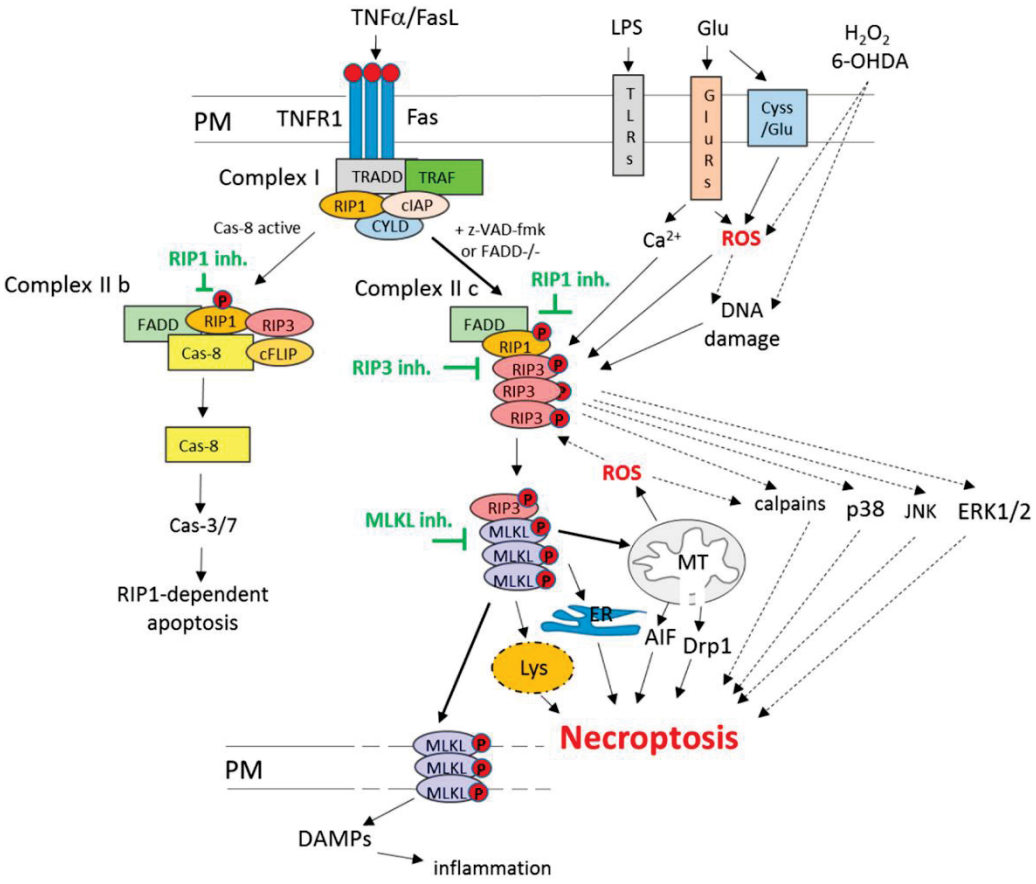
O processo de aumento anormal de produção dos ERO se dá por diversos fatores dentre eles: exposição excessiva à radiação UV, condições de estresse a longo prazo, exercício físico intenso, dieta inadequada, uso de estimulantes e pelo metabolismo de drogas e xenobióticos. A produção excessiva de ERO leva ao estresse oxidativo o que causa danos a nível celular e molecular, provocando agregação e desnaturação proteica, peroxidação de lipídios e danos ao DNA e DNA mitocondrial, levando à processos de morte celular (MC) como por exemplo a necroptose. O mecanismo que envolve essa morte celular induzida por ERO está

demonstrado na figura 4, em que a morte celular dependente de RIPK1 pode ser induzida por meio da ativação da via do receptor de morte.

Na primeira etapa, TNFα ou FasL, por meio da ligação ao respectivo receptor (TNFR1 ou Fas), aciona a montagem do complexo I (TNFR1, TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAPs e CYLD). Sob indisponibilidade de TRADD ou cIAPs, o complexo II b é formado (RIPK1, RIPK3, FADD e caspase 8), que induz a apoptose dependente de RIPK1.

Outro cenário é iniciado quando a caspase-8 ou FADD são deficientes, então o complexo II c (necrossomo) construído a partir de RIPK1-RIPK3 é formado. Subsequentemente, ele fosforila e recruta MLKL, que oligomeriza em membranas plasmáticas ou de outras organelas intracelulares (mitocôndrias, ER, lisossomos), levando a seus danos e morte celular por necroptose. Além disso, a perfuração da membrana plasmática evoca a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que induz resposta inflamatória no tecido circundante. Entre outros indutores de necroptose, os seguintes podem ser listados: lipopolissacarídeos (LPS), receptores do tipo TLR, ERO, danos ao DNA, excitotoxicidade e sobrecarga de cálcio. Além de MLKL, entre outros executores de necroptose, ROS, AIF, Drp-1, JNK, p38, ERK1/2, calpaínas e enzimas lisossomais podem ser mencionados (Figura 4) (JANTAS. D, *et al.* 2021).

FIGURA 4 - Mecanismos de necroptose e apoptose com envolvimento de ERO. Fonte: (JANTAS. D, *et al.* 2021)



Diversos estudos apontam que o acúmulo de ERO pode induzir a necroptose por meio da ativação de vias sinalizadoras específicas, enquanto a própria necroptose pode aumentar a produção de ERO, estabelecendo um ciclo de feedback positivo (JINAWONG. K, *et al*. 2020). Uma dessas vias sinalizadoras é a via do NF-kB, responsável pela sinalização celular na resposta à estímulos como inflamação, estresse, infecção, danos ao DNA e presença de ERO (GAO.S*, et al.* 2021).

Em condições normais, proteínas inibidoras se ligam ao NF-κB e impedem sua translocação para o núcleo, mantendo-o inativo no citoplasma, porém quando há sinalizações externas, essas proteínas são fosforiladas e o NF-kB é liberado e então adentra o núcleo. Uma vez no núcleo, NF-κB se liga a sequências específicas no DNA e promove a transcrição de genes importantes, sendo um deles relacionado à morte celular necroptótica, o *RIPK3*.

GAO, *et al.* (2021), por meio da proteômica de locus genômico, rastreou fatores de transcrição e proteínas regulatórias associadas ao locus *RIPK3* em células endoteliais murinas. Os autores descobriram 41 proteínas nucleares que são especificamente enriquecidas no locus *RIPK3*, incluindo os componentes da via de sinalização NF-kB, além de verificarem que existem proteínas que compõe essa via que se ligam diretamente ao promotor *RIPK3*, prevenindo sua transcrição.

Além disso, condições patológicas como diabetes mellitus, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer têm sido associadas à necroptose mediada por ERO. Segundo ADAMEOVA, *et al*. (2022), o diabetes mellitus caracteriza-se por apresentar um desequilíbrio no sistema redox, e isso pode desencadear necroptose como um mecanismo primário de morte de células de ilhotas pancreáticas.

Em estudo de JINAWONG *et al*. (2020), a inibição da necroptose desencadeadas por ERO, por meio do uso do antidiabético metformina melhorou a função cognitiva e morfologia cerebral, além de prevenir complicações metabólicas induzidas pela obesidade em vários modelos de camundongos. Além de contribuir para a resistência à insulina por meio da sinalização associada à de necroptose, o estresse oxidativo também favorece a ocorrência de dano aterosclerótico, de fato, macrófagos submetidos a LDL oxidado foram suscetíveis à morte por necroptose mediada por *RIPK3* (JINAWONG. K, *et al*. 2020).

Mais suporte vem de outro estudo mostrando que placas aterogênicas aumentaram a expressão de *RIPK3* e *MLKL* em comparação com paredes arteriais saudáveis (KARUNAKARAN. D, *et al.* 2016).

A necroptose também está associada à disfunção cardíaca pois segundo LIANG. W, *et al.* 2017 e WANG.C, *et al.* 2022, análises in vitro e in vivo mostraram que o pré-tratamento de células de mioblastos H9c2 com N-acetilcisteína (NAC) um medicamento antioxidante, atenuou o dano oxidativo celular induzido pela doxorrubicina ao mesmo tempo que inibiu a necroptose ao regular negativamente a expressão de *RIPK3*.

Além disso, em um modelo de rato de insuficiência cardíaca, o pré-tratamento com NAC aliviou a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, atenuou o aumento de ERO e atenuou a ativação da morte celular necroptótica, conforme

evidenciado pelos níveis reduzidos de *RIPK1, RIPK3* e *MLKL*. Ainda, a ativação de *RIPK3* induzida por dano cardíaco vindo de isquemia também elevou o estresse retículo sarcoplasmático pela produção de ERO levando à permeabilidade mitocondrial e morte necroptótica de cardiomiócitos (ADAMEOVA. A, *et al*. 2022).

Além dessas patologias, a necroptose é relacionada como a principal causa de morte neuronal em doenças degenerativas. Tal suposição foi apoiada por características bioquímicas e morfológicas das células afetadas, bem como pelo fato de que vários inibidores de necroptose eram neuroprotetores em modelos celulares e animais de doenças neurodegenerativas.

Na doença de Huntington, a degeneração relacionada à citotoxicidade de neurônios espinhosos está associada a defeitos dos complexos de cadeia transportadora de elétrons mitocondriais, resultando em estresse oxidativo e morte celular (DAMIANO. M, *et al.* 2010).

Já na doença de Parkinson, o estresse oxidativo, que induz a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, está associado com uma diminuição de sistemas antioxidantes, aumento liberação aprimorada de glutamato, perturbação na homeostase de cálcio e defeito na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (TRIST. B, *et al.* 2019; DIONÍSIO. P, *et al.* 2021).

Além disso, os ERO também estão envolvidos na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) sendo caracterizada pela degeneração seletiva dos neurônios motores, que está ligada ao aumento no influxo de Ca^{2+}, mutação de *SOD1* e defeitos na cadeira transportadora de elétrons mitocondrial, levando ao estresse oxidativo e à morte do neurônio motor (TAN. W, *et al.* 2014). Já no câncer, por exemplo, compostos químicos que aumentam as ERO intracelulares foram capazes de induzir a necroptose, enquanto inibidores de RIPK1, RIPK3 e antioxidantes bloquearam a morte celular, reforçando a importância do equilíbrio redox nesses mecanismos (ZHANG. D, *et al.*2009; SCHENK. B, *et al.* 2015; CHO. Y, *et al*.2009; RIVERA. J, *et al*. 2010; JANTAS. D, *et al.* 2021).

Ainda, diversos estudos destacam o papel dos metais na produção de ERO, dentre eles o vanádio, destacando seus impactos negativos em biomoléculas grandes como por exemplo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (AURELIANO, *et al.* 2018).

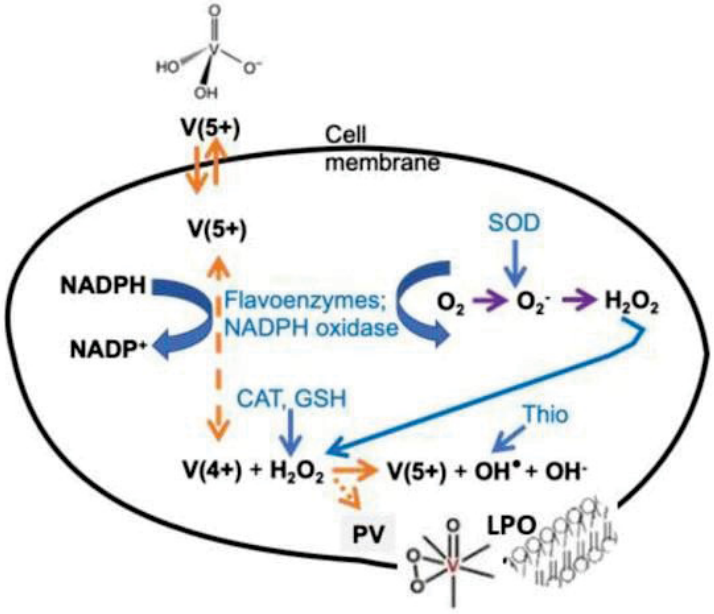
Foi demonstrado que o vanádio, especialmente nos estados de oxidação V(5+) e V(4+), participa de reações redox intracelulares que promovem a formação de ERO, exacerbando o estresse oxidativo (PESSOA. J, *et al.* 2015). Esse processo inicia-se com a entrada do vanádio na célula, predominantemente no estado de oxidação V(5+), através da membrana celular. Uma vez dentro da célula, o vanádio é submetido a ciclos de oxidação e redução mediado por sistemas enzimáticos dependentes de NADPH, como flavoproteínas e NADPH oxidase. Essa redução do V(5+) à V(4+) gera ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$), os quais são rapidamente convertidos à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD), gerando peroxovanadato (PV) e peroxidação de lipídios de membrana (LPO). O peróxido de hidrogênio gerado, por sua vez, é uma molécula central no ciclo redox do vanádio, com potencial de induzir danos celulares significativos.

Em condições normais, a célula utiliza mecanismos antioxidantes, como a catalase (CAT) e a glutationa reduzida (GSH), para neutralizar o H_2O_2. A catalase converte H_2O_2 em água e oxigênio molecular (O_2), enquanto a GSH atua reduzindo o H_2O_2 e regenerando-se com a ajuda de outras enzimas antioxidantes, protegendo a célula contra o estresse oxidativo. Contudo, na presença do vanádio, esses mecanismos são frequentemente sobrecarregados.

A reação química de Fenton, catalisada pelo vanádio no estado V(4+), utiliza o H_2O_2 como substrato para gerar radicais hidroxila ($HO\cdot$), espécies extremamente reativas que promovem danos severos às biomoléculas.

Além disso, os compostos de enxofre, como os tióis (Thio), desempenham um papel crucial no mecanismo de defesa contra os efeitos do vanádio na célula. Os tióis podem reagir diretamente com os radicais livres ou interagir com o vanádio, ajudando a mitigar os danos oxidativos. Porém, o esgotamento dessas moléculas pelo excesso de ERO agrava o estresse oxidativo (Figura 5) (Aureliano *et al.*, 2018).

FIGURA 5 - Mecanismo dos efeitos do vanadato (V (5+)), vanadil (V (4+)) e peroxovanadato (PV) no estresse oxidativo intracelular. Fonte: (Aureliano *et al.*, 2018).



Os efeitos dos compostos de vanádio foram testados em vários processos biológicos, e vários biomarcadores foram identificados, dentre eles o malondialdeído (MDA), sendo o mais comum (BYCZKOWSKI *et al.* 2023). Em um estudo realizado por Zaporowska *et al.* (1993), foi demonstrado que a administração crônica de vanádio, na forma de metavanadato de amônio, em concentrações de 0,2 ou 1,0 mM na água potável, por um período de 4 semanas, resultou em elevação significativa dos níveis de MDA no sangue de ratos, evidenciando os efeitos prejudiciais do metal em condições de estresse oxidativo prolongado.

Os danos causados pela lipoperoxidação lipídica não se limitam às membranas celulares. Organelas intracelulares, como o retículo endoplasmático (RE), são fortemente impactadas. O RE, essencial para a síntese de proteínas e o metabolismo de lipídios e cálcio, possui membranas ricas em ácidos graxos poliinsaturados altamente suscetíveis à oxidação. A peroxidação lipídica reduz a mobilidade dessas membranas, comprometendo a formação de vesículas e os processos de transporte intracelular, como descrito por Thomas *et al.* (1990). Os efeitos do vanádio também se estendem às proteínas e ao DNA. A glutationa reduzida (GSH), um antioxidante essencial, é esgotada durante os processos redox

promovidos pelo vanádio, enfraquecendo ainda mais a capacidade da célula de neutralizar as ERO (MOREL *et al.* 1990).

Em proteínas estruturais e funcionais, como miosina e actina, foram observadas modificações oxidativas mediadas por ERO, resultando em inativação e alterações estruturais (AURELIANO *et al.* 2018). Já no DNA, o vanádio age de forma direta e indireta, promovendo interações com a estrutura tridimensional da dupla hélice e proteínas associadas, como histonas. Além disso, as ERO geradas causam quebras na cadeia de DNA, mutações e instabilidade genética, estando esses processos associados à doenças como câncer (DEVI. R, *et al.* 2012).

2.8 SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES E MECANISMO DA GLUTATIONA

Como os ERO são potencialmente lesivos para as células, estas possuem vários sistemas antioxidantes, dentre eles: superóxido dismutase (SOD), que faz a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, de forma mais acelerada. Outro representado pela catalase, sendo uma enzima tetramérica que contém heme e catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Também, existem as vitaminas C e E, sendo que o ácido ascórbico (vitamina C), é hidrossolúvel, remove radicais livres e reage formando um produto inativo chamado de ácido desidroascórbico que é reduzido à ácido ascórbico pela enzima desidroascorbato-redutase. A vitamina E, que reage com água e forma radicais livres, formando tocoferol-semiquinonas, convertidas em α-tocoferol. Ainda outro sistema antioxidante é o sistema de tiorredoxina, proteína que atua de modo semelhante a glutationa e outras moléculas como taurina, bilirrubina, cisteína, ácido úrico e carotenoides também removem radicais livres (BANSAL. A, *et al*.2018).

Por fim, outro sistema importante que foi abordado neste trabalho é representado pela glutationa (GSH), sendo útil em uma infinidade de processos, como na proliferação, divisão e diferenciação celular, é cofator para enzimas e desintoxicação de xenobióticos. O GSH é um tripeptídeo composto por: glicina, cisteína e ácido glutâmico. A GSH está presente em condições fisiológicas na sua forma reduzida (GSH) com um grupo tiol (-SH) ligado à cisteína, sendo um antioxidante essencial presente em todas as células dos mamíferos. Quando o

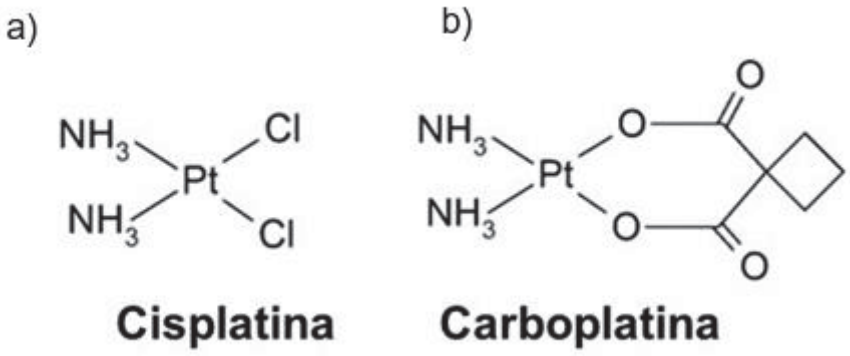
GSH entra em contato com o peróxido de hidrogênio, a enzima glutationa peroxidase faz com que a GSH perca um elétron e um próton (H+) e se oxide, originando a forma oxidada chamada de dissulfeto de glutationa (GSSG) e uma molécula de água. Para que a GSSG retorne para GSH, a enzima glutationa redutase e seu cofator NADPH, vinda do ciclo das pentoses fazem a redução de GSSG (AVERILL-BATES. D. A, *et al.* 2023).

2.9 CONTRIBUIÇÕES DA QUÍMICA INORGÂNICA PARA A TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA

A partir da segunda metade do século XX, os compostos baseados em metais passaram a receber atenção especial em seu potencial na aplicação medicinal, por permitir o desenvolvimento de agentes terapêuticos que se diferenciam daqueles obtidos com compostos orgânicos (LUÍSA. A, *et al*. 2023). Dentre eles, o composto de maior destaque, a cisplatina (Figura 6a), foi descoberta por acaso por Barnett Rosemberg e colaboradores em 1965. O uso clínico da cisplatina reduziu o número de mortes em pacientes com câncer de testículo em cerca de 80%, aumentando assim o interesse por complexos metálicos com propriedades farmacológicas. Atualmente a cisplatina é utilizada em conjunto com a radioterapia ou outros quimioterápicos em casos de diagnostico tardio (ZHANG. J, *et al*. 2024.)

Um artigo de revisão recente sobre a quimioterapia a base de compostos de platina mostrou que, para o câncer de mama TN, a maioria dos estudos clínicos empregam a carboplatina (Figura 6b) como neoadjuvante dos quimioterápicos a base de antraciclina. Os resultados indicam um aumento de taxa de sobrevida livre de progressão, sobrevida global e taxa de resposta global quando comparada aos regimes de tratamento de nab-paclitaxel/gencitabina ou gencitabina/carboplatina (MASON. S, *et al.* 2023*).* Além disso, os protocolos resultaram em um aumento notável das taxas de resposta patológica completa, perfil de toxicidade favorável e custo reduzido do tratamento de pacientes em estágio inicial (MUHAMMAD. N, *et al.* 2024).

FIGURA 6 - Estrutura química da cis-diamindicloroplatina(II), cisplatina e da carboplatina. Fonte:(MUHAMMAD. N, *et al.* 2024).



A cisplatina exerce sua atividade anticâncer por meio de lesões no DNA, pela interação com bases de purina seguido pela ativação de vias de transdução de sinal, que culminam em apoptose. Quando em contato com o citosol, que possui baixa concentração de cloreto, a cisplatina sofre uma reação de aquação, na qual ocorre a substituição de um ou dois cloretos por moléculas de água, tornando-a muito reativa, o que pode explicar a ligação covalente no DNA, gerando lesão. No entanto, os efeitos colaterais e a resistência aos medicamentos são dois fatores que limitam sua aplicação e eficácia. A redução do acúmulo de medicamentos dentro das células cancerígenas, a inativação do medicamento pela reação com GSH e metalotioneínas e o reparo mais rápido das lesões de DNA são responsáveis pela resistência à cisplatina (GHOSH. S, *et al*. 2019). Para minimizar os efeitos colaterais e a resistência à cisplatina, ela é utilizada em conjunto com a radioterapia ou outros quimioterápicos, mostrando-se mais eficaz para o tratamento do câncer (ZHANG. J, *et al*. 2024).

Devido a essa toxicidade, outros cinco compostos análogos a ela também passaram a ser utilizados na terapia do câncer de mama de forma isolada ou combinada. Os análogos incluem a carboplatina, satraplatina, picoplatina e iproplatina. A carboplatina apresenta um ligante ácido ciclobutanodicarboxílico que é muito mais estável e com isso, o tempo para o composto atingir a molécula alvo é maior, sua ligação com proteínas é menos irreversível que a cisplatina e sua excreção é mais rápida. Constitui-se como uma alternativa útil pois apresenta

menor nefrotoxicidade e gastrotoxicidade apesar de sua toxicidade para células cancerígenas ser menor que a cisplatina. Porém, seu uso apresentou uma resistência cruzada com a cisplatina, pois devido à similaridade do mecanismo de ação e estruturas químicas, células tumorais que desenvolvem resistência à cisplatina também apresentam resistência à carboplatina (ALMEIDA. V. L, *et al*. 2005). Apesar da toxicidade ter sido melhorada, a resistência cruzada e a falta de biodisponibilidade oral levaram a busca por um medicamento de terceira geração.

Compostos com um ligante NH_3 e um ligante que seja uma amina orgânica foram investigados com a hipótese de que os ligantes de amina mista teriam uma interação diferente com o DNA, surgindo dessa forma o primeiro composto biodisponível por via oral, o complexo de Platina (IV), a satraplatina. Porém, esse composto passou por um ensaio de fase III em câncer de próstata metastático e mostrou apenas crescimento celular controlado e nenhum aumento na taxa de sobrevivência geral em comparação com a cisplatina (SAHADEVAN. M, *et al.* 2024).

Levando em consideração a busca por um medicamento que superasse a resistência da cisplatina e atenuasse os mecanismos de resistência associados a ela, caracterizados por reparo de lesões do DNA, redução do acúmulo ou transporte intracelular e interação com moléculas antioxidantes, como a GSH, surgiu a picoplatina. Esse medicamento apresenta alta eficiência em relação a muitos tipos de câncer além do CM, como câncer colorretal, de pulmão, ovário e câncer de próstata. Ainda, a menor taxa de substituição da picoplatina, permite que a droga tenha mais tempo para atingir o DNA, ao contrário do que ocorria com a cisplatina e carboplatina. Porém, foi testada em vários ensaios clínicos e foi visto que embora demonstre atividade em pacientes sensíveis à cisplatina, mostrou apenas uma pequena melhora em relação a pacientes resistentes à cisplatina. Por este motivo, ela não atendeu aos requisitos da AstraZeneca que decidiu interromper seu desenvolvimento (SAHADEVAN. M, *et al*. 2024).

Além de diversas desvantagens apresentadas por agentes alquilantes do DNA, como é o caso dos complexos de platina, os complexos de coordenação com a platina induzem morte celular por apoptose, portanto são ineficazes no tratamento de células tumorais resistentes a essa via. Com base nisso, o desenvolvimento de

uma nova química organometálica medicinal pode fornecer outras respostas terapêuticas com base na diferença de comportamento. A principal diferença entre um complexo de coordenação do tipo cisplatina e um composto organometálico está em seu mecanismo de ligação química. Compostos de platina necessitam de uma reação de aquação para serem ativados e muitas vezes possuem o DNA como alvo primário, o qual não é exclusivo. Enquanto os organometálicos, que tendem a ser mais lipofílicos e têm pelo menos uma ligação covalente carbono-metal, funcionam de maneira diferente em alvos proteicos. Sendo assim, outros compostos a base de metais também foram utilizados para o tratamento do câncer de mama na tentativa de terem outros alvos dentro das células, dentre eles estão os complexos de ouro e ferro.

Os complexos organometálicos baseados em ferro, são covalentemente ligados a um arcabouço de tamoxifeno, podendo conferir diversas aplicações biológicas. O sucesso desses compostos se dá pela reatividade química do complexo organometálico, o que difere do metal ou ligantes orgânicos sozinhos. Entre esses complexos, está a família do ferrocifeno que consiste em uma fração ferroceno covalentemente ligada a um esqueleto de tamoxifeno (DASARI. S, *et al*. 2014). O ferrocifeno está entre os primeiros organometálicos moduladores seletivos do receptor de estrógeno. Vieram como uma proposta promissora pois possuem um alto potencial antiproliferativo em células de câncer de mama dependentes de hormônios, como é o caso da MCF7 e linhagens celulares que não são dependentes, como por exemplo a MDA-MB-231.

Além disso, viu-se que o alvo desse composto eram as proteínas ao invés das bases do DNA e possuía uma característica que são dos organometálicos de inibir a atividade da enzima tiorredoxina redutase, uma enzima com papel antioxidante superexpressa em células cancerígenas, além de produzirem altas quantias de ERO (IDLAS. P, *et al*. 2021). Ainda, é caracterizado por ser um composto aromático estável, com baixa toxicidade, baixo custo e com propriedades redox reversíveis. (JAOUEN. G, *et al.* 2015). Porém, para analisar melhor a eficácia dessas moléculas e realizar estudos in vivo, os ferrocifenos precisam ser formulados em nanocarreadores. Isso ocorre pois eles são altamente lipossolúveis e não podem ser injetados diretamente no sistema circulatório.

Outros compostos que ganharam destaque na terapia do câncer de mama são os complexos de ouro (III), que se apresentam como uma classe versátil e eficaz de agentes anticâncer baseados em metais. O avanço no desenvolvimento de ligantes capazes de estabilizar o cátion ouro (III) e prevenir sua redução sob condições fisiológicas abriu caminho para a investigação de seus potenciais alvos intracelulares e mecanismos de ação.

A bioconjugação de complexos de ouro (III) emergiu como uma estratégia promissora para aumentar a seletividade desses compostos para células cancerígenas, minimizando danos a tecidos saudáveis.

Estruturas moleculares específicas, que são reconhecidas pelas células tumorais, têm sido incorporadas aos complexos de ouro para explorar os próprios mecanismos de transporte celular, promovendo a captação seletiva do metal e ampliando sua eficácia. Foi demonstrado que os compostos interagem intimamente com proteínas como albumina e transferrina, mas apenas fracamente e reversivelmente com DNA.

O mecanismo de ação desses compostos inclui a indução de apoptose, principalmente pela inibição de enzimas antioxidantes críticas para a sobrevivência das células cancerígenas, como tiorredoxina redutase, glutationa peroxidase, cisteína protease e glutationa-S-transferase. Além disso, devido à sua configuração eletrônica semelhante à platina, os complexos de ouro (III) foram inicialmente propostos como alternativas à platina no tratamento do câncer. Entretanto, sua estabilidade no ambiente intracelular representa um desafio significativo.

Sob condições redutoras em compartimentos biológicos, o centro de ouro (III) tende a ser reduzido a ouro (I) ou ouro (0), o que pode levar à ligação com ligantes inespecíficos, resultando em perda de atividade terapêutica. Além disso, a redução do ouro (III) aumenta o risco de acúmulo do metal pesado em órgãos vitais, comprometendo sua segurança e dificultando a aprovação pela FDA. Por esse motivo, a escolha de ligantes apropriados para estabilizar o ouro (III) é particularmente importante, visando mitigar esses efeitos adversos e otimizar o desempenho terapêutico, permitindo que complexos de ouro (III) sejam usados para fins quimioterápicos (BERTRAND. B, *et al*. 2018).

2.10 CLASSIFICAÇÃO DO VANÁDIO COMO ÍON DURO OU MACIO: RELEVÂNCIA PARA A BIODISPONIBILIDADE, REATIVIDADE E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Para compreender as propriedades e ações dos metais, assim como suas interações com moléculas, é necessário considerar o conceito de ácidos e bases duros e macios, conforme a classificação de Pearson. Essa teoria descreve íons duros como aqueles que possuem características como pequeno tamanho, alta densidade de carga e baixa polarizabilidade. Esses íons, entre os quais se incluem H^+, Na^+, Ca^{2+} e Al^{3+}, têm tendência a trocar ligantes rapidamente e podem ser incorporados em canais iônicos. Além disso, interagem preferencialmente com bases duras, que são igualmente pequenas e pouco polarizáveis, como os íons de oxigênio e fluoreto. Por outro lado, íons macios possuem maior tamanho, baixa densidade de carga e são altamente polarizáveis. Eles interagem preferencialmente com bases macias, como enxofre ou fósforo, e exemplos típicos dessa categoria incluem Pt^{2+}, Hg^{2+} e Au^+. De maneira geral, as interações mais estáveis ocorrem entre ácidos e bases da mesma categoria, ou seja, duros-duros ou macios-macios (VASCONCELLOS. M, *et al*. 2014).

No contexto do metal vanádio, objeto de estudo desse trabalho, sua classificação como ácido duro ou macio depende do estado de oxidação em que se encontra. O vanádio pode apresentar diferentes estados de oxidação, como V^{2+}, V^{3+}, V^{4+} e V^{5+}. Nos estados mais elevados, como V^{4+} e V^{5+}, o vanádio apresenta comportamento de íon duro, devido à sua alta densidade de carga. Nessas condições, forma complexos estáveis com bases duras, como os átomos de oxigênio e nitrogênio encontrados em fosfatos, carboxilatos e aminas, o que explica sua interação com biomoléculas, como proteínas. Em contrapartida, nos estados de oxidação mais baixos, como V^{2+} e V^{3+}, o vanádio apresenta características intermediárias, sendo mais polarizável e capaz de interagir com bases macias, como o enxofre em tioéteres. A partir desse entendimento, destaca-se o papel dos quelantes na estabilização do vanádio em diferentes contextos químicos e biológicos.

Os quelantes são moléculas ou íons que possuem dois ou mais átomos doadores de elétrons, capazes de se ligar a um único íon metálico por coordenação, formando complexos estáveis. Essa interação com ligantes quelantes estabiliza o íon metálico, prevenindo reações indesejadas, como precipitações ou desativação por outras espécies químicas (TREVIÑO. S, *et al.* 2019).

A classificação do vanádio em íon duro ou macio torna-se relevante uma vez que com isso torna-se possível selecionar quelantes específicos para estabilizá-lo em condições biológicas, evitando reações indesejadas. Pode-se citar como por exemplo a mimetização com fosfato em sistemas enzimáticos, interagindo com sítios catalíticos de enzimas como fosfatases e quinases, o que pode inibir ou ativar vias metabólicas.

Além disso, a interação do vanádio pode influenciar sua biodisponibilidade e reatividade em sistemas biológicos, pois em estados de oxidação mais elevados, pode interagir com biomoléculas contendo oxigênio como fosfoproteínas ou nucleotídeos, aumentando sua solubilidade e transporte em meio biológico, para que possa interagir com alvos específicos. Já, em estados de oxidação mais baixos, a afinidade por compostos sulfurados torna o vanádio capaz de influenciar o sistema redox celular. Interações com GSH, um antioxidante importante, podem modular o equilíbrio entre ERO e mecanismos de defesa celular. Isso é relevante em processos como apoptose, necroptose ou proteção contra o estresse oxidativo (DOUCETTE. K. A, *et al*. 2016). Ainda, em estados elevados de oxidação, o vanádio em formas duras pode atuar como inibidor enzimático, afetando processos metabólicos em células normais e cancerígenas. Por exemplo, sua interação com fosfoproteínas pode regular a sinalização celular ou inibir enzimas específicas, como a tirosina fosfatase, o que tem implicações terapêuticas em doenças metabólicas e câncer. Já em estados baixos de oxidação a interação com ligantes sulfurados pode desempenhar um papel na neutralização de espécies reativas ou na modulação da atividade redox. Isso é relevante para a proteção celular em condições de estresse oxidativo, lesões celulares ou inflamação. Com isso, no contexto do câncer, o conhecimento da biodisponibilidade, reatividade e seletividade são fundamentais para modulas mecanismos celulares e atingir alvos específicos de forma eficiente (TRAVERSO. N, *et al*. 2013).

2.11 SINERGISMO DE METAIS COM QUIMIOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

A combinação de medicamentos tem sido uma estratégia amplamente utilizada no tratamento do câncer devido às vantagens sinérgicas, como a redução da dose necessária, diminuição da toxicidade e minimização ou retardamento do desenvolvimento de resistência aos fármacos. Por exemplo no estudo de Lin *et al*. (2020) foi avaliado o efeito da combinação de Rutênio (II) e doxorrubicina em diferentes tipos de células cancerígenas, incluindo as linhagens de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231. Os resultados demonstraram efeitos citotóxicos e antiproliferativos significativos nessas células, acompanhados por um aumento na produção ERO e pela modulação de vias intracelulares relacionadas à sobrevivência, proliferação e apoptose. Foi observada uma redução na expressão da via PI3K/AKT, que é crucial para a sobrevivência celular, crescimento e resistência à apoptose. Paralelamente, houve um aumento na expressão de PTEN, um gene supressor tumoral que inibe diretamente a via PI3K/AKT, contribuindo para o comprometimento das funções de sobrevivência das células tumorais. Além disso, foi relatada a diminuição na expressão de NF-κB e XIAP, fatores que promovem a sobrevivência celular e inibem diretamente as caspases, enzimas essenciais para o desencadeamento da apoptose.

A redução desses fatores sugere uma maior predisposição das células à morte programada. Por outro lado, a expressão de P53, um gene supressor tumoral fundamental para a regulação do ciclo celular, reparo de DNA e indução de apoptose, foi significativamente aumentada. Esse aumento indica uma resposta pró-apoptótica, favorecendo a eliminação de células danificadas ou potencialmente tumorais (LIN. K, *et al*. 2020).

Ainda, no estudo de Machado. S, *et al.* (2024), foram sintetizados e caracterizados quatro complexos de zinco (II) com efeito citotóxico em linhagens de células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231. Esses complexos demonstraram maior atividade nas células triplo-negativas, aumentando sua sensibilidade aos quimioterápicos doxorrubicina e paclitaxel. Além disso,

promoveram o aumento da expressão de *CDH1*, (gene da E-caderina) contribuindo para alterações no fenótipo do câncer de mama triplo-negativo.

2.12 OXIDOCOMPOSTOS DE VANÁDIO E SEU POTENCIAL ANTICÂNCER

O vanádio é um metal de transição traço que apesar de estar presente em suplementos vitamínicos, ainda não tem suas funções biológicas e bioquímicas completamente elucidadas e nem sua essencialidade comprovada.

O estudo da bioquímica do vanádio vem se intensificando nas últimas décadas e demonstrando que o elemento desempenha um papel regulador no sistema biológico, atuando como inibidor da atividade de uma série de enzimas e modulando as funções de várias proteínas (REHDER. D, *et al.* 2023). Essas funções têm sido correlacionadas com atividades farmacológicas como a ação insulinomimética, anti-hiperlipidemia, anti-hipertensão, antiobesidade, aprimoramento da afinidade de oxigênio pela hemoglobina e mioglobina e ação diurética, o que sugere um potencial terapêutico para os compostos desse elemento (DEBBIE. C, *et al.* 2019).

Os oxidocompostos de vanádio possuem uma rica química estrutural sendo formados por íons de vanádio, oxigênio, água e íons que contrabalanceiam a carga dos oxidoânions, como os cátions sódio ou potássio, e geralmente são sintetizados por reações de condensação em fase aquosa e com pH controlado (DEBBIE. C, *et al.* 2019). Estes compostos podem ser modificados pela adição de ligantes orgânicos ou pela combinação com um segundo metal de transição.

Os oxidocompostos de vanádio em seus estados de oxidação mais altos (+IV ou +V) são conhecidos por induzir efeitos biológicos pois afetam processos como estresse oxidativo, lipoperoxidação, parada do ciclo celular, interferência em sistemas de transporte de íons, inibição de sinalização celular, alteração em vias metabólicas e inibição de proteínas sendo testados para terapia de algumas doenças humanas.

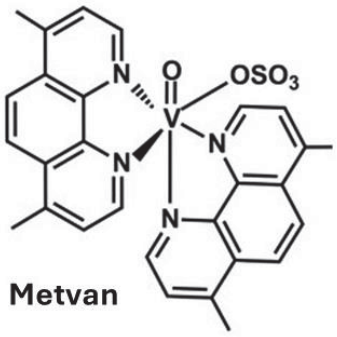
Estudos descrevem seu potencial antitumoral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, antiviral, antidiabético e anti-hipercolesterolêmico, além de efeitos cardioprotetores, neuroprotetores e antiobesidade (FRAQUEZA. G, *et al*. 2022). Até

agora, o mecanismo antitumoral dos compostos contendo múltiplos centros de vanádio não está totalmente claro, porém, o ciclo celular é particularmente alterado, evidenciando que estes compostos em sua maioria agem nas fases S e G2/M do ciclo celular (LUÍSA. A, *et al.* 2023).

Diversos oxidocompostos de vanádio tem sido estudados no contexto do câncer (Tabela 1). Entre eles, (*bis*-4,7-dimetil-1,10-fenantrolina sulfato-oxidovanadio(IV), Metvan (Figura 7), tem sido considerado um dos quimioterápicos inorgânicos mais promissores não baseado em platina. Segundo o estudo realizado por D'Cruz *et al*. (2002), esse composto apresentou efeito citotóxico *in vitro* em células de leucemia, glioblastoma, câncer de mama, próstata e testículo.

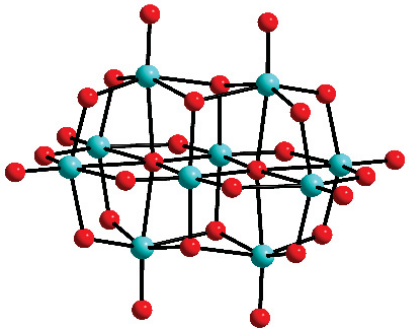
Estudos *em camundongos* mostraram que o Metvan possui a vantagem terapêutica de ser ativo em linhagens celulares de câncer de testículo resistentes a cisplatina, apresentando ausência de toxicidade (LEON. I, *et al*. 2017). O mecanismo de morte celular observado foi o de apoptose, associada à perda do potencial transmembrana mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio com parada no ciclo celular na fase G2/M (D'CRUZ. O, *et al.* 2002).

FIGURA 7 - Estrutura do (bis-4,7-dimetil-1,10-fenantrolina sulfato-oxidovanadio(IV), Metvan. Fonte: (LEON. I, *et al*. 2017).



Por fim, dentre os oxidocompostos de vanádio(V) o mais comum em meio biológico é o ânion decavanadato, $[V_{10}O_{28}]^{6-}$, V_{10} (Figura 8), o qual se forma em soluções aquosas contendo o elemento e é estável em uma faixa de pH que pode variar de 3 a 6. O V_{10} interage com várias proteínas biologicamente importantes, incluindo tirosina quinases, fosfatases, miosina, actina, albumina e transferrina (FRAQUEZA. G, *et al*.2019; AURELIANO.M, *et al.* 2022).

FIGURA 8 - Fórmula estrutural do ânion decavandato $[V_{10}O_{28}]^{6-}$, denominado decavanadato ou V_{10}. Fórmula em bola e bastão. Verde = V e vermelho = O.



O estudo *in vitro* e *in vivo* (em tumor hepático em camundongos) realizado por Zhai, *et al*. (2009), utilizando compostos derivados do V_{10}, mostrou um efeito citotóxico associado, com destaque para a menor toxicidade do V_{10} em comparação com o quimioterápico fluorouracil. O mecanismo de morte descrito foi o de apoptose. Além disso, também foi analisada a interação do composto com o DNA.

Em outro estudo, foi relatado recentemente que é possível melhorar o efeito do decavanadato pela combinação com o antidiabético metformin. O novo composto híbrido-orgânico-inorgânico teve efeito citotóxico em concentrações 10 vezes menores do que o V_{10} (LUÍSA. A, *et* al. 2022).

Um dos mecanismos moleculares recentemente descobertos acerca dos oxidocompostos de vanádio contendo múltiplos centros metálicos como o $V_{10,}$ e V_{18} por DIOGO. K, *et al.* (2021), é a propriedade de inibir uma das vias responsáveis pela resistência à múltiplas drogas. Esta via é constituída pelos transportadores de drogas ABC (proteínas de efluxo transmembrana) sendo eles P-glicoproteína (P-gp), ABCG2 e MRP1. Foi visto que todos os oxidocompostos do estudo inibiram seletivamente a P-gp, sendo que o V_{10} e o $[V_{18}O_{42}I]^{6-}$, V_{18}, foram os dois compostos mais promissores.

Para avaliar o mecanismo molecular de inibição da P-gp, o efeito dos compostos V_{10} e do V_{18} foi avaliado na ligação de um anticorpo conformacional (17F9) que reconhece uma região extracelular da proteína, sugerindo que esses compostos podem desencadear diferentes mudanças conformacionais na proteína,

seja pela ligação em diferentes locais ou pela produção de outras espécies de vanádio que, em princípio, também poderiam ser ativas.

O $K_{12}[V_{18}O_{42}(H_2O)]\cdot 6H_2O$, V_{18}, foi citotóxico em células tumorais de mama MCF7 (subtipo luminal) e MDA-MB 231 (subtipo TN). Esse composto induziu parada das células MCF-7 na fase do ciclo celular G2/M e indução de apoptose e necrose (QI. W, *et al.* 2017).

TABELA 1 – Compostos de vanádio. Comparação de diferentes IC_{50} em diferentes tipos de câncer.

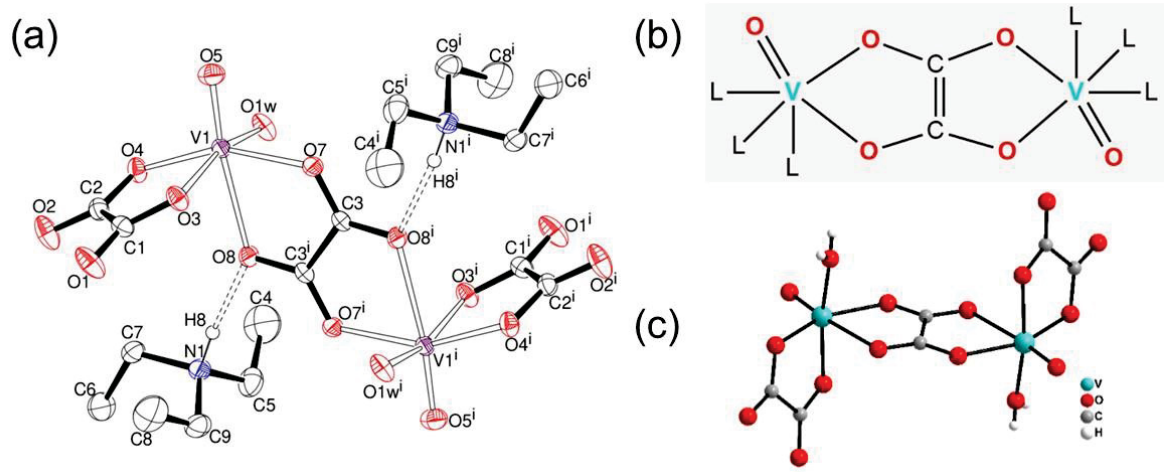
Compostos de Oxidovanadio	Câncer	Linhagem Celular	IC50(μM)			Referência
			24h	48h	72h	
Metvan	Mama	MCF7	2,3	-	-	D'CRUZ, O. J, 2002
		MDA-MB-361	1,9	-	-	
		MDA-MB-231	0,5	-	-	
	Leucêmicas	HL-60	0,98	-	-	
		NALM-6	0,19	-	-	
		MOLT-3	0,19	-	-	
	Glioblastoma	U-87	2,2	-	-	
		U-118	0,8	-	-	
		U-138	2,7	-	-	
	Próstata	PC3	1,7	-	-	
	Testículo	833K	0,85	-	-	
		64CP	0,75	-	-	
V_2	Fígado	HepG2	15,7	-	-	BAPTISTELLA. B.G, et al, 2021
V_{10}	Melanoma	UACC-62	-	3,2	-	LUÍSA, A. et al,2022
	Mama	MDS-MB-231	2,53	-	-	BRITO,B. 2024
CoV_{10}	Fígado	SK-OV-3	<0,24	-	-	ZHAI, F. et al, 2009
		SMMC-7721	0,32	-	-	
V_{18}	Mama	MCF-7	46	12	12,5	QI, W. et al,2017
		MDA-MB-231	>500	360	135,7	

2.13 COMPLEXO BINUCLEAR DE OXIDOVANÁDIO(IV) COM LIGANTES OXALATO (V_2)

A estrutura química da subclasse de composto de vanádio a qual o V_2 pertence possui dois grupos oxidovanádio(IV) conectados por um oxalato em ponte $\{(O=V^{IV})-\mu\text{-ox}-(V^{IV}=O)\}^{2+}$, ou simplesmente $\{(VO)_2-\mu\text{-ox}\}^{2+}$, onde $ox^{2-} = C_2O_4^{2-}$ ou oxalato, que caracteriza a sua porção fixa (Figura 9). Esta estrutura é bastante versátil, pois permite a modulação de propriedades químicas e físico-químicas pela variação dos ligantes auxiliares (L) que se encontram coordenados ao metal. Exemplos de ligantes L já descrito na literatura são L = H_2O, ox^{2-}, OH^-, Cl^-, EtO^-, $EtCH_2O^-$, NCS^- e piridina (ZHENG. L, *et al.* 1998; LITTLER. J, *et al.* 1960;

KOUVATAS. C, *et al.* 2017; CHEN. C, *et a*l. 2013). Ainda, o V_2, que possui a fórmula molecular $(Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(ox)\}_2(\mu\text{-}ox)]$ (V_2), onde e Et_3NH^+ = cátion trietilamônio é obtido na forma de cristais azul-claro esverdeados, solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos (MARET. W, *et al.* 2014; BAPTISTELLA. B, *et al.* 2021). A estrutura química do V_2 possui a porção $\{(VO)_2{-}\mu\text{-}ox\}^{3+}$, onde os dois grupos oxidovanádio(IV) são conectados por um oxalato em ponte, e os ligantes auxiliares são um oxalato terminal e uma molécula de água (Figura 9).

FIGURA 9 - Diagrama ORTEP de $(Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(C_2O_4)\}_2(\mu\text{-}C_2O_4)]$, V_2, evidenciando as ligações de hidrogênio entre os cátions e o ânion (b) Esquema que ressalta a porção $\{(O{=}V^{IV}){-}ox{-}(V^{IV}{=}O)\}^{3+}$ em que L = ligante variável e (c) fórmula em bola e bastão do ânion $[\{VO(OH_2)(C_2O_4)\}_2(\mu\text{-}C_2O_4)]^{2-}$.



O V_2 pode ser sintetizado utilizando uma metodologia simples e de baixo custo que emprega os reagentes comerciais pentóxido de vanádio (V_2O_5) e ácido oxálico (H_2ox), e gera o produto com 90% de rendimento (Equação 1). O composto foi preparado no laboratório de Química Inorgânica Aplicada da Profa. Giovana Gioppo Nunes, no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (BAPTISTELLA.B, *et al.* 2021).

$$V_2O_5 + 4\ H_2C_2O_4 + 2\ Et_3N \rightarrow (Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(C_2O_4)\}_2(\mu\text{-}C_2O_4)\ ] + 2\ CO_2 + H_2O$$

[Eq.1]

O V_2 foi caracterizado em suas propriedades químicas, espectroscópicas e avaliado em sua ação antidiabética *in vitro* e *in vivo* (BAPTISTELLA. B, *et al.* 2021; LOPES. M, *et al.* 2024). O estudo revelou a ocorrência de um aumento significativo na captação de 2-NBDG (um análogo fluorescente da glicose) por células de hepatocarcinoma humano (HepG2) submetidas a condições hiperglicêmicas, quando tratadas com soluções aquosas de V_2 (0,10 e 0,50 μM). Os resultados de captação de 2-NDBG de 91% foram similares ao da insulina, e 27% maior do que a captação das células submetidas a condições hiperglicêmicas sem a adição do oxidocomposto de vanádio(IV) (BAPTISTELLA.B, *et al.* 2021).

Posteriormente no estudo *in vivo*, ficou evidenciado o controle glicêmico em ratos com diabetes induzida por streptozotocina, sem alterações em nível renal, hepático, nutricional, perfil lipídico e ósseo, sugerindo o seu potencial como adjuvante em associação com a insulina no tratamento de diabetes (LOPES. M, *et al*. 2024). Sendo assim, neste trabalho, estamos buscando uma nova ação terapêutica para o complexo V_2.

3.JUSTIFICATIVA

Aureliano. M, *et al*. (2023) destaca o sucesso no uso de oxidocompostos de vanádio(V) como por exemplo, V_{10}, V_{18} e CoV_{10} na ação antitumoral (já citados anteriormente), atuando em câncer de mama, adenocarcinoma endocervical e câncer de ovário, etc (Tabela 1), destacando o mais conhecido decavanadato (V_{10}). Além disso, após comparar diversos polioxometalatos (POMs), observou-se que os compostos com oxidovanádio em diferentes linhagens celulares, eram os que apresentavam valores de IC_{50} mais baixos.

Entre os diversos oxidocompostos de vanádio temos a disponibilidade de estudar o V_2, um oxidocomposto de vanádio(IV) com oxalato, que apresentou efeito biológico *in vitro* e *in vivo* como um potencial adjuvante no tratamento com a insulina, não só por sua ação antidiabética, mas também antioxidante, com níveis de toxicidade muito baixo para os animais, nas condições empregadas no estudo. Quando testado em linhagem tumoral de hepatocarcinoma (HepG2) foi

determinada uma IC_{50} de 15,6 μM (BAPTISTELLA. B, *et al.* 2021), abrindo uma segunda frente de aplicação de interesse medicinal.

Muita atenção tem sido dada aos compostos de metais de transição que contém oxalato devido as suas características estruturais, e principalmente por sua atividade nos campos de catálise e magnetismo (ZHU. S, *et al.* 2019). Para fins biomédicos, o V_2 é interessante porque em condições fisiológicas o vanádio(IV) possui uma alta afinidade por ligantes contendo o oxigênio como átomo doador, como os bioligantes lactato ($C_3H_4O_3^{2-}$), citrato ($C_6H_5O_7^{3-}$) e oxalato ($C_2O_4^{2-}$). Estes bioligantes são capazes de minimizar a ocorrência de reações de hidrólise e a formação da espécie química $VO(OH)_2$, insolúvel em água.

Segundo a classificação de Pearson, o oxigênio é classificado como íon duro e isso faz com que o composto que se liga a ele possua uma maior estabilidade (PERIC. M, *et al.* 2012; HIBA SEHIMI, *et al.* 2019; LEÓN. I, *et al.* 2013; MARET. W, *et al.* 2014). Além disso, ainda segundo Pearson, em seus estados de oxidação mais altos, o vanádio é considerado um íon duro possuindo alta densidade de carga, pequena polarizabilidade, e como já mencionado, alta afinidade a ligantes duros como como oxigênio e nitrogênio. Sendo assim o V_2 possui a propriedade de formar complexos estáveis com ligantes biológicos, sendo útil para sua biodistribuição e modulação em sistemas biológicos (PERIC. M, *et al*. 2012). Além disso, a ação terapêutica de compostos de vanádio contendo ligantes oxalato, e que sejam solúveis em água, como o V_2, continua praticamente inexplorada.

Assim, o objetivo dessa proposta é o estudo do V_2 e seu potencial efeito citotóxico em diferentes linhagens de câncer de mama, e o provável mecanismo de morte celular, o potencial oxidativo e provável efeito sinérgico em combinação com quimioterápicos tradicionais.

4.OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral de um complexo binuclear de vanádio (IV), $(Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(ox)\}_2(\mu\text{-}ox)]$ (V_2), onde ox^{2-} = $C_2O_4^{2-}$, oxalato, V_2, com o

bioligante oxalato em diferentes linhagens de câncer de mama.

4.1.2 Objetivos específicos

Avaliar:

a) O efeito do V_2 na modulação do crescimento e geração de estresse oxidativo em linhagens normal e de câncer de mama.
b) O efeito sobre expressão de alguns genes a fim de investigar o possível mecanismo de morte celular.
c) A interferência do V_2 sobre a migração da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.
d) O possível efeito sinérgico de V_2 na associação com quimioterápicos

5.MATERIAL E MÉTODOS

Generalidades

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em câmaras de fluxo laminar Airstream ® ESCO Class 2 BSC. Todos os materiais, soluções e meios de cultura foram esterilizados por filtração em sistema com membrana de 0,22 µm (cultivo celular) ou em autoclave modelo AV-BIO, BIOEX. As células foram incubadas em estufa de cultura ESCO CelCulture CO_2 INCUBATOR, a 37 °C e centrifugadas em centrífuga LUCADEMA LS-4.

5.1 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas neste estudo quatro linhagens (Tabela 2). Todas as linhagens tem origem na ATCC (American Type Culture Collection) exceto a HB4a que foi doada pelo Instituto Ludwig de Pesquisa-SP. Todas as células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e anfotericina (250 µg/m) e ciprofloxacino (5 µg/ml). A linhagem HB4a foi suplementada com insulina (5 µg/ml) e hidrocortisona (5 µg/ml) e a MCF7 foi

suplementada com insulina (5 µg/ml). Todas as linhagens foram cultivadas em incubadora úmida com 5% de CO_2 a 37°C.

TABELA 2 – Origem e características das linhagens celulares de mama.

Linhagem	Características	Referência
Humana		
HB4a	Linhagem celular luminal epitelial de mama normal imortalizada com vírus SV-40.	STAMPS. A, *et al.* 1994
MCF7	Linhagem celular luminal A de adenocarcinoma mamário. Possui expressão de receptor de estrógeno e progesterona e baixo nível de HER2.	DAI. X, *et al. 2017*
MDA-MB-231	Linhagem celular triplo negativa de adenocarcinoma mamário Não possui expressão de receptores de estrógeno e progesterona e não superexpressa HER2.	DAI. X, *et al. 2017*
Murina		
4T1	Linhagem celular triplo negativa murina (BALB/c) de glândula mamária. Modelo de câncer de mama humano estágio IV. Possui ausência de receptores de estrógeno, progesterona e HER2	LUCAS. J, *et al.* 2024

5.2. ENSAIO DE VIABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE IC_{50}

O ensaio de citotoxicidade é usado para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade, proliferação celular e citotoxicidade. É um ensaio colorimétrico que consiste na redução de um sal amarelo, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), para cristais roxos (formazan) pelas mitocôndrias de células viáveis, que apresentam enzimas oxidorredutases dependentes de NADPH que reduzem o MTT em formazan (VISTICA. D, *et al.* 1991). Os cristais de formazan formados são dissolvidos usando DMSO e a solução roxa resultante é quantificada por meio da medida de sua absorbância em 540 nm usando um espectrofotômetro para placas. Para ensaio de citotoxicidade aproximadamente 5 x 10^3 células/poço de HB4a, (controle normal), MCF7, MDA-MB-231 e 4T1 foram plaqueadas por cerca de 2 horas seguido da adição do V_2. O V_2 foi dissolvido em água, sendo testadas as concentrações de 0, 1, 10, 100 e 300 µM para as linhagens HB4a e MDA-MB-231, para a linhagem MCF7 foram testadas

as concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 μM, já para a linhagem 4T1 foram testadas as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 μM. Após 24 h, foi retirado todo o meio e foram adicionados 100 uL de MTT (5mg/mL) e incubado por 3 h. Após esse período, foi retirado o MTT e adicionados 100 uL de DMSO, sendo feita a leitura em espectrofotômetro de placas na absorbância de 540 nm.

5.3 CURVA DE TEMPO NA CONCENTRAÇÃO DE IC_{50}

A partir dos resultados de viabilidade celular, foi realizada uma curva de tempo com a linhagem MDA-MB-231, sendo utilizado o valor de IC_{50} de 48 μM de V_2 e os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas, com o intuito de estudar o efeito inibitório de crescimento celular do V_2.

5.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada $5x10^4$/poço em placas de 24 poços e incubada até atingir de 90 a 100% de confluência. Para o ensaio, o soro fetal bovino foi retirado do meio de cultivo por 4 h e uma abertura, em linha reta, através da monocamada celular foi feita com uma ponteira de 200 μL. Foi adicionado V_2 (48 μM), e a área da abertura foi fotografada nos tempos 0 e 24 h, e a área mensurada pelo software Image J para análise da migração celular.

5.5 PCR EM TEMPO REAL

Foram cultivadas $8x10^5$ células MDA-MB-231 em 5 placas de cultivo P100 tratadas com 48 μM do complexo binuclear de oxidovanádio(IV) e oxalato (V_2) por 24 h. Para extração do RNA da linhagem tratada e controle, foi utilizado o kit invitrap spin cell RNA mini kit (1061100300) da Invitek conforme especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2000 ng/μL de RNA e 2 mM dNTP, 0,4 μM oligodT e *randon primer* e água DEPC para completar 13,5 μL, seguido de aquecimento a 65°C por 5 min. Imediatamente os tubos foram colocados em gelo por 1 minuto e foram adicionados 4 μL tampão 5X, 0,2 mM de

ditiotreitol (DTT), 20 U de inibidor de ribonuclease, 100 U de Superscript IV (Invitrogen). A reação foi incubada em termociclador a 50°C por 10 min e 80°C por 10 min. O RT-qPCR foi conduzido utilizando-se 1 µL de cDNA na diluição 1:5, 60 nM dos oligonucleotídeos, e SYBR Green Power Master mix (Applied Biosystems) conforme descrição do fabricante, a reação foi realizada no equipamento Step One Plus e os valores de ciclo *threshold* (Ct) foram submetidos a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) utilizando o oligonucleotídeos descritos na Tabela 3. O cálculo da expressão relativa utilizou um gene constitutivo normalizador, tanto para o tratamento como para o controle. Esse método compara a expressão de um gene de interesse entre uma amostra controle e uma tratada, normalizando os valores pelo gene constitutivo.

TABELA 3 - Iniciadores utilizados na análise de expressão gênica em células MDA-MB-231.

.

Mecanismo	Gene	Iniciadores Universal e Reverso (5'- 3')
Metástase	*CDH1*	**U:** CCCGGGACAACGTTTATT
		R: GTCGTTACGAGTCACTTCAG
Necroptose	*RIPK3*	**U:** GACTCCCGGCTTAGAAGGACT
		R: CTGCTCCTGAGCTGAGACAGG
	RIPK1	**U:** GGCATTGAAGAAAAATTTAGGC
		R: TCACAACTGCATTTTCGTTTG
	MLKL	**U:** AGAGCTCCAGTGGCCATAAA
		R: TACGCAGGATGTTGGGAGAT
Apoptose	*CASP8*	**U:** GGATGCCTTGATGTTATTCC
		R: AGTTCCCTTTCCATCTCCTC
	BAX	**U:** TCCCCCCGAGAGGTCTTTT
		R: CGGCCCCAGTTGAAGTTG
	TP53	**U:** AGCTACGGTTTCCGTCTGGG
		R: CTTGTTGAGGGCAGGGGAGT
Constitutivo	*GAPDH*	**U:** ACCCACTCCTCCACCTTTGA
		R: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

5.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliação do estresse oxidativo foram adicionadas a placa de 96 poços aproximadamente $5x10^3$ células/poço de MDA-MB-231, MCF7 e 4T1, que foram aderidas a placa por cerca de 2 h. Após esse período, todos os poços foram lavados 2x com PBS 1x para retirada do meio com SFB e incubados por 30 minutos com 50 µM da sonda fluorescente DCFH (Dicloro-dihidro-fluoresceína) diluída em PBS, que detecta inespecificamente ERO. A forma 2'-7'-diacetato-dicloro-dihidro-fluoresceína é uma forma reduzida da fluoresceína. Essa forma inicial não é fluorescente, no entanto, ao sofrer hidrólise dos grupos acetatos, representados na figura 1.7, por esterases ou por oxidação origina um composto altamente fluorescente, a 2' 7'- diclorofluoresceína (DCF). Após, os poços foram lavados novamente 2x com PBS e foram adicionados nos respectivos poços 400 µM de peróxido de hidrogênio (H_20_2) também diluído com PBS e a IC_{50} do V_2. Nos poços controle foi adicionado somente PBS 1x. Imediatamente à adição dos compostos, foi realizada leitura da fluorescência no leitor de fluorescência TECAN nos seguintes parâmetros: λex= 485nm, λem = 530nm, nos tempos 0, 10min, 20min, 40min e 60 min.

5.7 ENSAIO COM GLUTATIONA (GSH)

Para o ensaio com GSH (Sigma), aproximadamente $5x10^3$ células/poço de MDA-MB-231 foram aderidas à placa de 96 poços por cerca de 2 h. Após esse período, foram adicionados 100 mM de GSH seguido de incubação por 24 h à 37ºC em estufa de CO_2. Na sequência, os poços foram lavados 2x com PBS 1x e foi adicionado 50 µM da sonda fluorescente DCFH (Dicloro-dihidro-fluoresceína) diluída em PBS, sendo incubados por 30 minutos. Após, os poços foram lavados 2x com PBS e foi adicionado 400 µM de H_20_2 e 48 µM de V_2. Imediatamente à adição dos compostos, foi realizada leitura da fluorescência no leitor de fluorescência TECAN nos seguintes parâmetros: λex= 485nm, λem = 530nm, nos tempos 0, 10min, 20min, 40min e 60 min.

5.8 ENSAIO DE SINERGISMO COM OS QUIMIOTERÁPICOS DOXORRUBICINA E PACLITAXEL

Para o ensaio de sinergismo do V_2 com os quimioterápicos doxorrubicina e paclitaxel, aproximadamente $5x10^3$ células/poço de MDA-MB-231 foram aderidas à placa de 96 poços por cerca de 2 h. Após, foram adicionados 48 µM de V_2 e a placa foi cultivada por 6 h. Após, o V_2 foi retirado e foram adicionados 0,01, 0,1, 1 e 10 µM de paclitaxel e 0,5, 1, 2 e 5 µM de doxorrubicina e a placa incubada para determinação da IC_{50}, para posteriormente ser realizado ensaio de MTT como já descrito acima.

5.9 PREPARAÇÃO DO OXIDOCOMPLEXO DE VANÁDIO(IV)

O composto $(Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(C_2O_4)\}_2(\mu\text{-}C_2O_4)]$, V_2, foi preparado no laboratório da Dra Giovana G. Nunes seguindo o protocolo previamente descrito (BAPTISTELLA.B, *et al.* 2021). O V_2 é um cristal azul esverdeado solúvel em água. O V_2 foi sintetizado a partir de uma suspensão amarela escura de pentóxido de vanádio (V_2O_5) (0,400 g ou 2,20 mmol) em 7,0 mL de água e recebeu a adição de 0,830 g de $H_2C_2O_4.2H_2O$ (6,60 mmol). A mistura de reação foi agitada à 60 ºC por 2 h, produzindo uma solução azul escura à qual foram adicionados 200 µL em 260 µL de álcool etílico (2,21 mmol) e 610 µL (4,39 mmol) de Et_3N. Após mais duas horas, a solução verde escura resultante foi filtrada e despejada em uma placa de Petri. Cristais azuis esverdeados claros foram formados após 24 h e o sobrenadante foi removido; os cristais foram lavados com 3x 5,0 mL de álcool etílico e finalmente secos ao ar para produzir 0,833 g de V_2. A pureza do composto foi confirmada por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e difração por raios X em monocristal. Análise elementar calculada (%) para $C_{18}H_{36}O_{16}N_2V_2$ (MM 638,37 g mol^{-1}): C, 33,86; H, 5,68; N, 4,38; encontrado: C, 33,97; H, 5,76; N, 4,32%. IV (KBr, cm^{-1} , f = forte, m = médio, fr = fraca, a = alargada): 3415(a) [ν(O-H), ν(N-H)], 1691(m) and 1637(m) [ν(C-O)], 1400(f) [ν(CO)], 1263(f) [$\nu(CO_2)$], 1161(fr) [ν (C-H)], 989(f) [ν(V=O)], 811(f) [ν(V-O)], 549(m) and 489(m)

[δ(V-O)]. A estrutura de $(Et_3NH)_2[\{VO(OH_2)(C_2O_4)\}_2(\mu\text{-}C_2O_4)]$ foi confirmada via análise de difração de raios X de monocristal. Monoclínico, grupo espacial P21/n (no. 14), a=7,7183(14) Å, b=18,529(3) Å, c=9,6202(16) Å, β=97,047(6), V=1365,4(4) $Å^3$. Z=2, Dc=1,553 mg m^{-3}, F(000)=664.

5.10 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO OXIDOCOMPLEXO DE VANÁDIO(IV)

Foi dissolvido 1 mmol (0,0013g) de V_2 em 2,0 mL de água deionizada, obtendo-se uma solução límpida de coloração azul clara. A concentração da solução obtida foi de 1 mmol L^{-1} foi calculada com base na formulação $C_{18}H_{36}O_{16}N_2V_2$ (638.37 g mol^{-1}). Embora tenha reportado que o V_2 é estável em solução aquosa por pelo menos 48 h, todos os ensaios descritos a seguir foram realizados empregando soluções recém preparadas que foram diluídas para a concentração desejada.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para citotoxicidade e determinação de IC_{50} e estabelecimento da curva de crescimento celular foi utilizado o Software GraphPad Prism 8.4.2. para Windows. GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com. Os valores foram expressos como médias aritméticas, com desvio padrão calculado para três experimentos independentes. As diferenças entre os múltiplos grupos e os controles, foram detectadas por *one-way ANOVA* seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey usando o GraphPad Prism. Já para o ensaio de migração celular a área da abertura foi fotografada e mensurada utilizando o software ImageJ®. E para o ensaio de expressão gênica foi utilizado o software Step One Plus.

Todos os dados foram obtidos a partir da triplicata de 3 experimentos independentes (para os experimentos de proliferação) e, portanto, os dados foram plotados como média ± desvio padrão.

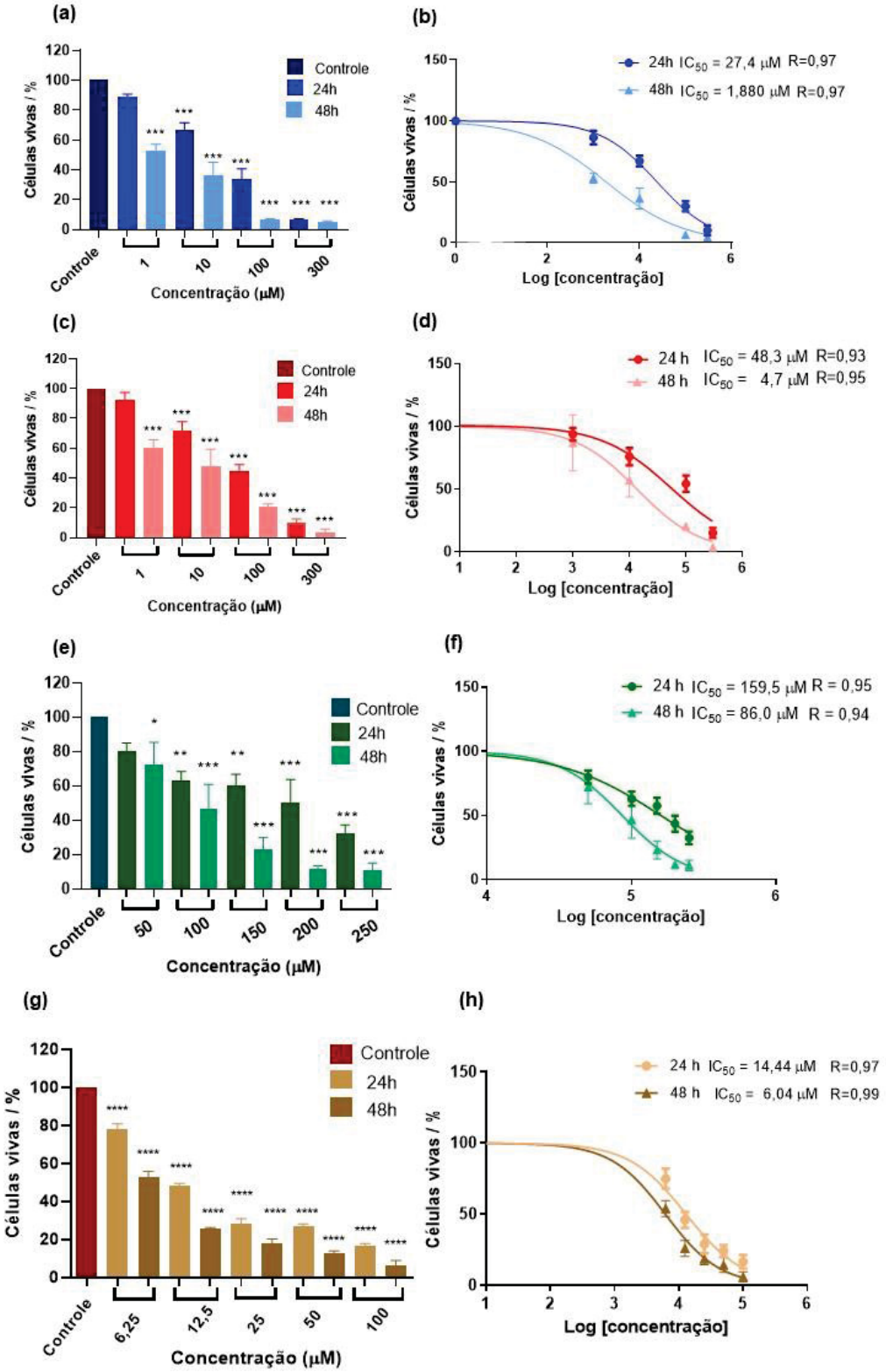
6. RESULTADOS

6.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE TEMPO

Os resultados de viabilidade celular para determinar o valor de IC_{50} do complexo binuclear de oxidovanádio(IV) e oxalato nas linhagens Hb4a, MDA-MB-231, MCF7 e 4T1 são apresentados na Figura 10.

Os dados foram plotados de acordo com o valor da viabilidade em relação ao tempo. Em seguida os dados foram submetidos ao tratamento matemático utilizando o software Prisma para ser obtido o valor exato de IC_{50}.

FIGURA 10 - **Efeito citotóxico e curva de IC_{50} do V_2 sobre a linhagem controle HB4a e sobre as linhagens de câncer de mama MCF7, 4T1 e MDA-MB-231**. HB4a (a-b) MDA-MB-231(c-d), MCF7(e-f) e 4T1(g-h), sendo *p=0,0356; p^{**}=0,0012, p^{***}<0,0001.



Em todas as linhagens observou-se efeito citotóxico dependente da concentração e do tempo de tratamento. Obteve-se um valor de IC_{50} no qual MCF7>MDA-MB-231>HB4a>4T1 (Tabela 4).

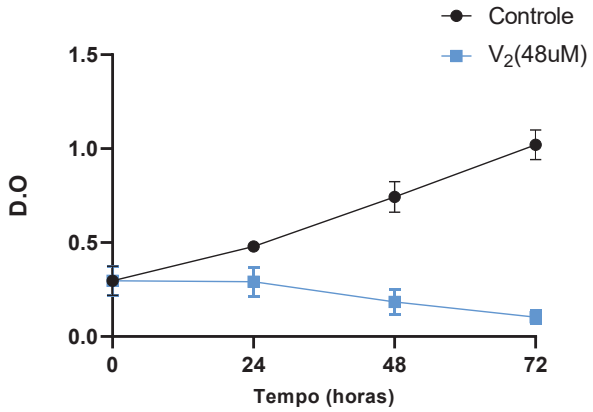
TABELA 4 - Comparação dos valores de IC_{50} nas linhagens de mama

Linhagem celular	IC50(μM)	
	24h	48h
4T1	14,4	6,0
HB4a	27,4	1,9
MDA-MB-231	48,3	4,7
MCF7	159,5	86

Foi observado que a linhagem controle HB4a se mostrou mais sensível que a linhagem luminal e TN humana, porém mais resistente que a linhagem TN murina. Já dentre as linhagens tumorais, a linhagem luminal mostra-se mais resistente do que as triplo negativas.

A partir desses dados acreditamos que o estudo seria mais promissor avaliando a linhagem MDA-MB-231 na avaliação do efeito citotóxico ao longo do tempo, já que seu valor de IC_{50} não foi tão alto em comparação com o subtipo luminal. Assim com base no valor da IC_{50} foi realizado ensaio do MTT ao longo de 24, 48 e 72 h (Figura 11).

FIGURA 11- **Efeito da IC_{50} do complexo V_2 na proliferação da linhagem MDA-MB-231 ao longo do tempo.** Em preto é representado o controle (não tratado) e em azul a linhagem tratada com V_2 por 24 h, 48 h e 72 h.

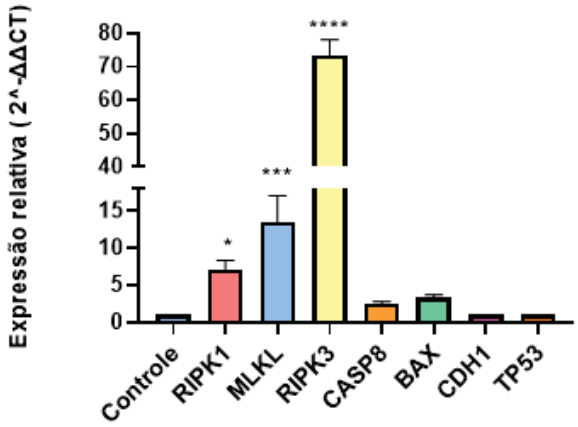


Os resultados confirmaram o efeito citotóxico do V_2 na linhagem MDA-MB-231, triplo negativo em humanos.

6.2 PCR EM TEMPO REAL

O ensaio de qPCR foi realizado a fim de se investigar o mecanismo de morte predominante associado ao tratamento. Para isso foram avaliados genes relacionados à necroptose (*RIPK1, RIPK3, MLKL*) e apoptose (*CASP 8, BAX, TP53*) e mecanismo metastático (*CDH1*) associado ao V_2 na linhagem MDA-MB-231 (Figura 12).

FIGURA 12 - **Expressão relativa dos genes de necroptose (*RIPK1, MLKL* e *RIPK3*), apoptose (*CASP8, BAX* e *TP53*) e metástase (*CDH1*) na linhagem MDA-MB-231.** Tratamento por 24 h com V_2, em que o controle representa todos os genes na linhagem não tratada. Sendo*p=0,0356; p^{***}=0,0015, p^{****}=0,0001



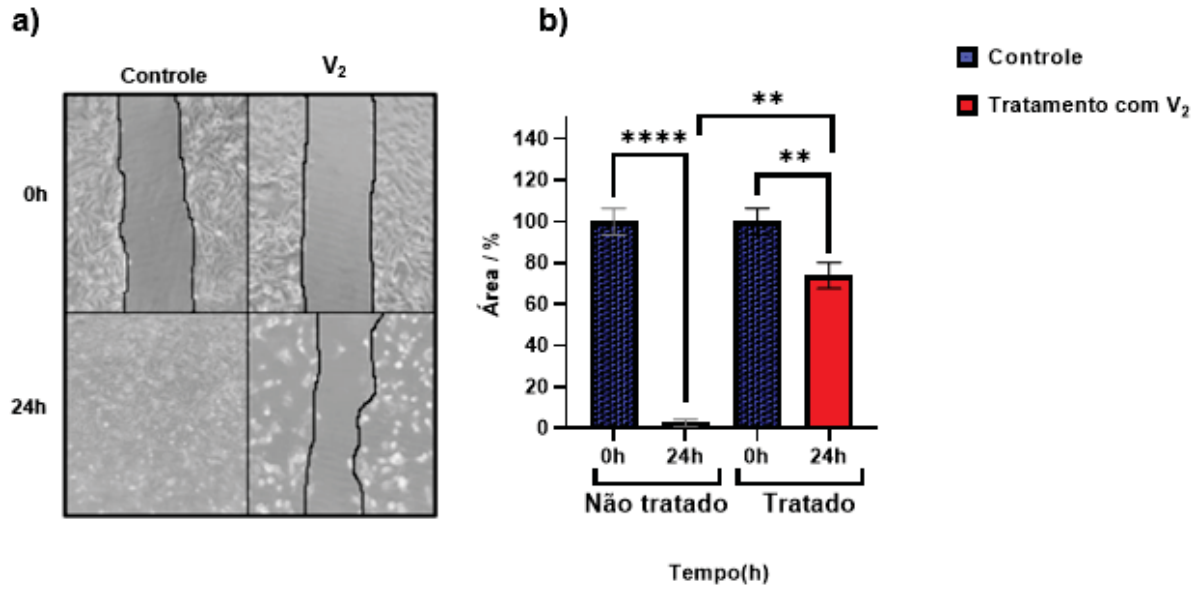
O gráfico de expressão gênica relativa da linhagem MDA-MB-231 mostra o controle, que seria obtido pela condição não tratada. Também, mostra que não houve aumento de expressão do gene *CDH1* e do gene *TP53.* Porém, houve aumento da expressão relativa de genes envolvidos no tipo de morte celular apoptose representados pelos genes *CASP8 e BAX*, cujo aumento foi de aproximadamente 2,5 e 3,4 vezes, respectivamente. Os genes da necroptose também aumentaram sua expressão, sendo eles: *RIPK1*, *MLKL* e *RIPK3*, cujo aumento foi de aproximadamente 7, 13 e 73 vezes, em comparação com o controle (não tratado).

6.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar um possível efeito do V_2 sobre o processo de migração celular, foi utilizada a IC_{50} (48μM) de V_2. A Figura 13(a) apresenta o padrão de migração da linhagem celular MDA-MB-231 sem e com tratamento nos tempos de 0 e 24 h. Os cultivos não tratados preencheram a fenda completamente no período de 24 h. No tratamento com o V_2 houve inibição da migração.

A Figura 13(b) representa a média da porcentagem das áreas de 3 das fendas no tempo 0 e 24h. Para o controle, foi determinada uma diminuição da área da fenda de 100% no tempo inicial para 0% após 24 h, com fechamento total. A adição de V_2 levou a uma redução da área da fenda de 100% para 77%, após as 24h.

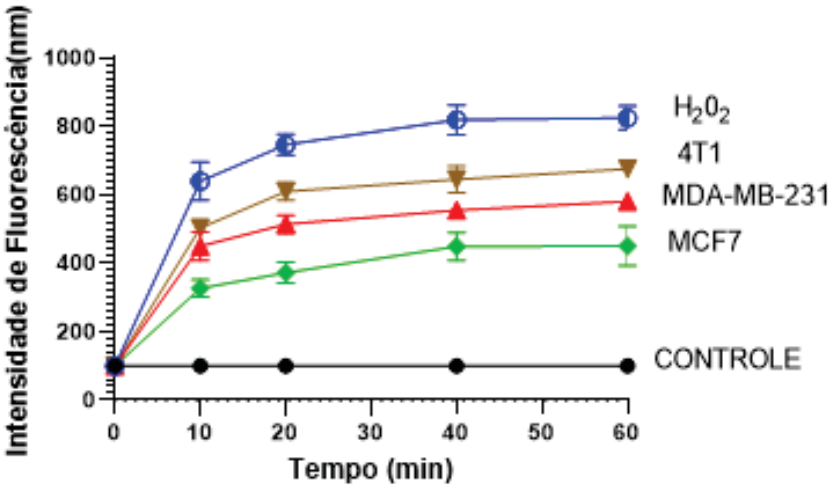
FIGURA 13 **- Inibição da migração da linhagem MDA-MB-231 tratada com V_2.** (a) Imagens da área do risco nos tempos 0 e 24h. (b). Medição da área do risco em todos os tempos avaliados sendo V_2 em vermelho e grupo controle vermelho texturizado. Os dados são plotados como média ± DP e as análises estatísticas são indexadas como **p=0,0011; p****< 0,0001.



6.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os resultados para determinação do estresse oxidativo por meio do percentual de fluorescência nas linhagens são demonstrados na Figura 14. O percentual de fluorescência é diretamente proporcional ao estresse oxidativo e produção de ERO. O nível de fluorescência é mensurado pela sonda DCFH-DA (diacetato de diclorofluoresceína), sendo amplamente utilizada para detectar ERO em células, porém mostra-se inespecífica. Após sua internalização e hidrólise pela célula, a molécula resultante, DCFH é oxidada e forma uma molécula fluorescente chamada de DCF (KIM. H, *et al.* 2020).

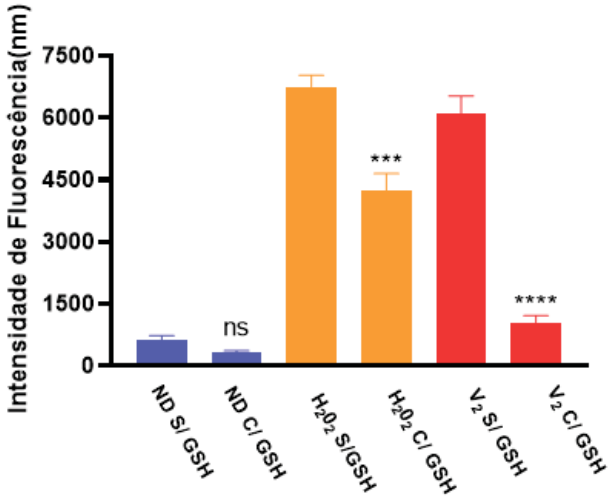
FIGURA 14 - **Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzida pelo complexo V_2 em diferentes linhagens celulares ao longo do tempo**. A curva representa a produção de ERO detectada pela sonda DCFH-DA. As células foram tratadas com o complexo V_2 na IC_{50} de cada linhagem. O H_2O_2 foi utilizado como controle positivo (azul), enquanto o meio sem tratamento foi o controle negativo (preto). As linhagens testadas foram 4T1 (marrom), MDA-MB-231 (vermelho) e MCF7 (verde). Os valores representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.



Foi observado que a intensidade de fluorescência, que mensura os níveis de ERO como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (·OH) variou entre as diferentes linhagens celulares. A maior produção de ERO foi detectada na linhagem 4T1, seguida pela linhagem MDA-MB-231 e, por fim, pela linhagem MCF7, corroborando os resultados do ensaio de citotoxicidade.

A seguir, a fim de verificar se a utilização de um antioxidante como o GSH poderia reverter o estresse oxidativo na linhagem TN humana, obtivemos o resultado da Figura 15.

FIGURA 15 - **Inibição do estresse oxidativo pela Glutationa (GSH) na linhagem MDA-MB 231 induzida pelo complexo V_2 e H_2O_2.** A intensidade de fluorescência (nm) representa a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o complexo V_2, com ou sem a presença do antioxidante glutationa (GSH). O grupo controle (ND) representado em azul, não apresentou alterações significativas na produção de ERO. O tratamento com H_2O_2 (laranja) e V_2 (vermelho) induziu estresse oxidativo, sendo reduzido significativamente pela presença de GSH, com maior eficácia para o grupo tratado com V_2. Os dados são expressos como média ± desvio padrão, sendo ns = não significativo, ***p < 0,001 e **p < 0,0001.



Observamos que, no grupo controle, a linhagem celular sem tratamento com V_2 ou peróxido de hidrogênio não apresentou alterações significativas na produção de ERO, com ou sem GSH. No grupo tratado com peróxido de hidrogênio, altos níveis de estresse oxidativo foram observados, mas reduziram significativamente com o tratamento prévio por um período de 24 h com GSH, similar ao grupo tratado com V_2. No entanto, o GSH mostrou maior eficácia em reduzir o estresse oxidativo induzido por V_2 do que pelo peróxido de hidrogênio, podendo estar relacionado aos tipos e quantidade de ERO gerados pelo V_2.

6.5 ENSAIO DE SINERGISMO COM OS QUIMIOTERÁPICOS DOXORRUBICINA E PACLITAXEL

Os resultados da curva de concentração dos quimioterápicos é demonstrado na Figura 16 (a-b), já o ensaio de sinergismo com os quimioterápicos doxorrubicina e paclitaxel na linhagem celular MDA-MB-231 são demonstrados na Figura 17 (a-b), respectivamente. Foi escolhida a IC_{50} dos quimioterápicos doxorrubicina (2µM)

e do paclitaxel (0,1μM) e para que então fosse avaliado seu efeito sinérgico com V_2.

FIGURA 16 – **Curva de concentração dos quimioterápicos doxorrubicina e paclitaxel para determinação da IC_{50}.** A linhagem celular MDA-MB-231 foi tratada por 48 h com os quimioterápicos, sendo o controle (linhagem não tratada) representado em azul escuro, em laranja o quimioterápico doxorrubicina e em roxo o paclitaxel, sendo p**=0,0038, p***=0,0027 e p****<0,0001.

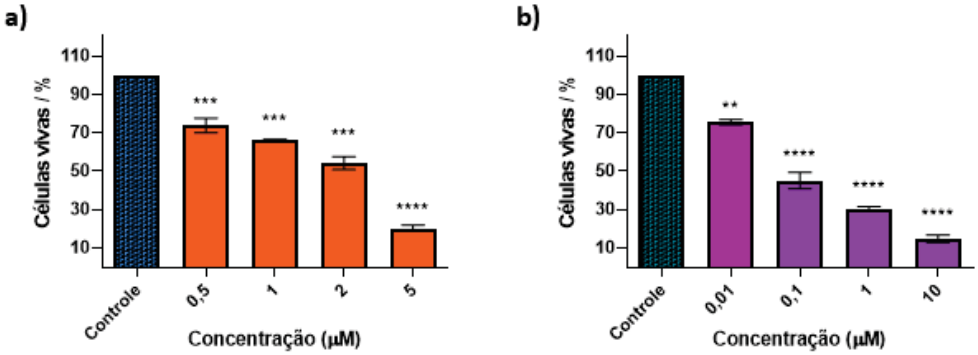
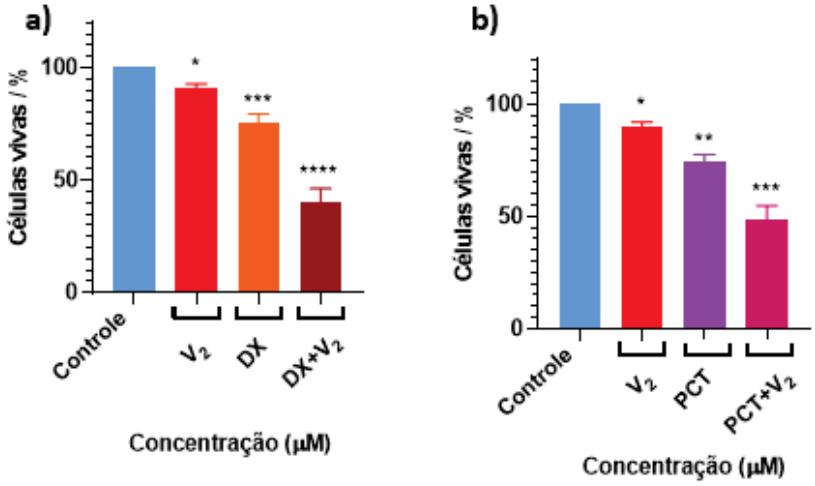


FIGURA 17 - **Ação sinérgica do V_2 na linhagem celular MDA-MB-231 com doxorrubicina (DX)-(a) e com paclitaxel (PCT)-(b**). A linhagem MDA-MB-231 foi tratada por 6 h com V_2 e por 24 h com os quimioterápicos a) doxorubicina (2 μM) e b) paclitaxel (1 μM), sendo p*=0,0313, p***=0,0002 e *p*****<0,0001.



No experimento, as células MDA-MB-231 tratadas com a IC_{50} de V_2 (48 μM) por 6 horas apresentaram uma redução de 15% na viabilidade celular. Em paralelo, o tratamento com doxorrubicina (DX) a 2 μM por 48 horas, concentração determinada por curva de dose, resultou em uma redução de 25%. Quando as células previamente tratadas com V_2 foram expostas ao DX, a viabilidade celular diminuiu em 60%, indicando sinergismo entre os tratamentos. No caso do paclitaxel (PCT), o tratamento com 0,1 μM por 48 horas (dado obtido por experimento

realizado em trabalho de colaboração no estudo de Leal *et al*, submetido), reduziu a viabilidade celular em 26%. Já a combinação de V_2 e PCT resultou em uma redução de 52%, novamente evidenciando sinergismo. Em resumo, os tratamentos isolados reduziram a viabilidade celular em 15% (V_2), 25% (DX), e 26% (PCT), enquanto as combinações V_2+DX e V_2+PCT reduziram 60% e 52%, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

Após 24 horas de incubação com V_2, todas as linhagens testadas apresentaram efeito citotóxico, com efeito mais acentuado após 48 horas. Em comparação com a linhagem controle, as tumorais exibiram comportamentos distintos. A triplo-negativa murina foi a mais sensível ao tratamento, enquanto a triplo-negativa humana apresentou sensibilidade intermediária, sendo mais sensível que a luminal. Por outro lado, a linhagem luminal foi a mais resistente entre as testadas.

A maior sensibilidade ao composto de vanádio observado na célula TN em comparação com a luminal, também foi observado na literatura, no caso do Metvan (ver Tabela 1). Ainda, em estudo realizado por GHOSH. N, *et al.* (2024) no qual um composto de vanádio denominado de complexo de oxidovanádio IV à base de metilimidazol, foi testado em células TN murinas 4T1 e TN humana MDA-MB-231, porém a IC_{50} encontrada foi similar entre as linhagens.

A partir da obtenção dos dados do ensaio de citotoxicidade escolhemos a IC_{50} da linhagem MDA-MB-231 para avaliar o perfil de migração dessa linhagem. Observamos uma possível diminuição do fenótipo migratório pois ocorreu mais do que 70% de inibição da migração em comparação ao controle não tratado. Porém, pelo fato do gene da E-caderina não ter sua expressão gênica aumentada, não se pode afirmar que o V_2 foi o responsável pela inibição da migração ou pelo efeito citotóxico nas células, acarretando em um efeito citoestático e citotóxico, levando à uma falsa impressão de diminuição da migração. Para que possamos ter certeza do possível efeito antimigratório e antimetástico outros ensaios devem ser realizados, como por exemplo ensaio de invasão em câmara de Boyden e ensaio de zimografia.

Com base nesses dados, a linhagem celular MDA-MB-231 foi escolhida para investigar, por expressão gênica, o mecanismo de morte celular devido à sua maior sensibilidade ao V_2 em relação à MCF7. Sabe-se que compostos de vanádio, especialmente com centros IV e V, podem induzir apoptose (KOWALSKI. S, *et al.* 2020). Com base nisso, nossos dados mostraram que na linhagem TN houve morte celular pela via extrínseca devido à expressão de *CASP8* a qual pode ter conduzido a abertura de poros na membrana das mitocôndrias mediada pelo aumento da expressão de *BAX*. Porém na ausência de aumento de expressão de *TP53* pode-se inferir que o V_2 não causou danos no DNA. Além disso observou-se também a presença de morte celular por necroptose, pois observamos aumento da expressão relativa dos genes *RIPK1, RIPK3* e *MLKL*. Esses genes estão envolvidos na formação do necrossoma, que juntamente com outros fatores, migra para a membrana celular causando sua ruptura e vazamento, levando à morte celular (LIU, *et al*. 2016). Sendo assim, esses resultados sugerem que a apoptose e a necroptose estão relacionadas com o efeito citotóxico do V_2.

Com base nos resultados do ensaio de expressão gênica na linhagem MDA-MB-231 e na citotoxicidade observada com o V_2, decidimos investigar a presença de radicais livres para justificar os resultados de morte celular. Nossos dados na Figura 14 indicam a produção de moléculas associadas ao estresse oxidativo, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila ($\cdot OH$). A intensidade da fluorescência da sonda DCFH, que não distingue espécies reativas específicas, foi proporcional à produção dessas moléculas. Diversos estudos na literatura demonstram que o mecanismo de escolha do tipo de morte celular foi predominante para necroptose. Em seu estudo ZHANG. D, *et al.* (2009), demonstra que a produção de ERO induz à necroptose. Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens celulares, uma delas uma linhagem normal de fibroblasto murino, denominada de NIH 3T3 que geralmente sofre apoptose quando estimulada pelo fator de necrose tumoral-α (TNFα) e outra também NIH 3T3 que possui morte celular independente de caspases, denominada de célula N. As células N tratadas com benziloxicarbonil-Val-Ala-Aspfluorometilcetona (zVAD) apresentaram aumento celular induzido por TNFα, ao contrário da outra linhagem celular. As células N apresentaram morfologia necrótica e como as duas linhagens foram

derivadas da mesma população de células, a alteração na expressão gênica celular pode explicar a mudança de apoptose para a necroptose nas células NIH 3T3. Análises revelaram que alguns genes que têm o potencial de regular a morte celular ou a sinalização de TNFα foram expressos de forma diferente nas linhagens celulares do estudo.

Em outro estudo, SCHENK. B, *et al.* (2015) demonstraram que as ERO podem atuar em um ciclo de feedback positivo para aumentar a produção de necrossomos. Neste estudo foi identificado que ERO podem ser reguladores críticos da sinalização necroptótica induzida pelo TNFα. Foi demonstrado que a morte celular induzida por TNFα depende da produção de ERO, pois vários eliminadores de ERO, como hidroxianisol butilado, *N* -acetilcisteína, α-tocoferol e etil piruvato, resgataram significativamente a morte celular. Antes da morte celular, a geração de ERO estimulada por TNFα promove a estabilização do complexo de necrossomo das proteínas RIPK1 e RIPK3 que interage com o receptor por meio de feedback positivo, pois, por um lado, os sequestradores de radicais atenuam a montagem do necrossomo e a fosforilação do domínio de quinase de linhagem mista (MLKL), mas, por outro lado, o silenciamento de RIPK1 ou RIPK3 reduz a produção de ERO.

Além do importante papel que RIPK3 desempenha no aumento da produção de ERO como demonstrado por ZHANG. D, *et al. (*2009), a proteína RIPK1 também tem esse papel evidenciado pelo estudo de ZHANG. Y, *et al.* (2017). Esse estudo demonstrou que RIPK1 também pode aumentar a produção de ERO. De fato, após o tratamento de células L929 com TNFα, ERO mitocondriais causaram modificação estrutural de RIPK1, favorecendo a formação do necrossomo.

Ainda, em estudo de CHO. Y, *et al*. (2009), foi demonstrado que a geração de ERO foi suprimida em várias linhagens celulares deficientes em RIPK3 ou MLKL, fornecendo assim evidências robustas para o envolvimento do estresse oxidativo na sinalização para necroptose.

Com base nessas descobertas, é provável que as ERO sejam um importante modulador de RIPK1, RIPK3 e MLKL, sendo que essa visão é apoiada pelas observações de que o silenciamento genético da NADPH oxidase 2 (NOX2), que é considerada um dos suprimentos mais importantes de ERO em condições

patológicas, foi protetor contra a necroptose de cardiomiócitos mediada pela superexpressão do RIPK3, pois melhorou a viabilidade celular, como é demonstrado nos estudos de RIVERA. J, *et al*. (2010) e por ZHANG. T, *et al*. (2016).

Em busca de uma teoria que possa interligar a produção de ERO e a necroptose, podemos citar os estudos sobre diabetes mellitus, conhecida por estar associada com um desequilíbrio redox, levando ao aumento da produção de ERO, uma vez que nessa doença ocorre peroxidação lipídica, alteração em sistemas enzimáticos como o da glutationa e diminuição de vitamina C (ASMAT. U, *et al*. 2016; OLUWAFEMI.O, *et al*. 2019).

Em estudo proposto por BRUNI. A, *et al*. (2018) e por ROJAS. J, *et al*. (2018) foi proposto que a necroptose ocorre como um mecanismo primário de células das ilhotas no desenvolvimento da diabetes mellitus e durante o transplante de ilhotas. Os autores descrevem que a exposição crônica das células beta pancreáticas (CBP) ao aumento da glicose resulta em estresse oxidativo ou indução de estresse oxidativo no retículo endoplasmático das CBP, levando a ativação de vias de sinalização de morte celular como por exemplo a necroptose. Ainda, em estudo desenvolvido por SUN. W, *et al*. (2017), um complexo RIPK1/RIPK3 foi formado em células de câncer de cólon HCT116 e HT29 tratadas com 2-metoxi-6-acetil-7-metiljuglona (MAM), em decorrência do aumento de ERO, pela despolarização mitocondrial e diminuição de ATP. Esta descoberta foi confirmada por experimentos que mostraram que a morte celular induzida por MAM foi atenuada pelo bloqueio farmacológico ou genético da sinalização de necroptose, incluindo o inibidor de *RIPK1* necrostatina-1s (Nec-1s) e silenciamento gênico mediado por siRNA de *RIPK1* e *RIPK3.*

Essa relação entre aumento da produção de ERO e morte necroptótica também foi evidenciado em células MDA-MB-231 em estudo de PATOMPONG. K, *et al*. (2019). Este estudo avaliou a atividade anticâncer do composto goniotalamina (GNT) em vias de sinalização celular de morte não apoptótica. A apoptose foi suprimida utilizando um inibidor de pan-caspase como controle para estudar se GNT induziu morte celular independente de caspase. Foi evidenciado que ocorreu o aumento da expressão dos genes *RIPK1*, *RIPK3* e *MLKL* e que os níveis de ERO intracelular e íons de cálcio citosólico estavam envolvidos na necroptose. Estudos

anteriores relataram que apenas peróxido de hidrogênio foi produzido em células cancerígenas tratadas com GTN. Porém, este estudo demonstra que o nível de radical ânion superóxido também aumentou, o que então gerou radicais de peróxido de hidrogênio. A partir deste estudo, a elevação de ERO foi aumentada em algumas horas e declinou para a linha de base após 12 horas de tratamento e que ERO foram subsequentemente conjugadas com GSH, fazendo com que seus níveis diminuíssem.

Ainda, em estudo de RAJAPAKSHA. G, *et al*. (2019), foi avaliada a atividade anticâncer por meio da necroptose utilizando uma naftoquinona isolada de plantas, sobutyrylshikonin (IBS), em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. As células ao serem testadas com inibidores de caspase, não tiveram redução da morte, indicando que a morte celular não foi causada por apoptose. O tratamento com necrostatina-1 (NS-1), um inibidor potente e seletivo da necroptose, inibiu a morte celular mediada pelo composto e, além disso, atenuou a porcentagem de células na fase sub-G1 após o tratamento. A análise de fluorescência usando diacetato de 2'7'-diclorofluorescina (DCFDA) mostrou aumento de ERO e demonstrou que seus inibidores como a N-acetilcisteína (NAC) e GSH reverteram completamente a morte celular induzida pelo composto. Além disso, o estudo de DAMU. SUNILKUMAR, *et al*. (2019), também demonstrou que o oxyresveratrol aumenta a produção de ERO na linhagem de células de câncer de mama humano triplo-negativo MDA-MB-231, levando à morte celular semelhante à apoptose, mas independente de caspases, sugerindo a possível ativação de vias alternativas de morte celular, como a necroptose.

A partir desses estudos, decidimos investigar e comparar o estresse oxidativo em cada linhagem celular e foi observado que a linhagem celular que apresentava maior IC_{50}, ou seja, que foi mais resistente ao V_2, como foi o caso da MCF7, apresentou menor intensidade de fluorescência, ou seja, houve menor estresse oxidativo com menor produção de ERO. Já a linhagem celular TN murina 4T1, apresentou o menor valor de IC_{50}, ou seja, foi mais sensível ao V_2 e apresentou o maior valor de intensidade de fluorescência, com maior estresse oxidativo e maior produção de ERO. A linhagem que apresentou um valor intermediário de IC_{50}, no caso da MDA-MB-231, apresentou uma intensidade intermediária de intensidade

de fluorescência, com um estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio também intermediária. Assim como na literatura, é visto que um maior estresse oxidativo, com maior produção de espécies reativas de oxigênio, pode estar relacionado à uma maior taxa de morte celular, o que poderia explicar os valores de IC_{50} obtidos. Esse fator pode explicar o porquê da linhagem MCF7 apresentar o maior valor de IC_{50} dentre os obtidos, pois infere-se que ela é mais resistente ao estresse oxidativo por produzir menos ERO. Além disso, existem outras hipóteses que além da menor produção de ERO podem ser responsáveis por sua maior resistência.

Segundo o autor Liu. Y, *et al*. (2005), essa linhagem é conhecida por expressar níveis elevados de transportadores da família ABC (ATP-binding cassette), como o ABCG2 (também conhecido como BCRP - Breast Cancer Resistance Protein). Esses transportadores atuam como bombas de efluxo, expulsando compostos citotóxicos do interior celular e contribuindo para a resistência à múltiplas drogas. A superexpressão de ABCG2 em células MCF7 tem sido associada à redução da eficácia de diversos agentes quimioterápicos. Além disso, segundo o estudo de MARTIN, M. B. *et al.* (2003), as células MCF7 são receptoras de estrogênio positivas (RE+), o que significa que possuem receptores de estrógeno funcionalmente ativos.

Estudos demonstraram que certos metais podem ativar o receptor de estrógeno, promovendo a proliferação celular. Por exemplo, metais como o vanadato têm a capacidade de estimular a atividade do ERα em células MCF7, resultando em aumento da proliferação celular. Essa resistência também pode estar associada aos mecanismos mais eficientes de reparo de DNA que essa linhagem possui. Essa capacidade de reparar danos no DNA pode contribuir para a resistência observada ao composto V_2. Por fim, segundo o autor KOPPARAPU. P, *et al*. (2024) e BRINKMANN. U, *et al.* (1997), a expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, pode ser mais pronunciada em células MCF7, conferindo-lhes uma maior resistência à indução de apoptose por agentes terapêuticos.

Foi realizado um ensaio com o antioxidante GSH para verificar se esse poderia reverter o estresse oxidativo. Foi observado que houve diminuição da

intensidade de fluorescência observada no ensaio com a sonda DCFH após o pré-tratamento com GSH, sugerindo que o estresse oxidativo induzido pelo composto está relacionado à geração de ERO. Segundo o autor AVERILL-BATES. D, *et al.* (2023), a GSH é um antioxidante intracelular crucial que atua diretamente na neutralização de ERO, convertendo-se em sua forma oxidada GSSG. Ainda, segundo o mesmo autor, um pré tratamento das células com GSH aumentaria seus níveis intracelulares, reforçando a capacidade antioxidante das células. Isso teria atenuado a geração ou os efeitos de ERO induzidas pelo composto, resultando na menor fluorescência detectada pela sonda. O ensaio com DCFH mede a fluorescência gerada pela oxidação do composto em presença de ERO, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (·OH) (JAKUBCZYK. K, *et al*. 2020). A redução da fluorescência após o pré-tratamento com GSH indica que o aumento inicial de fluorescência observado sem GSH estava provavelmente diretamente associado à presença dessas espécies.

Baseando-se nos estudos de Lin. K, *et al*. (2020) e Machado. S, *et al*. (2024), que relataram resultados positivos ao utilizarem metais como Rutênio e Zinco em sinergismo com os quimioterápicos doxorrubicina e paclitaxel em células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF7, optamos por investigar essa mesma abordagem utilizando o complexo V_2 na célula MDA-MB-231. Obtivemos um resultado positivo ao aliar o V_2 com os quimioterápicos.

Para doxorrubicina e paclitaxel isoladamente obteve-se um percentual de viabilidade celular de aproximadamente 75%, já para o V_2 isolado obtivemos um percentual de aproximadamente de 85%, porém quando as células foram tratadas primeiramente com V_2 e após o quimioterápico, a viabilidade celular foi para 40%, demonstrando sinergismo entre eles.

Sabe-se que o estado redox celular afeta a eficiência da quimioterapia direta ou indiretamente por múltiplos eventos biológicos, como indução de morte celular, reparos de danos ao DNA, reprogramação metabólica e modificação do ambiente tumoral (HUANG.G, *et al*. 2020). Os tratamentos citotóxicos desencadeiam estresse oxidativo nas células, que então geram níveis excessivos de ERO. Alternativamente, os agentes quimioterápicos podem modular a

compartimentalização de GSH, que por sua vez ativa caspases proteolíticas a jusante que afetam a morte celular (DAVIS. W, *et al*. 2025).

Segundo estudo de NARITA.N, *et al.* (2018), a GSH inativa ou exporta o quimioterápico cisplatina por meio da bomba de exportação de glutationa S-conjugada dependente de ATP em células de câncer de ovário, podendo isso também estar relacionado com o uso dos quimioterápicos paclitaxel e doxorrubicina. Ao aumentar o estresse oxidativo nas células pela exposição ao V_2, o sistema antioxidante possivelmente foi prejudicado e com isso a GSH, representante desse sistema, não conseguiu inativar ou exportar os quimioterápicos utilizados e, portanto, pode-se inferir que o aumento do estresse oxidativo esteja relacionado com a melhora da efetividade dos quimioterápicos em questão.

.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a eficiência do complexo binuclear de oxidovanádio (V_2) no tratamento de diferentes linhagens de câncer de mama, com destaque para sua maior citotoxicidade em células triplo-negativas (MDA-MB-231 e 4T1) em comparação com células luminais (MCF7). Este é um resultado satisfatório tendo em vista a falta de medicamentos eficientes contra esse subtipo de câncer TN. Os resultados sugerem que o V_2 é capaz de gerar estresse oxidativo e que este é o suficiente para desencadear a morte celular por necroptose e apoptose na linhagem CM TN. Além disso, o V_2 foi capaz de aumentar a sensibilidade à quimioterápicos de uso comum na terapia do CM. Sendo assim, propomos o V_2 como um agente candidato à estudos *in vivo* para validar sua futura aplicação e entendermos melhor os mecanismos moleculares envolvidos, garantindo segurança e eficácia no uso desse composto na terapia do CM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEOVA, A. *et al.* Interplay of Oxidative Stress and Necrosis-like Cell Death in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury: A Focus on Necroptosis. Biomedicines, v. 10, n. 1, p. 127, 2022.

AURELIANO, M.; SIMÃO, S. Peroxynitrite versus decavanadate protein oxidative modifications: the case of myosin. Free Radical Biology and Medicine, v. 120, p. S69, 2018.

AURELIANO, M. *et al.* Biological Consequences of Vanadium Effects on Formation of Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 6, p. 5382, 2023.

ALEKSANDAR. K, *et al.* Dinâmica de arquétipos orientada por composição em polioxovanadatos. Chemical science, v. 13, n. 21, p. 6397–6412, 2022.

ALMEIDA, V. L. DE *et al*. Cancer and cell cicle-specific and cell cicle nonspecific anticancer dna-interactive agenst: na introduction, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal, v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

AURELIANO, M.; OHLIN, C. A. Decavanadate in vitro and in vivo effects: facts and opinions. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 137, p. 123–130, 2014.

ARPS, D. P. *et al*. Invasive ductal carcinoma with lobular features: a comparison study to invasive ductal and invasive lobular carcinomas of the breast. Breast Cancer Research and Treatment, v. 138, n. 3, p. 719–726, 2013.

AURELIANO, M. *et al.* Polyoxidovanadates' interactions with proteins: An overview. Coordination Chemistry Reviews, v. 454, p. 214344, 2022.

AVERILL-BATES, D. A. Chapter Five - The antioxidant glutathione. 2023

BANSAL, A.; SIMON, M. C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. The Journal of Cell Biology, v. 217, n. 7, p. 2291–2298, 2018.

BAPTISTELLA. B.G, *et al;* An oxalate-bridged oxidovanadium (IV) binuclear complex that improves the in vitro cell uptake of a fluorescent glucose analog. Polyhedron, v. 198, n. 155071, 2021.

BERTRAND, B.; WILLIAMS, M.; BOCHMANN, M. Gold (III) Complexes for Antitumor Applications: An Overview. Chemistry: A European Journal, v. 24, n. 46, p. 11840–11851, 2018.

BIANCHINI, G. *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Nature Reviews Clinical Oncology, v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016

BYCZKOWSKI JZ. Oxidative stress and prooxidant biological effects of vanadium. Health Effects, p. 235–264, 2024.

BISHAYEE, A. *et al.* Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence. Cancer Letters, v. 294, n. 1, p. 1–12, 2010.

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

BRINKMANN, U.; MANSFIELD, E.; PASTAN, I. Effects of BCL-2 overexpression on the sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to ricin, diphtheria and Pseudomonas toxin and immunotoxins. Apoptosis, v. 2, n. 2, p. 192–198, 1997.

BRUNI, A. et al. Regulated Cell Death Seen through the Lens of Islet Transplantation. Cell Transplantation, v. 27, n. 6, p. 890–901, 2018.

CAPUOZZO. M, *et al*. Abordagens emergentes de tratamento para câncer de mama triplo-negativo. Oncologia médica, v. 41, n. 1, 2024.

CARVALHO, F.; AURELIANO, M. Polyoxometalates Impact as Anticancer Agents. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 5, p. 5043, 2023.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. Science, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011

CHEN, C. et al. Synthesis, structure, and catalytic bromination of supramolecular oxovanadium complexes containing oxalate. Journal of Coordination Chemistry, v. 66, n. 4, p. 671–688, 2013.

CHO, Y. et al. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. Cell, v. 137, n. 6, p. 1112–1123, 2009.

CLUSAN, L. *et al.* A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 7, p. 6834, 2023.

CURIGLIANO, G. *et al.* Understanding breast cancer complexity to improve patient outcomes: The St. Gallen International Consensus Conference for the Primary Therapy of Individuals with Early Breast Cancer 2023. Annals of Oncology, 2023.

DAMIANO, M. *et al*. Mitochondria in Huntington's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v. 1802, n. 1, p. 52–61, 2010.

DAVIS, W.; RONAI, Z.; TEW, K. D. Cellular Thiols and Reactive Oxygen Species in Drug-Induced Apoptosis. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 296, n. 1, p. 1–6,2025.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular Mechanisms of Action. European Journal of Pharmacology, v. 740, n. 1, p. 364–378, 2014.

DAI, X. et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. Journal of Cancer, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017.

DAMU SUNILKUMAR *et al.* Oxyresveratrol drives caspase-independent apoptosis-like cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells through the induction of ROS. Biochemical Pharmacology, v. 173, p. 113724–113724, 2019.

D'CRUZ, O. J.; UCKUN, F. M. Metvan: a novel oxovanadium (IV) complex with broad-spectrum anticancer activity. Expert Opinion on Investigational Drugs, v. 11, n. 12, p. 1829–1836, 2002.

DEBBIE, C. *et al.* Developing Vanadium as an antidiabetic or anticancer drug: a clinical and historical perspective. De Gruyter, 2019.

DEL RE, D. P. *et al.* Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. Physiological Reviews, v. 99, n. 4, p. 1765–1817, 2019.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer and Metastasis Reviews, v. 25, n. 1, p. 9–34, 2006.

DEVI, R. K. B.; DEVI, S. P.; SINGH, R. K. H. Synthesis, Characterization and DNA Interaction Study of a New Oxovanadium (IV) Complex Containing Acetylacetone and Dicyandiamide as Ligands. Spectroscopy Letters, v. 45, n. 2, p. 93–103, 2012.

DOUCETTE, K. A.; HASSELL, K. N.; CRANS, D. C. Selective speciation improves efficacy and lowers toxicity of platinum anticancer and vanadium antidiabetic drugs. Journal of inorganic biochemistry, v. 165, p. 56–70, 2016.

DIONÍSIO, P. A.; AMARAL, J. D.; RODRIGUES, C. M. P. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. Ageing Research Reviews, v. 67, p. 101263, maio 2021.

DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. Journal of Neuroinflammation, v. 15, n. 1, 2018.

FARRAR, M. C.; JACOBS, T. F *et al.* Paclitaxel. 2024.

FRAQUEZA, G.; AURELIANO, M. Polyoxovanadates Contribution to Pharmacological, Antimicrobial and Toxicological Actions of Vanadium. 2022.

FRAQUEZA, G. *et al.* Inhibition of Na+/K+- and Ca2+-ATPase activities by phosphotetradecavanadate. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 197, p. 110700–110700, 2019.

GAO, S. *et al.* Genomic locus proteomic screening identifies the NF-κB signaling pathway components NFκB1 and IKBKG as transcriptional regulators of Ripk3 in endothelial cells. PLoS ONE, v. 16, n. 6, p. e0253519–e0253519, 21 jun. 2021.

GHOSH, N. *et al.* Multifaceted antineoplastic curative potency of novel water-soluble methylimidazole-based oxidovanadium (IV) complex against triple negative mammary carcinoma. Cellular Signalling, v. 117, p. 111089, 2024.

GHOSH, S. *et al.* Cisplatin: The first metal based anticancer drug. Bioorganic Chemistry, v. 88, p. 102925, 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: the next Generation. Cell, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HUANG, G.; PAN, S. ROS-Mediated Therapeutic Strategy in Chemo-/Radiotherapy of Head and Neck Cancer. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2020, p. 1–30, 2020.

HIBA SEHIMI *et al.* Synthesis, structural study, magnetic susceptibility and antimicrobial activity of the first (μ-oxo)-bis (oxalato)-vanadium (IV) 1D coordination polymer. Journal of Molecular Structure, v. 1175, p. 865–873, 2019.

HESTI WIRASWATI *et al.* Pyrazoline B-Paclitaxel or Doxorubicin Combination Drugs Show Synergistic Activity against Cancer Cells: In silico Study. Advances and applications in bioinformatics and chemistry, v. Volume 17, p. 33–46, 2024.

IBRAGIMOVA, M. K. et al. Organ-Specificity of Breast Cancer Metastasis. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 21, p. 15625, 2023.

IDLAS, P. *et al.* Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors. Cancers, v. 13, n. 10, p. 2291, 2021.

JANTAS, D.; LASOŃ, W. Preclinical Evidence for the Interplay between Oxidative Stress and RIP1-Dependent Cell Death in Neurodegeneration: State of the Art and Possible Therapeutic Implications. Antioxidants, v. 10, n. 10, p. 1518, 24 set. 2021.

JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A.; TOP, S. Ferrocifen type anti cancer drugs. Chemical Society Reviews, v. 44, n. 24, p. 8802–8817, 2015.

JAKUBCZYK, K. *et al.* Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, v. 48, n. 284, p. 124–127, 2020.

JINAWONG, K. *et al.* Necrostatin-1 Mitigates Cognitive Dysfunction in Prediabetic Rats With No Alteration in Insulin Sensitivity. Diabetes, v. 69, n. 7, p. 1411–1423, 1 jul. 2020.

JUAN, C. A. *et al*. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

KARUNAKARAN, D. *et al*. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. Science Advances, v. 2, n. 7, p. e1600224, 2016.

KENNECKE, H.; *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. Journal of Clinical Oncology, v. 28, n. 20, p. 3271– 3277, 2010

KOPPARAPU, P. R. *et al*. Identification and characterization of a small molecule Bcl-2 Functional Converter. Cancer research communications, 2024.

KOUVATAS. C *et al.* Synthesis, crystal structure of the ammonium vanadyl oxalatophosphite and its controlled conversion into catalytic vanadyl phosphates. Journal of Solid State Chemistry, v. 253, p. 73–77, 2017.

KOWALSKI, S, *et al*. Molecular and Cellular Mechanisms of Cytotoxic Activity of Vanadium Compounds against Cancer Cells. Molecules, v. 25, n. 7, p. 1757, 2020.

KUMAR, A, *et al.* AR Imagem celular e fotocitotoxicidade direcionada a mitocôndrias em luz visível por oxigênio singlete usando um agente de reticulação de DNA Oxovanadium (IV) anexado a BODIPY. *Medchemcomm, 7*, 1398–1404. 2016.

KUMAR, A.; Pant, I.; Dixit, A.; Banerjee, S.; Banik, B.; Saha, R.; Kondaiah, P.; Chakravarty, AR Complexos de terpiridil oxovanádio (IV) para reticulação de DNA e fotocitotoxicidade direcionada a mito. *J. Inorg. Biochem. 174*, 45–54; 2017.

KITA. D, *et al.* Polyoxovanadates as new P-glycoprotein inhibitors: insights into the mechanism of inhibition. FEBS letters, v. 596, n. 3, p. 381–399, 2021.

KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2’,7’-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. Journal of Visualized Experiments, n. 160, 2020.

LEVINA, A. *et al.* Reactivity-activity relationships of oral anti-diabetic vanadium complexes in gastrointestinal media: an X-ray absorption spectroscopic study. Metallomics: integrated biometal science, v. 6, n. 10, p. 1880–8, 2014.

LEÓN, I. E. *et al.* Bis (oxalato) dioxovanadate (V) and Bis (oxalato) oxoperoxo-vanadate (V) complexes: Spectroscopic Characterization and Biological Activity. Biological Trace Element Research, v. 155, n. 2, p. 295–300, 2013.

LEON, I. *et al*. Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallodrugs with Anticancer Activity. Current Medicinal Chemistry, v. 24, n. 2, p. 112–148, 2017.

LIANG, Y. *et al*. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. Seminars in Cancer Biology, v. 60, n. 31421262, p. 14–27, 2020.

LIANG, W. *et al*. A novel damage mechanism: Contribution of the interaction between necroptosis and ROS to high glucose-induced injury and inflammation in H9c2 cardiac cells. International Journal of Molecular Medicine, v. 40, n. 1, p. 201–208, 2017.

LIMAIEM, F.; BUDH, D. P. Lobular Breast Carcinoma. 2023.

LIN. K. *et al.* Combination of Ruthenium Complex and Doxorubicin Synergistically Inhibits Cancer Cell Growth by Down-Regulating PI3K/AKT Signaling Pathway. Frontiers in Oncology, v. 10, 2020.

LIN, J. *et al.* A Role of RIP3-Mediated Macrophage Necrosis in Atherosclerosis Development. Cell Reports, v. 3, n. 1, p. 200–210, 2013.

Leon.I, *et al.* Antitumor properties of a Vanadyl (Iv) complex with the flavonoid chrysin [VO (Chrysin)2EtOH]2 in a human osteosarcoma model: The role of oxidative stress and apoptosis. *Dalton Trans. 42*, 11868, 2013.

LOIBL, S. *et al*. Breast cancer. The Lancet, v. 397, n. 10286, p. 1750–1769, 2021

LOPES, M. S. *et al.* A Non-Toxic Binuclear Vanadium (IV) Complex as Insulin Adjuvant Improves the Glycemic Control in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Pharmaceuticals, v. 17, n. 4, p. 486–486, 2024.

.LITTLER, J. S.; MALLET, A. I.; WATERS, W. A. 551. Oxidations of organic compounds with quinquevalent vanadium. Part IV. The oxidation of some α-glycols. Journal of the Chemical Society (Resumed), v. 0, n. 0, p. 2761–2766, 1960.

LIU, Y.; PENG, H.; ZHANG, J.-T. Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray. Molecular pharmacology, v. 68, n. 2, p. 430–8, 2005.

LIU, X. *et al*. Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. Oncotarget, v. 7, n. 16, p. 22219–22233, 2016.

LUÍSA, A. *et al.* Decavanadate and metformin-decavanadate effects in human melanoma cells. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 235, p. 111915–111915, 2022.

LUÍSA, A.; FRAQUEZA, G.; AURELIANO, M. Repurposing Therapeutic Drugs Complexed to Vanadium in Cancer. Pharmaceuticals, v. 17, n. 1, p. 12–12, 21 2023.

LUCAS, J. *et al.* Screening and validating the optimal panel of housekeeping genes for 4T1 breast carcinoma and metastasis studies in mice. Scientific Reports, v. 14, n. 1, 2, 2024.

MACHADO, S. *et al.* A New Heteroleptic Zn (II) Complex with Schiff Bases Sensitizes Triple-Negative Breast Cancer Cells to Doxorubicin and Paclitaxel. Pharmaceutics, v. 16, n. 12, p. 1610–1610, 2024.

MARET, W.; WEDD, A. G. Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2014.

MARTIN, M. B. *et al.* Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. Endocrinology, v. 144, n. 6, p. 2425–2436, 2003.

MARUPUDI, N. I. *et al.* Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. Expert Opinion on Drug Safety, v. 6, n. 5, p. 609–621, 2007.

MAKKI, A. M., *et al.* Electronic Physician (ISSN: 2008-5842). n. May, p. 1786–1790, 2016.

MASON, S. *et al.* Platinum-based chemotherapy for early triple-negative breast cancer. The Cochrane library, v. 2023, n. 9, 2023.

MUHAMMAD, N.; HANIF, M.; YANG, P. Beyond cisplatin: New frontiers in metallodrugs for hard-to-treat triple negative breast cancer. Coordination Chemistry Reviews, v. 499, p. 215507, 2024.

MOREL, I. *et al.* Kinetic evaluation of free malondialdehyde and enzyme leakage as indices of iron damage in rat hepatocyte cultures. Involvement of free radicals. Biochemical pharmacology, v. 39, n. 11, p. 1647–55, 1990.

NEDELJKOVIĆ, M.; DAMJANOVIĆ, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. Cells, v. 8, n. 9, p. 957, 2019.

NARITA, N. *et al.* Suppression of SESN1 reduces cisplatin and hyperthermia resistance through increasing reactive oxygen species (ROS) in human maxillary cancer cells**.** International Journal of Hyperthermia, v. 35, n. 1, p. 269–278, 2018.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. Medicine, v. 103, n. 3, p. e36905–e36905, 2024.

ONKAR, S. S. *et al*. The Great Immune Escape: Understanding the Divergent Immune Response in Breast Cancer Subtypes. Cancer Discovery, v. 13, n. 1, p. 23–40, 2022.

OGUNTIBEJU, O. O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, v. 11, n. 3, p. 45–63, 2019.

PATOMPONG. K, *et al.* Goniothalamin Induces Necroptosis and Anoikis in Human Invasive Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 16, p. 3953–3953, 2019.

PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. Coordination Chemistry Reviews, v. 301-302, p. 24–48, 2015.

PENG, F. et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 7, n. 1, p. 286, 2022.

PEROU. CM, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature.747-52, 2000.

PERIC, M. Density functional theory study of the magnetic coupling interaction in a series of binuclear oxalate complexes. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, v. 143, n. 4, p. 569–577, 2012.

QI, W. *et al.* The Anti-Proliferation Activity and Mechanism of Action of K12 [V18O42(H2O)]·6H2O on Breast Cancer Cell Lines. Molecules, v. 22, n. 9, p. 1535–1535, 2017.

RAUF, A. *et al.* Reactive oxygen species in biological systems: Pathways, associated diseases, and potential inhibitors—A review. Food Science and Nutrition, 1 dez. 2023.

RAJAPAKSHA G P T JAYASOORIYA et al. Isobutyrylshikonin Elicits Reactive

Oxygen Species-Mediated Necroptosis, not Apoptosis. LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY, v. 38(11), p. 2192–2197, 2019.

RAYOL MENDONCA-NETO *et al.* Classification of breast cancer subtypes: A study based on representative genes. Journal of the Brazilian Computer Society, v. 28, n. 1, p. 59–68, 2022.

REHDER, D. Import and Implications of Vanadium in Live Aspects. Inorganics, v. 11, n. 6, p. 256, 2023.

RIVERA, J. *et al.* Nox isoforms in vascular pathophysiology: insights from transgenic and knockout mouse models. Redox Report, v. 15, n. 2, p. 50–63, 2010.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. Nature, v. 205, n. 4972, p. 698–699, fev. 1965.

ROJAS, J. *et al.* Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. Journal of Diabetes Research, v. 2018, p. 1–19, 2018.

SAHADEVAN, M.; SUBRAMANIAN, K.; SUNDARAM, M. Quantum mechanical approaches and molecular docking studies of platinum based anticancer drugs Satraplatin and picoplatin structures. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 739, p. 150969, 2024.

SCHENK, B.; FULDA, S. Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNFα-induced necroptotic signaling and cell death. Oncogene, v. 34, n. 47, p. 5796–5806, 2015.

SCHMID, P. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. New England Journal of Medicine, v. 379, n. 22, p. 2108–2121, 2018.

SCHRÖRS, B. *et al.* Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. Frontiers in Oncology, v. 10, 2020.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). International Journal of Oncology, v. 54, n. 2, p. 407–419, 2017.

SHAATH, H.; ELANGO, R.; ALAJEZ, N. M. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. Cancers, v. 13, n. 21, p. 5350, 2021.

SLEDGE, G. W. *et al.* Phase III Trial of Doxorubicin, Paclitaxel, and the Combination of Doxorubicin and Paclitaxel as Front-Line Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer: An Intergroup Trial (E1193). Journal of Clinical Oncology, v. 21, n. 4, p. 588–592, 2003.

STAMPS, A. C. *et al.* Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. International Journal of Cancer, v. 57, n. 6, p. 865–874, 1994.

SUN, X. *et al.* CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. Cancer and Metastasis Reviews, v. 29, n. 4, p. 709–722, 2010.

SUN, W. *et al.* Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human colon cancer cells. Free Radical Biology and Medicine, v. 108, p. 433–444, 2017.

TAN, W.; PIERA PASINELLI; TROTTI, D. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis Of Disease, v. 1842, n. 8, p. 1295–1301, 2014.

TESCHKE, R. Aluminum, Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Cobalt, Copper, Iron, Lead, Mercury, Molybdenum, Nickel, Platinum, Thallium, Titanium, Vanadium, and Zinc: Molecular Aspects in Experimental Liver Injury. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 20, p. 12213, 2022.

THOMAS, J. P. *et al*. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. The Journal of biological chemistry, v. 265, n. 1, p. 454–61, maio 1990.

TONG, X. *et al.* Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. Journal of Hematology & Oncology, v. 15, n. 1, 2022.

TRAVERSO, N. *et al.* Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2013, p. 1–10, 2013.

TREVIÑO, S. *et al*. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. Biological Trace Element Research, v. 188, n. 1, p. 68–98, 2019.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. Aging Cell, v. 18, n. 6, 20 ago. 2019.

THORN, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenetics and Genomics, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

VASCONCELLOS, M. L. A. A. A teoria de pearson para a disciplina de química orgânica: um exercício prático e teórico aplicado em sala de aula. Química Nova, v. 37, n. 1, p. 171–175, 2014.

VISTICA, D. T. *et al*. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. Cancer Research, v. 51, n. 10, p. 2515–2520, 1991.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment. JAMA, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

WANG, C. *et al.* Phosphocreatine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress and activating TAK1 to promote myocardial survival in vivo and in vitro. Toxicology, v. 460, p. 152881, 2021.

YA JU CHANG *et al.* Gallic Acid Induces Necroptosis via TNF–α Signaling Pathway in Activated Hepatic Stellate Cells. PLOS ONE, v. 10, n. 3, p. e0120713–e0120713, 2015.

YEUNG, C; *et al.* Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours—a review. Cancer and Metastasis Reviews, 2016.

YE, F. *et al.* Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer, v. 22, n. 1, 2023.

YODER, B. J; *et al.* Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. The breast journal, v. 13, n. 2, p. 172–9, 2007.

YUAN, J.; DIMITRY OFENGEIM. A guide to cell death pathways. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2023.

Yu. Q, *et al.* Sodium Orthovanadate inhibits growth and triggers apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncol. Lett.* , *17*, 4255–4262, 2019

ZARDAVAS, D.; IRRTHUM, A.; SWANTON, C.; PICCART, M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. Nature reviews. Clinical oncology, v. 12, n. 7, p. 1–14, 2015.

ZAPOROWSKA. H.; WASILEWSKI, W.; SŁOTWIŃSKA, M. Effect of chronic vanadium administration in drinking water to rats. Biometals, v. 6, n. 1, p. 3–10, 1993.

ZHAI, F. *et al.* Synthesis and biological evaluation of decavanadate Na4Co $(H2O)_6V_{10}O_{28}\cdot 18H_2O$. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 63, n. 1, p. 51–55, 2009.

ZHANG, J. *et al.* Overcoming cancer drug-resistance calls for novel strategies targeting abnormal alternative splicing. Pharmacology & Therapeutics, v. 261, p. 108697–108697, 2024.

ZHANG, Y. *et al.* RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. Nature Communications, v. 8, n. 1, 2017.

ZHANG, D.-W. *et al.* RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. Science, v. 325, n. 5938, p. 332–336, 2009.

ZHANG, T. *et al.* CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress–induced myocardial necroptosis. Nature Medicine, v. 22, n. 2, p. 175–182, 2016.

ZHENG, Y. *et al.* Self-Assembly and Antitumor Activity of a Polyoxovanadate-Based Coordination Nanocage. Chemistry - A European Journal, v. 25, n. 67, p. 15326–15332, 2019.

ZHU, S.-S.; DONG, X.; ZHOU, Z.-H. Mixed ligand oxidovanadium (IV) complexes: Synthesis, spectral, structural characterization and catalytic degradations of methyl orange. Inorganica Chimica Acta, v. 486, p. 395–400, 2019.