

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

Ana de Araújo Sathler

**Avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de novos derivados de
quinazolina em modelo de adenocarcinoma mamário**

**Governador Valadares
2026**

Ana de Araújo Sathler

**Avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de novos derivados de
quinazolina em modelo de adenocarcinoma mamário**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Eustáquio Antunes

**Governador Valadares
2026**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sathler, Ana de Araújo.

Avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de novos derivados de quinazolina em modelo de adenocarcinoma mamário / Ana de Araújo Sathler. -- 2026.

86 p. : il.

Orientador: João Eustáquio Antunes

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2026.

1. câncer de mama. 2. derivados de quinazolininas. 3. atividade antitumoral. 4. modelo murinho 4T1. I. Antunes, João Eustáquio, orient. II. Título.

Ana de Araújo Sathler

Avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de novos derivados de quinazolina em modelo de adenocarcinoma mamário.

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovada em 27 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Eustáquio Antunes - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Luciana Souza Guzzo Costa

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Bethânia Alves de Avelar Freitas

Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri

Juiz de Fora, 04/03/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Joao Eustaquio Antunes, Professor(a)**, em 04/03/2026, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Souza Guzzo Costa, Professor(a)**, em 06/03/2026, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **BETHANIA ALVES DE AVELAR FREITAS, Usuário Externo**, em 27/03/2026, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2892601** e o código CRC **D6508E22**.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela proteção que me sustentou, por me revelar o caminho e dar a coragem para segui-lo.

Ao meu orientador **prof. Dr. João Eustáquio Antunes**, pela oportunidade concedida, pela orientação, pela disponibilidade e pela paciência.

À **profª. Drª. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro** e ao **prof. Dr. Caio Cesar de Souza alves**, por todos os ensinamentos e orientações que tornaram possível a execução do projeto.

Ao doutorando **Gracimério Guarneire** e os alunos de iniciação científica **Samuel Gouveia, Rebeca Rocha e Giovanna Duarte**. Meus companheiros de laboratório, cuja ajuda se tornou fundamental para a conclusão dos experimentos.

Ao meu amado esposo **Fillipe Fernandes**. Seu apoio, incentivo e companheirismo foram fundamentais para que esta jornada fosse possível.

A minha mãe **Josefina Gomes Sather**, pelo seu amor incondicional e pelas suas orações.

Ao meu colega **Vitor Estevão Ribeiro**, por toda a ajuda e companheirismo. Dividir as disciplinas com você tornou essa jornada mais leve.

À **Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Teófilo Otoni** e à **Universidade Federal de Juíz de Fora – Campus Governador Valadares**, por prover a estrutura necessária à execução deste trabalho.

Aos **professores do programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular** pelos ensinamentos transmitidos.

RESUMO

O câncer de mama é um crescimento descontrolado de células epiteliais originárias dos ductos ou lóbulos mamários. O Instituto Nacional de Câncer estima que o câncer de mama é o mais incidente em mulheres, com 73.610 novos casos de câncer de mama registrados para cada ano do triênio 2023-2025, correspondendo a taxa de 41,89 casos a cada 100 mil mulheres. Infelizmente, muitas terapias tradicionais voltadas ao tratamento do câncer de mama têm limitações que diminuem sua eficácia, incluindo problemas relacionados a reações adversas e ao desenvolvimento de resistência a fármacos. Derivados de quinazolininas demonstraram eficácia contra cânceres de diversos tipos, incluindo formas resistentes a fármacos, representando assim uma fonte rica para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento do câncer de mama. Este estudo avaliou o potencial citotóxico de novas quinazolininas por meio de ensaios de citotoxicidade *in vitro* e estudos de eficácia *in vivo*. Uma triagem *in vitro* revelou que duas novas quinazolininas denominadas KDY3 e KDY23 apresentaram promissora atividade em diversas linhagens celulares de câncer de mama (4T1, MDA-MB-231, MCF-7), exibindo IC₅₀ na faixa de 5,72 a 14,74 µM. Assim, ambas as substâncias foram selecionadas para estudos *in vivo*. As substâncias foram testadas em um modelo singênico de câncer de mama induzido pela inoculação ortotópica de células de câncer de mama murino 4T1 em camundongos BALB/c. Os camundongos foram divididos em grupos controle e tratados. Nos grupos de tratamento, os animais foram tratados com KDY3 (15 ou 30 mg/kg/semana, com uma dose inicial de 100 ou 200 mg/kg), e KDY23 (15 ou 30 mg/kg a cada três dias, com uma dose inicial de 100 ou 200 mg/kg) ou doxorrubicina (5 mg/kg/semana) como controle padrão. No esquema posológico de 30 mg/kg/semana com dose inicial de 200 mg/kg KDY3 reduziu significativamente o volume do tumor ($338,61 \pm 97,53 \text{ mm}^3$ vs. $545,49 \pm 151,56 \text{ mm}^3$ em grupos controles não tratados; $p = 0,024$) sem efeitos letais e sem redução significativa do peso dos animais. Já os animais do grupo que recebeu com doxorrubicina tiveram significativa redução de peso. Isso pode sugerir que o tratamento experimental com KDY3 pode ter demonstrado menor toxicidade em relação ao tratamento controle com doxorrubicina. A dosagem de citocinas revelou que KDY3 no esquema posológico de 30 mg/kg/semana com dose inicial de 200 mg/kg apresentou efeito imunomodulador,

uma vez que aumentou o nível de IFN- γ no tecido intratumoral. Em conclusão, a quinazolina KDY3 pode ser considerada uma candidata promissora a fármaco para tratamento de câncer de mama. Já KDY23 apresentou bons resultados *in vitro*, porém necessita-se de ajustes posológicos para diminuir sua toxicidade.

Palavras-chave: câncer de mama; derivados de quinazolininas; atividade antitumoral; modelo murinho 4T1.

ABSTRACT

Breast cancer is an uncontrolled growth of epithelial cells originating from the mammary ducts or lobules. The National Cancer Institute estimates that breast cancer is the most common cancer in women, with 73,610 new cases of breast cancer registered each year for the three-year period 2023-2025, corresponding to a rate of 41.89 cases per 100,000 women. Unfortunately, many traditional therapies for breast cancer treatment have limitations that diminish their effectiveness, including problems related to adverse reactions and the development of drug resistance. Quinazoline derivatives have demonstrated efficacy against various types of cancer, including drug-resistant forms, thus representing a rich source for the development of new chemotherapeutic agents for the treatment of breast cancer. This study evaluated the cytotoxic potential of new quinazolines through *in vitro* cytotoxicity assays and *in vivo* efficacy studies. An *in vitro* screening revealed that two new quinazolines, named KDY3 and KDY23, showed promising activity in several breast cancer cell lines (4T1, MDA-MB-231, MCF-7), exhibiting IC₅₀ values in the range of 5.72 to 14.74 μ M. Therefore, both substances were selected for *in vivo* studies. The substances were tested in a syngeneic breast cancer model induced by orthotopic inoculation of murine 4T1 breast cancer cells into BALB/c mice. The mice were divided into control and treated groups. In the treatment groups, animals were treated with KDY3 (15 or 30 mg/kg/week, with an initial dose of 100 or 200 mg/kg), and KDY23 (15 or 30 mg/kg every three days, with an initial dose of 100 or 200 mg/kg) or doxorubicin (5 mg/kg/week) as a standard control. In the 30 mg/kg/week dosing regimen with an initial dose of 200 mg/kg, KDY3 significantly reduced tumor volume ($338.61 \pm 97.53 \text{ mm}^3$ vs. $545.49 \pm 151.56 \text{ mm}^3$ in untreated control groups; $p = 0.024$) without lethal effects and without significant reduction in animal weight. Animals in the doxorubicin group, however, experienced significant weight reduction. This may suggest that experimental treatment with KDY3 may have demonstrated lower toxicity compared to the control treatment with doxorubicin. Cytokine dosage assays revealed that KDY3, at a dosage regimen of 30 mg/kg/week with an initial dose of 200 mg/kg, showed an immunomodulatory effect, as it increased the level of IFN- γ in intratumoral tissue. In conclusion, the quinazoline KDY3 can be considered a promising drug candidate for the treatment of breast cancer. KDY23, on the other hand, showed good results *in vitro*, but dosage adjustments are needed to reduce its toxicity.

Keywords: breast cancer; quinazoline derivatives; antitumor activity; 4T1 murine model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	– Classificação do câncer de mama em diferentes subtipos de acordo com o perfil de expressão de receptores.....	20
Figura 1	– Subtipos de câncer de mama: prognóstico e tratamentos padrão.....	25
Figura 2	– Papel das diferentes células e citocinas na imunoeedição e na progressão tumoral.....	33
Figura 3	– Estrutura química da quinazolina.....	39
Figura 4	– Estrutura molecular dos derivados de quinazolininas estudados.....	44
Esquema 1	– Delineamento experimental do ensaio in vivo.....	47
Figura 5	– Indução tumoral: aplicação das células 4T1 na gordura mamária da mama caudal esquerda.....	49
Figura 6	– Medida da largura do tumor utilizando paquímetro.....	50
Figura 7	– Viabilidade celular das células MDA-MB-231 tratadas com 50 μ M por 48 horas.....	54
Figura 8	– Viabilidade celular das células MCF-7 tratadas com 50 μ M por 48 horas.....	54
Figura 9	– Viabilidade celular das células 4T1 tratadas com 50 μ M por 48 horas.....	55
Figura 10	– Massa corporal dos grupos de camundongos BALB/c ao longo do tratamento.....	60
Figura 11	– Volume tumoral dos grupos de tratamento e controle inoculados com carcinoma mamário 4T1.....	62
Figura 12	– Peso dos linfonodos inguinais dos animais dos grupos de tratamento e controle inoculados com carcinoma mamário 4T1.....	65
Figura 13	– Peso dos baços dos animais dos grupos de tratamento e controle inoculados com carcinoma mamário 4T1.....	65
Figura 14	– Comparação visual dos baços extraídos dos camundongos BALB/c.....	67
Figura 15	– Avaliação das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-12p70 no tumor de camundongos BALB/c induzidos com células 4T1.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de IC50 (μM) dos derivados de quinazolinas contra três linhagens de células de câncer de mama tratadas por 48 horas <i>in vitro</i>	56
Tabela 2 – Peso do baço e linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c dos grupos de tratamento e controle.....	64
Tabela 3 – Concentração de citocinas (pg/mL) nos tumores dos grupos tratados (I-V) e não tratado (VI).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADC	<i>Antibody-Drug Conjugate</i> – Anticorpo conjugado à fármaco
ADCC	<i>Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i> – Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> - Comitê Conjunto Americano sobre Câncer
AKT	Serina/treonina quinase 1
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
BALB/c	Linhagem específica de camundongo de laboratório
BRCA1	Gene 1 do Câncer de Mama
BRCA2	Gene 2 do Câncer de Mama
CD	Célula dendrítica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
CSDM	Células supressoras derivadas da linhagem mieloide
CSF	Fator Estimulante de Colônia
CTRL	Controle
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DI	Dose inicial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
DS	Dose subsequente
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAC	Fibroblastos Associados ao Câncer
FAMMUC	Faculdade de Medicina do Mucuri
FGFR	Receptores do fator de crescimento de fibroblastos

G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
i.p.	Intraperitoneal
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INT	Induzido e não tratado
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MAT	Microambiente Tumoral
MMP	Metaloproteinases de Matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NAT	Neutrófilos Associados ao tumor
NCI	<i>National Cancer Institute</i> - Instituto Nacional do Câncer
NK	Natural Killer
NOS	Espécies Reativas de Nitrogênios
OD	Densidade ótica
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PARPc	Poli(ADP-ribose) polimerase clivada
PBS	Solução Salina Tampão Fosfato
PD-1	Receptor de morte celular programada 1
PD-L1	Ligante de morte programada 1
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
P-gp	Glicoproteína P
PI3K	Fosfoinosítideo 3 quinase
RE	Receptor de Estrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RP	Receptor de Progesterona

RTK	Tirosina quinases transmembrana ligadas a receptores
s.c.	Subcutânea
STAT3	Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora da Transcrição 3
TE	Terapia endócrina
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
Th	Célula T auxiliar
TK	Tirosina Quinase
TNBC	Câncer de Mama Triplo-Negativo
TNF	Fator de necrose tumoral
TNM	<i>Tumor, Nodes, Metastasis</i> – Tumor, Linfonodos, Metástase
TopII	Topoisomerase II
Treg	Célula T reguladora
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Câncer de mama	17
2.1.1 Carcinogênese	17
2.1.2 Classificação	18
2.1.3 Diagnóstico e estadiamento	21
2.2 Tratamentos para o câncer de mama	23
2.2 Modulação do microambiente tumoral	30
2.3 Modelos pré-clínicos no câncer de mama	35
2.4 Derivados de quinazolininas	38
3 OBJETIVO GERAL	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Substâncias teste	42
4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	43
4.2.1 Cultura de células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231	44
4.2.2 Ensaio de viabilidade celular MTT	44
4.3 Ensaio <i>in vivo</i>	45
4.3.1 Animais	47
4.3.2 Indução tumoral	47
4.3.3 Avaliação do volume do tumor e do peso dos animais	48
4.3.4 Grupos experimentais e tratamento	49
4.3.5 Eutanásia dos animais	50
4.4 Dosagem das citocinas	51
4.5 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Ensaio de viabilidade das células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com os derivados de quinazolina	53
5.2 Atividade antitumoral	59
5.3 Análise de citocinas	69
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	85
ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	85

1 INTRODUÇÃO

O Observatório Global do Câncer estima que em 2022 o câncer de mama foi o tipo de câncer com maior incidência em mulheres, contando com aproximadamente 2,29 milhões de novos casos mundialmente. Além de liderar em incidência, o câncer de mama também se destaca como a principal causa de morte relacionada ao câncer na população feminina, tendo sido responsável por aproximadamente 670 mil óbitos neste mesmo ano. Estima-se que até 2050, novos casos e mortes terão aumentado em 38% e 68%, respectivamente, impactando desproporcionalmente os países com baixo IDH (Ferlay et al., 2024; Kim et al., 2025).

O Brasil segue a tendência mundial com o câncer de mama liderando as estatísticas de cânceres que mais afetam as mulheres, com estimativa de 73.610 mil novos casos para cada ano do triênio 2023-2025, totalizando 30,1% dos casos de câncer, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 41,89 casos por 100.000 mulheres. A taxa de mortalidade é de 11,71/100 mil no ano de 2021, compondo a maior taxa de mortalidade de câncer entre as mulheres (INCA, 2022; Santos, 2023).

Os carcinomas de mama apresentam alta heterogeneidade biológica, o que resulta em diferentes prognósticos e respostas terapêuticas. No tratamento do câncer de mama podem ser considerados diversos esquemas terapêuticos, que consiste em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. Apesar dos riscos associados a curto e longo prazo, a quimioterapia continua sendo um tratamento essencial para prevenir a recidiva em muitas pacientes com câncer de mama (Warks; Winer, 2019; Zeng et al., 2025).

A terapia anticâncer com quimioterápicos tem como desafio o desenvolvimento de resistência aos agentes citotóxicos e as pronunciadas reações adversas, tais como a cardiotoxicidade irreversível que pode ser desencadeada pela doxorrubicina. Neste contexto, torna-se necessário a prospecção de novos fármacos que demonstrem atividade antitumoral, que sejam seguros e eficazes para que possam ser utilizados na terapêutica (Bansal e Malhotra, 2021; Burguin et al., 2021; Sheibani et al., 2022).

Na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos de câncer, o uso de modelos pré-clínicos é crucial. Tais modelos devem representar a doença, para que seja feita a busca e validação de novos fármacos. Assim, a cultura de células tem sido amplamente usada na pesquisa pré-clínica para prospecção de possíveis alvos

terapêuticos e triagem de atividade de potenciais novos fármacos. Entretanto, as culturas não podem prever como um fármaco irá se comportar em uma população de pacientes uma vez que elas não modelam adequadamente a biologia do tumor nativo (Ibarrola-Villava et al., 2018).

Para suprir esta necessidade, modelos de tumor singênicos (também conhecidos como modelos aloenxerto) podem ser aplicados. Esses modelos são provenientes de tecidos tumorais derivados do mesmo histórico genético de uma determinada linhagem de camundongo, criando um modelo imunocompetente. Isso se faz uma vantagem, uma vez que por meio deste modelo, é possível a avaliação da modulação imune da substância testada e também a avaliação do impacto desta substância no microambiente tumoral (Park et al., 2018).

Na busca por novos fármacos, surge grande interesse por novos derivados de quinazolina (1,3-benzodiazina), que é uma das classes mais ativas de compostos aromáticos heterocíclicos nitrogenados. A quinazolina frequentemente constitui o grupo farmacofórico de muitos fármacos que expressam diversas propriedades e atividades biológicas: anti-inflamatórias, antiproliferativas, analgésicas, antidepressivas, antibacterianas, antifúngicas e antivirais (Wdowiak et al., 2021).

Os efeitos antitumorais das quinazolininas podem se manifestar por meio de diversas vias, sendo a mais comum a inibição de receptores de tirosina quinase (RTK) - via crucial em atividade celulares como crescimento, proliferação e diferenciação, e cuja mutação está associada à carcinogênese (García-Aranda; Redondo, 2017; Ferreira et al., 2022).

Assim, planejar e avaliar novos derivados de quinazolininas em modelos experimentais de câncer de mama *in vitro* e em modelos tumorais *in vivo* que mimetizam o desenvolvimento do câncer de mama triplo negativo (TNBC) torna-se importante ferramenta na pesquisa deste tipo de câncer. Os modelos murinos são utilizados para preencher a lacuna entre os estudos pré-clínicos e clínicos, com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança de candidatos a agentes terapêuticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de mama

As células se dividem constantemente nos processos de crescimento e desenvolvimento. Durante esses períodos, diversas mutações podem se acumular no DNA, e as células normais se transformam em células cancerosas como resultado dessas mutações. Aproximadamente 85% das formações cancerosas são observadas em células epiteliais e são denominados carcinomas. Aquelas que se originam em células mesodérmicas (como osso e músculo) são sarcomas, e os cânceres de tecido glandular são definidos como adenocarcinomas (Akbaba et al., 2021).

O câncer de mama é um adenocarcinoma que se desenvolve a partir das células das glândulas mamárias, que são células epiteliais de origem embrionária e que formam ductos e lóbulos no órgão saudável. Portanto, o tumor pode surgir a partir das células dos ductos (carcinoma ductal invasivo) ou a partir das células dos lobos mamários (carcinoma lobular invasivo). Cerca de 50% a 80% dos casos de câncer de mama recém-diagnosticados são classificados como carcinoma ductal invasivo (Nascimento; Otoni, 2020).

2.1.1 Carcinogênese

Diversos elementos contribuem para o surgimento do câncer de mama, incluindo predisposição hereditária, fatores ambientais e hábitos de vida - como sedentarismo e alimentação inadequada. Além disso, condições como mutações em genes específicos (como BRCA1 e BRCA2), idade avançada, sexo feminino, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, falta de amamentação, histórico familiar positivo, tecido mamário denso, terapia hormonal e histórico de radioterapia no tórax estão ligadas ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama (Xiong et al., 2025).

O câncer de mama é muito mais provável de ocorrer em mulheres do que em homens e também está altamente associado ao avanço da idade e à raça, com mulheres brancas apresentando as maiores taxas gerais de câncer de mama, seguidas por mulheres negras, asiáticas e hispânicas, respectivamente. Mulheres com um parente de primeiro grau que teve câncer de mama tem duas a três vezes

mais chances de desenvolver câncer de mama ao longo da vida (Admoun; Mayrovitz, 2022).

A carcinogênese mamária consiste em uma série de eventos genéticos e ambientais que impulsionam o processo de transformação de células normais em células cancerosas. Essa transformação ocorre em estágios distintos, começando com a multiplicação excessiva de células (hiperplasia), seguida por mudanças pré-cancerosas e, finalmente, pelo desenvolvimento de um tumor localizado (carcinoma *in situ*) (Xiong et al., 2025).

No carcinoma *in situ*, as células anormais se multiplicam, mas permanecem separadas do tecido circundante por uma camada intacta de células mioepiteliais e pela membrana basal. A progressão para um câncer invasivo ocorre quando essas barreiras protetoras se rompem: as células mioepiteliais são destruídas e a membrana basal é degradada. Esse processo permite que as células cancerosas invadam os tecidos próximos, caracterizando o carcinoma invasivo, e, em estágios avançados, se espalhem para outras partes do corpo (metástase) (Cowell et al., 2013).

As células do câncer de mama metastático, ao se disseminarem pelo sangue ou sistema linfático, tendem a se alojar principalmente em ossos, fígado, pulmões e cérebro. Como as metástases são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas à doença, identificar precocemente esses focos de disseminação é crucial para melhorar as chances de tratamento, aumentar a sobrevida dos pacientes e reduzir significativamente os óbitos (Ibragimova et al., 2023).

2.1.2 Classificação

Os tumores mamários podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas devido a sua alta heterogeneidade biológica. A classificação dos carcinomas de mama pode ser feita em quatro subtipos com base na expressão de receptores proteicos utilizando técnicas de imuno-histoquímica e perfil de expressão genética. Os quatro subtipos são: Luminal A, Luminal B, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2) enriquecido e Triplo-Negativo/basalóide (TNBC) (Zeng et al., 2025).

Esses subtipos são comumente agrupados em quatro categorias com base na expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais: receptor de estrogênio

positivo (RE+), receptor de progesterona positivo (RP+), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2+). O quadro 1 sumariza os subtipos conforme o seu perfil de expressão de receptores (Orrantia-Borunda et al., 2022).

Quadro 1 – Classificação do câncer de mama em diferentes subtipos de acordo com o perfil de expressão de receptores.

Subtipo	Perfil de expressão	Características
Luminal A	RE+, RP+/-, HER2-	<ul style="list-style-type: none"> - Frequência: 50 a 70% - Baixa expressão do marcador de proliferação ki67 - Responsivo à hormonioterapia e quimioterapia - Bom prognóstico
Luminal B	RE+, RP+/-, HER2+/-	<ul style="list-style-type: none"> - Frequência: 10-20% - Alta expressão do marcador de proliferação ki67 - Responsivas à hormonioterapia - Resposta variável à quimioterapia e a terapia anti-HER2 - Prognóstico regular
Her2-enriquecido	RE-, RP-, HER2+	<ul style="list-style-type: none"> - Frequência: 10 a 15% - Alta expressão do marcador de proliferação ki67 - Responsivo à quimioterapia e a terapia anti-HER2 - Prognóstico regular/ruim
Triplo negativo/basalóide (TNBC)	RE-, RP-, HER2-	<ul style="list-style-type: none"> - Frequência: 10 a 15% - Alta expressão do marcador de proliferação ki67 - Responsivas à quimioterapia - Prognóstico ruim

Fonte: Adaptado de Breast Cancer Resource Book ATCC (2024).

Luminal A, o subtipo mais comum (representando 50–70% de todos os casos de câncer de mama), é definido por alta expressão de receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP) e a ausência do HER2, e apresentam baixa expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 (menos de 20%). O antígeno Ki67 é um marcador de proliferação celular. A alta expressão de Ki67 também reflete

menores taxas de sobrevivência (Orrantia-Borunda et al., 2022). Os tumores Luminal A são considerados de baixo grau devido ao seu crescimento lento e prognóstico favorável devido a uma resposta elevada à terapia (Boix-Montesinos et al., 2021; Orrantia-Borunda et al., 2022).

O subtipo Luminal B constitui 10–20% dos tumores luminais e é definido pela expressão de RE e RP e expressão elevada de Ki67, podendo ser HER2+ ou HER2-. Os tumores Luminal B são geralmente diagnosticados em pacientes jovens e sofrem de um prognóstico menos favorável do que o subtipo Luminal A devido ao crescimento tumoral acelerado (Boix-Montesinos et al., 2021; Orrantia-Borunda et al., 2022).

O subtipo HER2-enriquecido constitui 10–15% dos cânceres de mama e é caracterizado pela alta expressão de HER2 e pela ausência de expressão de RE e RP. Os cânceres de mama HER2-enriquecidos apresentam crescimento tumoral mais rápido, desenvolvimento mais agressivo e têm um prognóstico pior em comparação aos subtipos Luminal A e B (Boix-Montesinos et al., 2021).

As proteínas da família do receptor do fator de crescimento epidérmico humano estão entre os receptores tirosina quinases mais estudados. Essa família consiste em quatro membros: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR, também conhecido como HER1), HER2, HER3 e HER4. A superexpressão de HER2 é causada principalmente pela amplificação do seu gene. O receptor HER2 é único porque não possui um ligante conhecido e funciona por meio da heterodimerização induzida por ligante, particularmente com o HER3. Os heterodímeros HER2/HER3 são frequentemente observados no câncer de mama e são cruciais para a ativação de vias de sinalização a jusante, como Ras/Raf/MAPK, que estão envolvidas em diversos processos críticos, como proliferação celular, migração, invasão, atividade antiapoptótica e angiogênese (Bai et al., 2023; Li et al., 2025; Miski et al., 2025).

O subtipo TNBC representa cerca de 10 a 15% de todos os casos de câncer de mama e está frequentemente presente em mulheres jovens (<40 anos). O TNBC é caracterizado pela ausência de expressão de RE, RP e HER2 e alta expressão de Ki67, e frequentemente apresentam comportamento proliferativo mais agressivo, com o prognóstico menos favorável entre os subtipos de câncer de mama (Boix-Montesinos et al., 2021; Orrantia-Borunda et al., 2022; Riaz et al., 2025; Zagami; Carey, 2022).

O *National Cancer Institute* (NCI), instituição do governo dos Estados Unidos, relata a porcentagem de sobrevivência relativa de 5 anos para o câncer de mama,

mostrando que o melhor padrão de sobrevivência foi para mulheres com subtipo luminal A, com taxa de sobrevivência de 94,4%, seguido pelo subtipo luminal B com 90,7%, subtipo HER2 com 84,8% e o subtipo TNBC teve a menor taxa (77,1%). É importante mencionar que, embora o subtipo de câncer de mama afete a sobrevivência, o estadiamento no momento do diagnóstico pode ser o fator mais importante na determinação do resultado de sobrevivência.

2.1.3 Diagnóstico e estadiamento

O sintoma mais comum de câncer de mama é o aparecimento de nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, mas há tumores que são de consistência branda, globosos e bem definidos. Outros sinais de câncer de mama são: edema cutâneo, retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo e secreção papilar, especialmente quando é unilateral e espontânea. A secreção associada ao câncer geralmente é transparente, podendo ser rosada ou avermelhada devido à presença de glóbulos vermelhos. Podem também surgir linfonodos palpáveis na axila. Esses sinais e sintomas devem sempre ser investigados, porém podem estar relacionados a doenças benignas da mama (BRASIL, 2025).

A identificação e o diagnóstico do câncer de mama envolvem principalmente exames físicos clínicos, exames de imagem e exames patológicos. A investigação do câncer de mama inicia com o exame físico, que consiste na palpação para detectar nódulos, detecção de alterações na pele (retrações, edema) ou secreção mamilar, e é confirmado por meio de exames de imagem e histopatológicos. Dos exames de imagem, a mamografia é o padrão-ouro para rastreamento em mulheres acima de 40 anos (Bushan et al., 2021).

A mamografia é uma radiografia da mama que pode revelar anormalidades benignas ou malignas. É obtida pela aplicação de uma pequena dose de radiação através da mama após compressão entre duas placas, produzindo uma imagem radiográfica. As mamografias podem ser utilizadas tanto para rastreamento quanto para diagnóstico. O rastreamento mamográfico é realizado como uma tentativa de detectar quaisquer sinais precoces de câncer de mama, mesmo antes do

aparecimento dos sintomas, reduzindo a mortalidade por meio do diagnóstico precoce (Bushan et al., 2021).

Para a confirmação diagnóstica, uma biópsia deve ser o exame de preferência. A biópsia deve ser encaminhada para exame anatomopatológico e é imprescindível realizar um estudo de imuno-histoquímica para avaliação de RE, RP, HER2 e Ki67. Estes resultados são essenciais para avaliação prognóstica e definição terapêutica (SBOC, 2021).

A doença é estadiada utilizando o sistema TNM (do inglês: *tumor, nodes, metastases* - tumor, linfonodos, metástases) para descrever a extensão anatômica da doença. O parâmetro T varia de Tis (carcinoma *in situ*) a T4 (tumor com invasão da parede torácica ou pele), enquanto N categoriza desde N0 (sem linfonodos afetados) até N3 (metástase em linfonodos distantes ou supraclaviculares). Já M define M0 (ausência de metástases) ou M1 (metástases em órgãos distantes, como ossos ou pulmões) (MEDSCAPE, 2025).

Adicionalmente, a 8ª edição do AJCC Cancer Staging Manual incorpora ainda outros fatores prognósticos cruciais: o status dos receptores de estrogênio e progesterona, a superexpressão da proteína HER2 e o grau histológico (G) do tumor. O grau histológico descreve a aparência e o arranjo das células tumorais ao microscópio, e utiliza-se o score de Nottingham para avaliar três características: o pleomorfismo nuclear, a taxa mitótica e a formação de túbulos. O grau histológico é classificado em uma escala de 1 a 3. O grau 1 (baixo grau) indica que as células cancerosas se parecem mais com células normais e geralmente crescem lentamente; o grau 3 (grau alto) indica que as células cancerosas parecem muito diferentes do normal e tendem a crescer mais rapidamente (Healy, 2024; SBOC, 2021).

A classificação TNM combinada com a classificação imuno-histoquímica e o grau histológico determina o estágio final (de 0 a IV), guiando as opções terapêuticas e o prognóstico. O estágio 0 é um carcinoma ductal *in situ* não invasivo. O câncer invasivo precoce descreve os estágios I, IIa e IIb, e o câncer localmente avançado descreve os estágios IIIa, IIIb e IIIc. Todos esses estágios do câncer de mama não são metastáticos. O estágio IV é o câncer de mama metastático (Trayes; Cokenakes, 2021).

Os cânceres de mama em estágio I, definidos anatomicamente como um tumor de mama menor que 2 cm e sem envolvimento de linfonodos, apresentam sobrevida específica para câncer de mama em 5 anos de pelo menos 99%, 94% e 85% para os

subtipos positivos para receptores hormonais (RH+), superexpressão-HER2+ e triplo-negativo, respectivamente. Os cânceres de mama em estágio IV apresentam sobrevida global mediana de aproximadamente 5 anos para os subtipos RH+ ou HER2+ e 1 ano para os triplo-negativos (Waks; Winer, 2019).

O estadiamento sistêmico acurado é essencial para definir extensão da doença, prognóstico e tratamento personalizado.

2.2 Tratamentos para o câncer de mama

As modalidades de tratamento do câncer de mama podem ser divididas em tratamento local, que consiste em cirurgia e radioterapia, e o tratamento sistêmico, que consiste em quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. A terapia sistêmica pode ser pré-operatória (neoadjuvante), pós-operatória (adjuvante) ou ambas (National Cancer Institute, 2025; Wang; Wu, 2023; Warks; Winer, 2019).

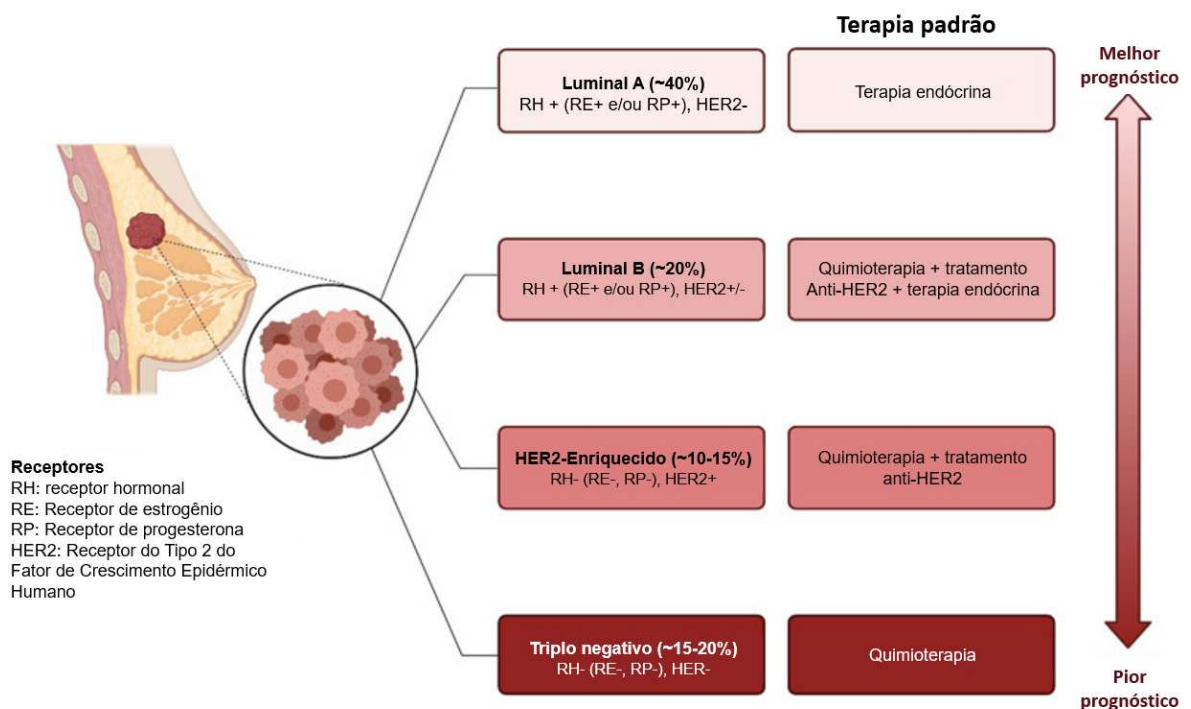
Para o câncer de mama não metastático, os principais objetivos da terapia são a erradicação do tumor da mama e dos linfonodos regionais e a prevenção da recorrência metastática. A terapia local para o câncer de mama não metastático consiste na ressecção cirúrgica ou remoção dos linfonodos axilares, considerando a possibilidade de radiação pós-operatória. Nestes casos, a terapia sistêmica pré-operatória baseada em quimioterapia pode reduzir o volume tumoral da mama, possibilitando a conservação da mama e diminuindo a necessidade de dissecação dos linfonodos axilares (Warks; Winer, 2019; Wang; Wu, 2023).

Para o câncer de mama metastático, o principal objetivo terapêutico é prolongar a sobrevida e, adicionalmente, aliviar os sintomas. Os tratamentos sistêmicos baseados em quimioterapia continuam sendo a opção preferencial, e a cirurgia é utilizada apenas como terapia paliativa em pacientes selecionados. No entanto, os benefícios de sobrevida das estratégias de tratamento tradicionais são limitados (Wang; Wu, 2023; Warks; Winer, 2019).

O subtipo de câncer de mama orienta a terapia sistêmica padrão administrada. Para todos os tumores positivos para receptores hormonais, a terapia endócrina (TE) é a principal linha de tratamento (com alguns pacientes também necessitando de quimioterapia). Nos tumores que superexpressam a proteína HER2, a abordagem

padrão combina quimioterapia com anticorpos direcionados a este receptor (com terapia endócrina administrada adicionalmente, se houver positividade simultânea para receptores hormonais). Já para o câncer de mama triplo-negativo, a quimioterapia convencional permanece como a principal opção de tratamento. Dessa forma, o tratamento é personalizado conforme as características do tumor, conforme demonstrado na figura 1 (INCA, 2022; Warks; Winer, 2019).

Figura 1 – Subtipos de câncer de mama: prognóstico e tratamentos padrão.



Legenda: Classificação molecular e abordagens terapêuticas padrão no câncer de mama. A figura descreve os principais subtipos tumorais (Luminal A, Luminal B, HER2-positivo e Triplo Negativo), suas características imuno-histoquímicas (receptores hormonais e HER2) e os tratamentos recomendados para cada categoria.

Fonte: Adaptado de Cilibrasi et al., 2021.

A terapia endócrina, adjuvante ou paliativa, neutraliza o crescimento tumoral promovido por estrogênio. Ela deve ser oferecida às pacientes com qualquer grau de positividade no resultado do exame de imuno-histoquímica para receptores hormonais (RE e RP), exceto nos casos de contraindicação absoluta (BRASIL, 2024).

Aproximadamente 70% de todos os cânceres de mama apresentam expressão de RE e/ou RP e, portanto, são potencialmente sensíveis a agentes que têm como alvo a via de sinalização do estrogênio. A sensibilidade à terapia endócrina está

diretamente associada à expressão dos receptores hormonais (INCA, 2022; Patel et al., 2023; Wang; Wu, 2023; Warks; Winer, 2019).

O arsenal tradicional de tratamento endócrino consiste em moduladores seletivos do receptor de estrogênio, inibidores da aromatase, e o fulvestranto – antagonista do receptor de estrogênio que promove sua degradação (Gheysen et al., 2024).

Dentre as terapias endócrinas utilizadas mais comumente, o tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio que inibe competitivamente a ligação do estrogênio ao seu receptor, e é eficaz em mulheres na pré e pós-menopausa. Em pacientes na pré-menopausa, o tamoxifeno 20 mg por dia durante 5 anos pode reduzir o risco de recorrência em cerca de 50% nos primeiros 4 anos. Uma duração mais longa do tratamento com tamoxifeno resulta em uma redução ainda maior da recorrência e da mortalidade por câncer de mama (Wang; Wu, 2023).

Já os inibidores da aromatase (anastrozol, exemestano e letrozol) diminuem os níveis circulantes de estrogênio ao inibir a conversão de androgênios em estrogênio, e são eficazes apenas em mulheres na pós-menopausa ou em pacientes submetidas à supressão ovariana, usualmente alcançada com o uso de análogos de hormônio liberador de gonadotrofina (Ciringione; Rizzi, 2025; Warks; Winer, 2019).

Dentre os tumores tratados com terapia endócrina, estima-se que 40% desenvolvem resistência ao tratamento ao longo do tempo, levando à recidiva e mortalidade potencial. Alguns pacientes apresentam resistência intrínseca primária, definida como progressão da doença em até 6 meses após o início da TE para câncer de mama metastático ou recidiva em até 2 anos após o início da TE adjuvante para câncer de mama inicial. A resistência endócrina secundária, definida como progressão ≥ 6 meses após o início da TE para câncer de mama metastático, acaba se desenvolvendo na maioria das pacientes (Warks; Winer, 2019; Patel et al., 2023; Ciringione; Rizzi, 2025).

As abordagens terapêuticas atuais para o câncer de mama HER2-positivo envolvem predominantemente o uso de fármacos direcionados, como anticorpos anti-HER2, inibidores da tirosina quinase e conjugados anticorpo-fármaco (Li et al., 2025).

Atualmente, trastuzumabe e pertuzumabe são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento do câncer de mama HER2+. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal que age ligando ao domínio extracelular IV do HER2, inibe o complexo de sinalização HER2/HER3/PI3K

independente de ligante, aumenta a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e, em última instância, leva à morte das células cancerosas (INPI, 2024).

A eficácia do trastuzumabe foi evidenciada em vários ensaios clínicos, e este fármaco foi incorporado em protocolos clínicos para o tratamento de câncer de mama com superexpressão de HER2. Entretanto, a resistência ao trastuzumabe é relativamente comum e, diante disso, o desenvolvimento de novas moléculas com mecanismos de ação complementares e/ou sinérgicos se faz necessário. Nesse contexto, foi desenvolvido um anticorpo monoclonal de segunda geração, o pertuzumabe, que tem um mecanismo de ação diferente do trastuzumabe, tendo sido desenhado especificamente para evitar a formação de heterodímeros HER2-HER3 na superfície das células. O anticorpo funciona, portanto, de forma complementar ao trastuzumabe, uma vez que os dois agentes têm como alvo regiões diferentes do receptor HER2 (INPI, 2024).

Um exemplo de sucesso de anticorpos conjugados a outros fármacos (também conhecidos como ADC, do inglês *Antibody-Drug Conjugate*), é o trastuzumabe-entansina, que consiste em um anticorpo monoclonal que se liga ao receptor HER2 acoplado a uma fármaco inibidor da polimerização de tubulina, denominada entansina (DM1) (INPI, 2024).

Devido à influência do tratamento na expressão de HER2 das células tumorais, os tratamentos com quimioterapia e terapia anti-HER2 podem ter a sensibilidade diminuída. Isto ficou evidenciado em um estudo anterior que constatou que 21,4% das pacientes transitaram de um status HER2-positivo para HER2-negativo após terapia neoadjuvante. Essa transição é atribuída à terapia direcionada, que pode eliminar seletivamente as células tumorais com superexpressão de HER2, preservando as células tumorais HER2-negativas, o que pode contribuir para o risco de recorrência e metástase do câncer (Li et al., 2025).

Um mecanismo crítico de resistência no câncer de mama com superexpressão de HER2 envolve a ativação aberrante da via PI3K/Akt/mTOR, aumentando a proliferação e a sobrevivência das células tumorais. Assim, a utilização de fármacos que têm como alvo elementos desta via de sinalização poderia potencialmente interromper a transdução de sinal de múltiplas fontes, mitigando a resistência a fármacos em terapias direcionadas a HER2. Conseqüentemente, pequenas moléculas que têm como alvo essas vias se mostraram promissoras na diminuição da resistência (Li et al., 2025).

Um exemplo de inibidores da via PI3K/Akt/mTOR são os inibidores de quinase lapatinibe e neratinibe, que possuem registro na ANVISA e é aprovado para o tratamento de câncer de mama metastático HER2-positivo. Mas embora ofereçam terapia personalizada e sejam menos invasivas do que outras terapias, sua eficácia pode ser limitada, podem apresentar reações adversas indesejados e podem ter preços elevados. Portanto, são necessários mais estudos para criar pequenas moléculas inibidoras de quinase que sejam mais práticas e de menor custo para uso terapêutico (Bansal; Pandey; Ruwali, 2023).

O câncer de mama triplo-negativo é um subtipo agressivo de câncer de mama com prognóstico desfavorável e opções de tratamento limitadas. É caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio e progesterona, e não apresenta amplificação do receptor 2 do HER2. Portanto, as terapias endócrinas tradicionais são ineficazes, e a quimioterapia era a única opção sistêmica disponível para esse subtipo da doença até o advento da imunoterapia. O tratamento comumente consiste em poliquimioterapia, visando anular os efeitos de um mecanismo de resistência específico a determinado agente (Dvir; Giordano; Leone, 2024; King et al., 2017).

A poliquimioterapia compreende diversas famílias de fármacos citotóxicos, incluindo agentes alquilantes, antraciclinas e inibidores da tubulina. A ciclofosfamida é um agente alquilante da classe das mostardas nitrogenadas que reagem com grupos nucleofílicos do DNA (nitrogênios das bases do DNA) por meio de ligações covalentes, e dessa forma interrompem a replicação ou a transcrição do mRNA para a síntese de proteínas, prejudicando a função celular, o crescimento celular e a sobrevivência (BRASIL, 2024; Herrmann et al., 2023).

As antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, epirrubicina e idarrubicina) são antibióticos tetracíclicos. O mecanismo de ação é a intercalação no DNA, preenchendo assim a lacuna entre o DNA e a enzima topoisomerase II (TopII), formando eficazmente o complexo fármaco-TopII-DNA e provocando, assim, os efeitos inibitórios no processo de replicação e transcrição do DNA. Já os taxanos, como o docetaxel e paclitaxel, agem inibindo a mitose: eles se ligam à subunidade beta da tubulina, acelerando o processo de polimerização e estabilizando fortemente a ligação após a formação dos microtúbulos. Como o processo natural de divisão celular envolve a polimerização e, em seguida, a despolimerização da tubulina, os taxanos promovem um ciclo celular defeituoso e a morte celular espontânea, por apoptose (Bignold, 2020; BRASIL, 2024; Burguin et al., 2021).

Regimes à base de taxanos são utilizados para tratar doenças de menor risco, e as antraciclina são incluídas em regimes que visam cânceres triplo-negativos com envolvimento de linfonodos. A aplicação de antraciclina permanece controversa, mas parece ser essencial em pacientes de alto risco, como os subtipos triplo-negativo e HER-2 positivo (Wang, 2023).

O uso da quimioterapia apresenta diversas desvantagens, como falta de seletividade, toxicidade excessiva para os órgãos, baixa especificidade e resistência intrínseca ou adquirida à quimioterapia. A maioria dos agentes quimioterápicos é citotóxica por natureza e afeta a vida dos pacientes por um longo período após o tratamento, reduzindo significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Bansal; Malhotra, 2021).

Cada uma das moléculas das classes dos taxanos, das antraciclina e a ciclofosfamida pode perder eficácia devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência. A resistência adquirida aos fármacos pode desenvolver-se durante o tratamento de tumores inicialmente sensíveis e pode ser causada por mutações que surgem durante o tratamento, bem como por diversas outras respostas adaptativas, como o aumento da expressão do alvo terapêutico e a ativação de vias alternativas de sinalização compensatória (Holohan et al., 2013).

Um exemplo de mecanismo de resistência é a superexpressão da glicoproteína-p (P-gp), uma proteína transportadora pertencente à família ABC (*ATP-Binding Cassette*), que confere resistência à antraciclina e aos taxanos. Alterações nos microtúbulos também podem levar à resistência aos taxanos. A superexpressão da β -tubulina III induz resistência ao paclitaxel. Além disso, mutações nas proteínas associadas aos microtúbulos afetam a dinâmica dos microtúbulos e melhoram a resistência aos taxanos. Sabe-se que múltiplas enzimas estão envolvidas na metabolização da ciclofosfamida, levando à sua resistência. Por exemplo, mutações nas glutatona S-transferases, enzimas envolvidas em reações de conjugação que metabolizam fármacos, podem afetar a metabolização da ciclofosfamida (Burguin et al., 2021).

Uma das principais desvantagens da quimioterapia são suas reações adversas. Os eventos iniciais (0 a 6 meses de tratamento) incluem fadiga, alopecia, citopenia (redução do número de células sanguíneas), dor muscular, disfunção neurocognitiva e neuropatia periférica. Os eventos crônicos ou tardios (após 6 meses de tratamento)

incluem cardiomiopatia, cânceres secundários, menopausa precoce, esterilidade e impactos psicossociais (Burguin et al., 2021).

A cardiomiopatia é a principal reação adversa da doxorubicina, e com frequência é irreversível. Esta miocardiopatia pode apresentar-se de forma aguda, por meio de alterações eletrocardiográficas anormais e/ou aumento da troponina T plasmática e, geralmente, associada ao derrame pericárdico (Sheibani et al., 2022).

Além dos agentes citotóxicos citados, existem também outras alternativas terapêuticas disponíveis na clínica para o câncer de mama triplo negativo. Novas terapias incluem os inibidores da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) e inibidores de checkpoint PD-1 (Riaz et al., 2025).

Inibidores de PARP (como o olaparibe) demonstraram eficácia substancial no tratamento de TNBC associado a uma mutação em BRCA1 ou BRCA2. BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor que codificam proteínas essenciais para o reparo de quebras de fita dupla de DNA por recombinação homóloga. Quando esses genes sofrem mutação, a via de recombinação homóloga fica comprometida, tornando as células dependentes de mecanismos alternativos de reparo. Alternativamente, quebras na fita de DNA podem ser reparadas por outra maquinaria, envolvendo a enzima PARP. A inibição de PARP leva ao acúmulo de quebras de fita dupla. Em células com BRCA1/2 funcional, essas quebras podem ser reparadas pela via de recombinação homóloga. No entanto, em células deficientes em BRCA1/2, a via de recombinação homóloga torna-se não funcional, levando ao acúmulo de danos irreparáveis, instabilidade genômica e, por fim, morte celular (Park et al., 2024; Riaz et al., 2025).

O receptor de morte celular programada 1 (PD-1) é expresso na superfície de células efectoras do sistema imunológico. Ele é ativado principalmente pelo ligante PD-L1, que pode ser expresso por todas as células humanas. A via PD-1/PD-L1 desempenha um papel sutil na manutenção da tolerância periférica dos linfócitos T. No câncer, a expressão de PD-L1 parece ser um dos principais mecanismos de escape imunológico. Exemplos de fármacos com este mecanismo de ação são os anticorpos monoclonais nivolumabe e pembrolizumabe (Riaz et al., 2025; Schütz et al., 2017).

Apesar desses grandes avanços, o tratamento bem-sucedido do câncer de mama triplo negativo ainda é uma necessidade não atendida. Atualmente, apenas cerca de 40% das pacientes com TNBC são elegíveis para tratamento com inibidores

de checkpoint imunológico. Além disso, os benefícios associados à imunoterapia são menos pronunciados no TNBC em comparação a muitos outros tumores sólidos, e a maioria das pacientes que recebem esse tratamento desenvolve resistência adaptativa. A terapia com inibidores de PARP é limitada a pacientes com mutações germinativas BRCA1/2, que representam 10–30% de todos os casos de TNBC. No entanto, aproximadamente 50% das portadoras de mutações germinativas BRCA1/2 não respondem aos inibidores de PARP em contextos neoadjuvantes, e a duração mediana da resposta é de apenas 6 meses em doença avançada (Mehlich; Marusiak, 2022; Riaz et al., 2025).

Os mecanismos de resistência de inibidores de PD-1/PD-L1 primária incluem a falta de imunogenicidade tumoral; rejeição por células T; falta de resposta ao interferon; mutações no EGFR, fatores imunossupressores locais no microambiente tumoral, como a célula supressora derivada de mieloides (CSDM). Já os mecanismos de resistência adquirida podem estar relacionados aos seguintes fatores: exaustão e perda da função das células T; processamento ou apresentação prejudicados de neoantígenos; complexidade do microambiente tumoral (Tang et al., 2022).

A pesquisa de novos fármacos para o tratamento do câncer de mama é, portanto, essencial devido à heterogeneidade da doença e às limitações das terapias convencionais. Subtipos agressivos, como o câncer de mama triplo-negativo, ainda apresentam prognóstico desfavorável e opções terapêuticas restritas, destacando a necessidade de abordagens inovadoras.

2.2 Modulação do microambiente tumoral

Um importante fator que desempenha um papel fundamental na progressão do câncer, tornando-o um alvo promissor para novas abordagens terapêuticas, é o chamado microambiente tumoral (MAT). O MAT se refere ao ambiente celular e molecular associado à célula tumoral. O MAT é composto de células imunes, células estromais, matriz extracelular e moléculas de sinalização secretadas por esses diferentes tipos de células. A comunicação entre células cancerosas e outros tipos de células ajusta funcionalmente o microambiente, impactando a progressão do tumor de mama e a eficácia terapêutica (Quail; Joyce, 2013).

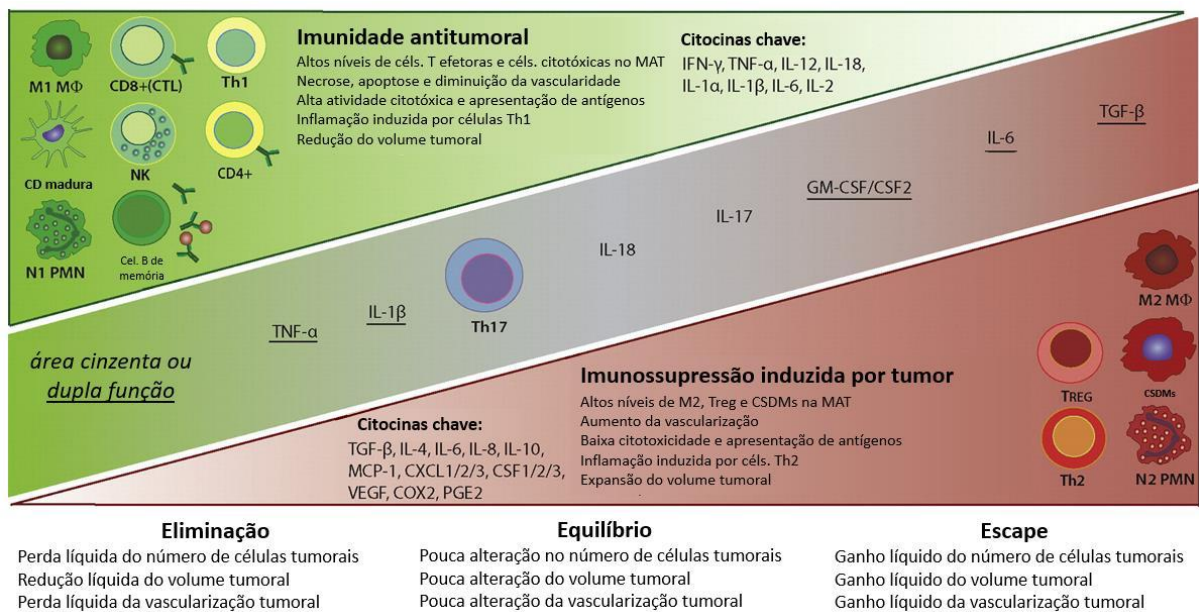
As células do sistema imune são importantes atores no MAT. O desenvolvimento do câncer é normalmente reprimido pelo sistema imunológico, um

processo denominado “imunovigilância”. No entanto, para que ocorra a progressão tumoral, as células cancerosas desenvolvem estratégias sofisticadas para escapar dessa vigilância imunológica - conceito conhecido como “imunoedição” do câncer. Aqui, postula-se que o sistema imunológico exerce ações paradoxais, tanto de proteção do hospedeiro, quanto de estimulação do crescimento do tumor (Silva, E. et al., 2021; Tower; Ruppert; Britt, 2019).

Na imunoedição, as células malignas e imunes interagem entre si em três etapas distintas: eliminação, equilíbrio e escape, conforme representado na figura 2. A eliminação (imunovigilância) é a primeira etapa, onde o sistema imunológico identifica e destrói células tumorais nascentes. Esta etapa envolve células imunes inatas, como macrófagos e células natural killer (NK), bem como células da imunidade adquirida, em particular linfócitos T, mas provavelmente também células B (que produzem anticorpos) (Kroemer et al., 2023).

Em seguida, na fase de equilíbrio, as células cancerosas e imunes atingem um equilíbrio: o sistema imunológico consegue controlar, mas não eliminar completamente as células cancerosas, que então podem proliferar localmente e sofrer mutações. Variantes de células tumorais que adquiriram resistência à eliminação entram então na fase de escape, a etapa final do processo, marcada pela formação de um MAT imunossupressor, permitindo o crescimento descontrolado do tumor e sua detecção clínica. Essa evolução reflete a capacidade adaptativa do tumor em contornar as defesas imunológicas (Salemme et al., 2021).

Figura 2 – Papel das diferentes células e citocinas na imunoedição e na progressão tumoral



Legenda: Mecanismos da resposta imune no microambiente tumoral (MAT). A figura ilustra os processos de eliminação, equilíbrio e escape tumoral, destacando os principais tipos celulares (como células T efetoras, macrófagos M1/M2, células dendríticas e neutrófilos N1/N2) e citocinas envolvidas em cada fase. Também são apresentados os efeitos associados à regressão (necrose, apoptose, redução de vascularização) ou progressão do tumor (angiogênese, supressão imune). As citocinas são classificadas de acordo com seu papel pró-inflamatório (IFN-γ, IL-12, TNF-α) ou imunossupressor (TGF-β, IL-10). Abreviaturas: MAT microambiente tumoral; CD:células dendríticas; CSDMs: células supressoras derivadas da linhagem mielóide; Tregs: células T regulatórias.

Fonte: Adaptado de Burkholder et al. (2014).

Com base na atividade das populações de células imunes inatas e adaptativas envolvidas no processo de imunoedição, podemos identificar duas subclasses principais de células imunes: as células imunossupressoras e as imunoestimulantes. As células consideradas como exercendo ação imunossupressora estão associadas a uma atividade pró-tumoral, enquanto que as estimulantes estão associadas a uma resposta antitumoral (Salemme et al., 2021).

As células tumorais comunicam-se com o microambiente tumoral através das citocinas, que são pequenas proteínas que irão atuar como mensageiro químico e desempenham um papel na comunicação entre as células por meio de sinalização endócrina, parácrina ou autócrina. As citocinas incluem quimiocinas, interleucinas (ILs), adipocinas, interferons (IFN), fatores estimulantes de colônias (CSFs) e fator de necrose tumoral (TNF). Elas são produzidas por células do sistema imune como os macrófagos, linfócitos e mastócitos, e também são secretadas por células endoteliais,

fibroblastos, e uma variedade de células estromais e algumas células cancerosas (Habanjar et al., 2023).

Dentre as células que fazem parte do microambiente tumoral que são influenciadas pelas citocinas, há os linfócitos T auxiliares (CD4+), que podem ser divididos em tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), tipo 17 (Th17) e reguladores (Treg). Os classificados como Th1 são induzidos por de IFN- γ e IL-12 e induzem a expansão clonal das células CD8+, que possuem efeito antitumoral eliminando as células cancerosas através da secreção de granzimas e perforinas, e, portanto, sua presença está associada a uma melhor progressão clínica. Os linfócitos T reguladores (Treg) tem ação pró-tumoral, uma vez que promove a imunossupressão pela secreção de citocinas imunossupressora, tais como IL-10 e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (Li; Tsang; Tse, 2021).

Outras importantes células imunes presentes no microambiente tumoral são os macrófagos associados ao tumor. Eles podem se diferenciar em dois diferentes fenótipos polarizados: M1 e M2. Os macrófagos M1 são induzidos pelas citocinas secretadas pelos linfócitos Th1 (IFN- γ e TNF) e produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS) e liberam citocinas pró-inflamatórias, portanto exercem efeitos antitumorais. Em contrapartida, os macrófagos do tipo M2 são induzidos pelas citocinas produzidas pelo linfócito Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) e tem como efeito a imunossupressão, indução da angiogênese e apoiam o crescimento tumoral e metástase, logo, tem efeito pró-tumoral (Qiu et al., 2018).

Os neutrófilos associados ao tumor (NAT), assim como os macrófagos, também exibem fenótipos polarizados. O NAT do tipo N1 é pró-inflamatório e antitumoral, e este fenótipo é induzido pela exposição a IFN- γ e IFN- β . O fenótipo N2, pró-tumoral e anti-inflamatório, é induzido pela exposição ao TGF- β , e em modelos animais com câncer de mama, ele pode recrutar células imunossupressoras no microambiente tumoral bem como reduzir a proliferação de CD8+ (Fridlender et al., 2009; Burugu et al., 2017).

As células supressoras derivadas da linhagem mieloides (CSDMs) são compostas por células mieloides imaturas heterogêneas e suprimem a resposta imune. São classificadas em CSDMs monocíticas e CSDMs granulocíticas. As CSDMs secretam citocinas imunossupressoras, incluindo IL-10 e TGF- β , que induzem células T reguladoras e influenciam a função das células NK (natural killer). Citocinas e quimiocinas promovem o acúmulo de CSDMs em locais tumorais no câncer de mama.

Essas citocinas incluem IL-6, IL-1 β , G-CSF, M-CSF, GM-CSF e TGF-1 β (Cha; Koo, 2020).

Além disso, o aumento de CSDMs reduz o número de células T CD4+ e CD8+ e modula ainda mais a expressão de citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10 no baço. Assim, a proliferação das células imunes localizadas no microambiente tumoral tem grande impacto na imunidade sistêmica (Shigehiro et al., 2022).

Outra importante célula que faz parte do estroma tumoral são os fibroblastos, mais especificamente os fibroblastos associados ao câncer (FAC). Quando comparado a fibroblastos normais, é possível observar que os associados ao tumor possuem uma taxa de proliferação consideravelmente maior. Essas células secretam fatores solúveis e enzimas que alteram a matriz, como o fator de crescimento endotelial vascular A, TGF- β , e metaloproteinases de matriz (MMP), promovendo assim a progressão do tumor e angiogênese, e favorecendo a metástase (Giorello et al., 2021).

O aumento da secreção de TGF- β pelos fibroblastos associados ao tumor faz com que o tumor apresente um aspecto fibroso, uma vez que esta citocina promove a produção de colágeno do tipo I. A fibrose associada ao câncer é um componente crítico do microambiente tumoral, que impacta significativamente no comportamento do câncer. No entanto, há uma controvérsia significativa quanto à fibrose como um fator predominantemente promotor ou supressor de tumores. O efeito da fibrose depende do contexto e, provavelmente, inibe e favorece o câncer sob certas condições (Chandler et al., 2019).

O microambiente tumoral afeta a eficácia da quimioterapia de várias maneiras, e, em contrapartida, os agentes quimioterápicos podem modificar os componentes do microambiente tumoral. Os danos causados às células pelos agentes quimioterápicos fazem com que haja liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que serão reconhecidos pelas células imunes e irão induzir uma morte celular imunogênica. Adicionalmente, alguns agentes como as antraciclinas podem suprimir linfócitos regulatórios (Treg) e assim induzir um perfil antitumoral. Outro exemplo de modificação do microambiente é o favorecimento do fenótipo M1 causado por paclitaxel e docetaxel (Li et al., 2021).

Portanto, o MAT é cada vez mais reconhecido como um alvo de tratamento, e a sua avaliação se tornou um componente crítico do tratamento do câncer de mama uma vez que o crescimento tumoral pode ser restringido por meio da modulação da

resposta imune. Bloquear citocinas promotoras de tumores ou ativar e amplificar citocinas inibidoras de tumores são consideradas terapias direcionadas ao câncer. Sendo assim, surge um crescente interesse na exploração de substâncias imunomoduladoras em tratamentos de câncer, com o objetivo de melhorar a reação imunológica contra tumores (Li et al., 2021; Habanjar et al., 2023).

2.3 Modelos pré-clínicos no câncer de mama

A pesquisa para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos começa com os primeiros grandes testes de triagem, nos quais é possível identificar substância ativa (*hit*). Após investigações mais aprofundadas, ocorre a seleção de uma molécula, o protótipo (*lead*), que é uma substância (ou série de substâncias) que satisfaz critérios mínimos predefinidos para viabilizar a futura otimização de estrutura e atividade. Alguns autores consideram que uma substância só poderia ser chamada de protótipo se ela demonstrar efeito em um modelo animal da doença alvo (Duelen et al., 2019; Noël, 2019).

A fase pré-clínica abrange diversos experimentos, incluindo avaliação *ex vivo* (com tecidos isolados), *in vitro* (em culturas celulares) e avaliações *in vivo* de novas terapias em modelos animais. Simulações *ex vivo* ou *in vitro* são benéficas porque permitem aprimoramentos na pesquisa científica. No entanto, é importante reconhecer que os resultados obtidos nesses sistemas simplificados não refletem a complexidade de um organismo vivo, destacando a necessidade complementar de estudos em modelos animais para uma avaliação mais abrangente e translacional (Moctezuma-Ramirez et al., 2023).

Dos modelos *in vitro* bidimensionais disponíveis, as linhagens de células cancerosas podem fornecer uma fonte ilimitada de material biológico de baixo custo e fácil manuseio. Por esse motivo, são os primeiros componentes-chave dos estudos básicos de pesquisa sobre câncer e dos processos de descoberta de fármacos (Ciringione; Rizzi, 2025).

Os modelos de câncer de mama podem utilizar diversas linhagens tumorais, como 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231. A linhagem de células de carcinoma mamário 4T1 é uma linhagem celular tumoral transplantável, derivada do tecido da glândula mamária de camundongos BALB/c. O carcinoma mamário originado das células 4T1 são utilizados para investigar o câncer de mama triplo negativo, que não apresentam

expressão proteica do receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (Pulaski et al., 2000; Schrörs et al., 2020; Witt; Tollefsbol, 2023).

Já a linhagem MCF-7 é uma linhagem derivada do derrame pleural de uma paciente caucasiana de 69 anos com câncer de mama metastático, e esta linhagem expressa receptores de estrogênio, progesterona e glicocorticoides. A linhagem MCF-7 é um carcinoma ductal invasivo classificado como subtipo luminal A, por possuir expressão do receptor de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), tornando-o um modelo ideal para estudar a resposta hormonal. Esta linhagem não possui superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) (Camarillo et al., 2014).

A linhagem celular MDA-MB-231 foi isolada de um derrame pleural de um paciente com carcinoma ductal invasivo e é comumente usada para modelar câncer de mama em estágio avançado. Esta linhagem celular é negativa para receptores de estrogênio, progesterona, E-caderina, e expressa p53 mutado. A linhagem MDA-MB-231 é uma linhagem de células adenocarcinoma que foi classificada como câncer de mama triplo-negativo (Welsh, 2013).

É importante ressaltar que o desenvolvimento de modelos pré-clínicos relevantes deve considerar que as células tumorais estão inseridas em um microambiente tumoral composto por componentes estromais, vasos sanguíneos, fibroblastos e células do sistema imunológico. De fato, a interação entre o microambiente tumoral e as células tumorais abre um leque de novas perspectivas terapêuticas, que visam a modulação desta interação (Li et al., 2021).

As principais deficiências em modelos bidimensionais de células cancerosas incluem a falta de heterogeneidade celular e o microambiente tumoral, que influenciam significativamente no desenvolvimento do câncer e na resistência ao tratamento. Modelos mais avançados que refletem adequadamente a heterogeneidade e a complexidade da doença humana são mais relevantes para o desenvolvimento de tratamento (Denayer et al., 2014).

Embora persistam preocupações éticas óbvias, os modelos animais frequentemente representam o padrão ouro para a compreensão do desenvolvimento de doenças e da resposta ao tratamento. Atualmente, o desenvolvimento de fármacos anticâncer requer avaliação em modelos animais para garantir eficácia e segurança antes de passar para ensaios em humanos, como uma compreensão da

farmacocinética/farmacodinâmica das novas substâncias antitumorais (Boix-montesinos et al., 2021).

Alguns dos modelos murinos mais utilizados são gerados pelo enxerto de linhagens celulares cultivados em camundongos imunodeficientes (xenoenxertos). No entanto, estudos imunológicos ainda não são viáveis nesses modelos, o que é uma desvantagem uma vez que muitos fármacos têm como alvo células tumorais e imunológicas, ou alteram o cenário imunológico. Como alternativa, se utiliza o chamado modelo singênico. Modelos murinos singênicos são tumores derivados de células cancerosas murinas enxertadas em linhagens de camundongos geneticamente idênticas. São ferramentas amplamente utilizadas para estudar a imunidade tumoral e a resposta imunoterápica no contexto de um sistema imunológico murino totalmente funcional. Modelos de camundongos singênicos nos quais células cancerosas murinas, como 4T1, são injetadas em camundongos imunocompetentes (por exemplo, BALB/c) mostram metástase mais eficaz, com características semelhantes às de pacientes com câncer de mama (Park et al., 2018; Zeng et al., 2022).

O modelo de câncer de mama induzido por células 4T1 em camundongos isogênicos (inbred) BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade é bem consolidado na pesquisa de novas terapias para este tipo de câncer. Para indução do câncer de mama, é realizado um implante ortotópico, que é uma técnica de transplante de células tumorais diretamente no local anatômico de origem do tumor, que no caso corresponde à glândula mamária dos animais (Pulaski, 2001; Zhang et al., 2018).

Quando injetada em camundongos BALB/c, as células 4T1 produzem tumores primário *in situ* e são altamente invasivas, podendo induzir metástase para vários órgãos como o pulmão, fígado, gânglios linfáticos, ossos e cérebro sem que seja necessário a remoção do tumor primário. Esta linhagem celular mimetiza o câncer de mama humano em estágio IV e pode ser usada para explorar o potencial terapêutico de novas terapias antiangiogênicas e múltiplos tratamentos quimioterápicos. Assim como ocorre em humanos, a disseminação progressiva das metástases 4T1 ocorre por meios dos gânglios linfáticos de drenagem para outros órgãos. Logo, esses tumores podem ser usados como modelos pós-operatórios e modelos não cirúrgicos (Pulaski, 2001).

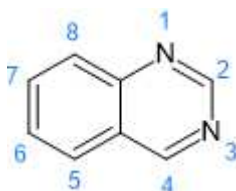
Esses modelos de câncer de mama com metástase espontânea que se assemelham a pacientes com câncer de mama real são úteis para o desenvolvimento

e avaliação de novas terapias, como avaliar a eficácia da quimioterapia contra metástase espontânea da mama em um hospedeiro imunocompetente (Kaur et al., 2025).

2.4 Derivados de quinazolininas

Quinazolina é uma classe química formada pela fusão de dois anéis aromáticos simples hexagonais: um anel de benzeno com um anel de pirimidina. O anel pirimidina contém dois átomos de nitrogênio que substituem o carbono nas posições 1 e 3, demonstrados na figura 3. Heterocíclicos nitrogenados são as estruturas químicas mais abundantes que ocorrem em fármacos sintéticos, produtos naturais bioativos e agroquímicos (Amin et al., 2022; Hashen 2020).

Figura 3 – Estrutura química da quinazolina.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2026).

As quinazolininas têm atraído atenção significativa devido à facilidade de modificação química desse anel. Uma diversidade de atividades biológicas já foi explorada e essas substâncias demonstraram atividade antimicrobiana, antimalárica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, anticonvulsivante, antidiabética, antitumoral, inibição da colinesterase, inibição da diidrofolato redutase e atividade inibitória de quinases (Bansal; Malhotra, 2021; Khan et al., 2015; Moradi et al., 2023).

Várias quinazolininas, incluindo afatinibe, erlotinibe, gefitinibe e lapatinibe foram aprovados pela ANVISA para terapia do câncer na clínica devido à sua eficácia terapêutica contra cânceres humanos (BRASIL, 2025; Hekal; El-Azm, 2018).

As quinazolininas exercem sua atividade quimioterápica por várias interações intermoleculares. A maioria demonstra atividade inibidora de tirosinas quinases. Outros mecanismos menos comuns incluem: inibição das enzimas timidilato sintase, poli ADP-ribose polimerase-1 (PARP) e topoisomerase (Bansal; Malhotra, 2021; Kumar et al., 2017; Zayed, 2023).

As proteínas quinases são os pilares da sinalização celular. Elas constituem uma vasta família de enzimas especializadas em uma tarefa crucial: a fosforilação de proteínas. A fosforilação, que é a adição de um grupo fosfato a uma proteína, serve como um interruptor molecular que pode ligar ou desligar proteínas. As proteínas quinases catalisam esse processo transferindo grupos fosfato do trifosfato de adenosina (ATP) para aminoácidos específicos nas proteínas-alvo. Dependendo da cadeia lateral do aminoácido a ser fosforilado, existem três tipos principais de proteínas quinases: i) tirosina quinases – que realizam a fosforilação do grupo hidroxila fenólico; ii) serina-treonina quinases – que induzem a fosforilação do grupo hidroxila presente nesses dois aminoácidos; e iii) histidina quinases – que fosforilam o nitrogênio dos resíduos de histidina (Bansal; Malhotra, 2021; Roland; Akinseye, 2024).

As proteínas quinases podem funcionar como receptores de superfície celular ou como efetores internos da sinalização e, assim, podem controlar múltiplos aspectos do crescimento, diferenciação e função celular no organismo. O genoma humano codifica mais de 500 proteínas quinases conhecidas, e a maioria das quinases proteicas promove a proliferação, sobrevivência e migração celular (Zhou et al., 2023).

Quando estão constitutivamente superexpressas ou ativas devido a mutações, elas estão associadas à oncogênese por levar à sinalização prejudicada e a proliferação e diferenciação celular descontroladas. Portanto, a inibição das proteínas quinases pode ser considerada um importante alvo terapêutico na descoberta de fármacos contra o câncer (Bansal; Malhotra, 2021; Bhullar et al., 2018).

As tirosina-quinases (TK) representam uma parte essencial de todas as oncoproteínas e, portanto, constituem um alvo terapêutico promissor. As tirosina-quinases transmembrana ligadas a receptores (RTK) e as tirosina-quinases não receptoras são as duas formas da enzima associadas a vários tipos de câncer. As TKs receptoras, quando ativadas, podem ativar várias vias de sinalização celular, tais como as vias STAT3, MAPK, PI3K e AKT. Por outro lado, as tirosina-quinases não receptoras são enzimas citosólicas, por exemplo: Src, Abl e Lck, que também desempenham vários papéis na regulação do crescimento celular, proliferação, diferenciação, adesão, migração e apoptose (Bansal; Malhotra, 2021; Lemmon; Schlessinger, 2010).

Ao examinar a estrutura das substâncias que foram desenvolvidos para a inibição da tirosina quinase até o momento, as substâncias contendo anéis de piridina/pirimidina e seus análogos condensados de benzeno, quinolina/quinazolina,

são proeminentes. Esse grupo atua como o grupo farmacofórico da molécula, isto é, a estrutura molecular essencial à atividade de uma substância perante o alvo molecular (Evren et al., 2025; Ferreira et al., 2022).

As tirosina-quinases apresentam um núcleo catalítico conservado denominado domínio quinase, necessário para a atividade catalítica. Este núcleo contém uma cavidade de ligação ao ATP. Por esta razão que praticamente todos os fármacos inibidores de quinases aprovados recentemente contêm núcleos heterocíclicos, que servem como arcabouços (scaffolds) para garantir a ligação dos fármacos na região do ATP. Como resultado, estas moléculas impedem a fosforilação da quinase e a subsequente ativação das vias de transdução de sinal a jusante, o que finalmente leva a um aumento da apoptose e a uma diminuição da proliferação celular (García-Aranda; Redondo, 2017).

A maioria das pesquisas até o momento explorou o efeito citotóxico e/ou antitumoral de derivados de quinazolina substituídos nas posições 4, 6 e 7. Esses derivados têm como alvo principal os RTKs, que incluem o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e os receptores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR). Sabe-se que RTKs são superexpressos em diversas doenças malignas, como câncer de pulmão de células não pequenas, renal, de cólon, de próstata, de estômago, de mama e de ovário (Bansal; Malhotra, 2021).

O grupo farmacofórico quinazolina ainda apresenta grande potencial a ser explorado. Modificações estruturais adicionais no núcleo das quinazolininas podem levar ao desenvolvimento de novos derivados com atividade terapêutica superior aos fármacos atualmente disponíveis. Um exemplo disso, é a investigação do efeito antitumoral de derivados de quinazolininas substituídos na posição 2, que ainda foi pouco explorado na pesquisa anticâncer (Bathula et al., 2020; Eldehna et al., 2024).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e o potencial efeito imunomodulador de derivados de quinazolina substituído na posição 2 em modelos experimentais de câncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica de nove novos derivados de quinazolinas substituídos na posição 2 (KDYs) em linhagens celulares de câncer de mama.
- Estabelecer modelo murino de adenocarcinoma mamário por meio da inoculação ortotópica de células 4T1.
- Investigar a eficácia antitumoral dos derivados que demonstraram atividade *in vitro*, por meio do monitoramento da progressão tumoral e as condições clínicas dos animais ao longo do experimento.
- Avaliar os efeitos imunomoduladores dos tratamentos, por meios da quantificação de citocinas no tumor.
- Analisar os parâmetros obtidos, correlacionando os achados morfológicos, bioquímicos e moleculares.

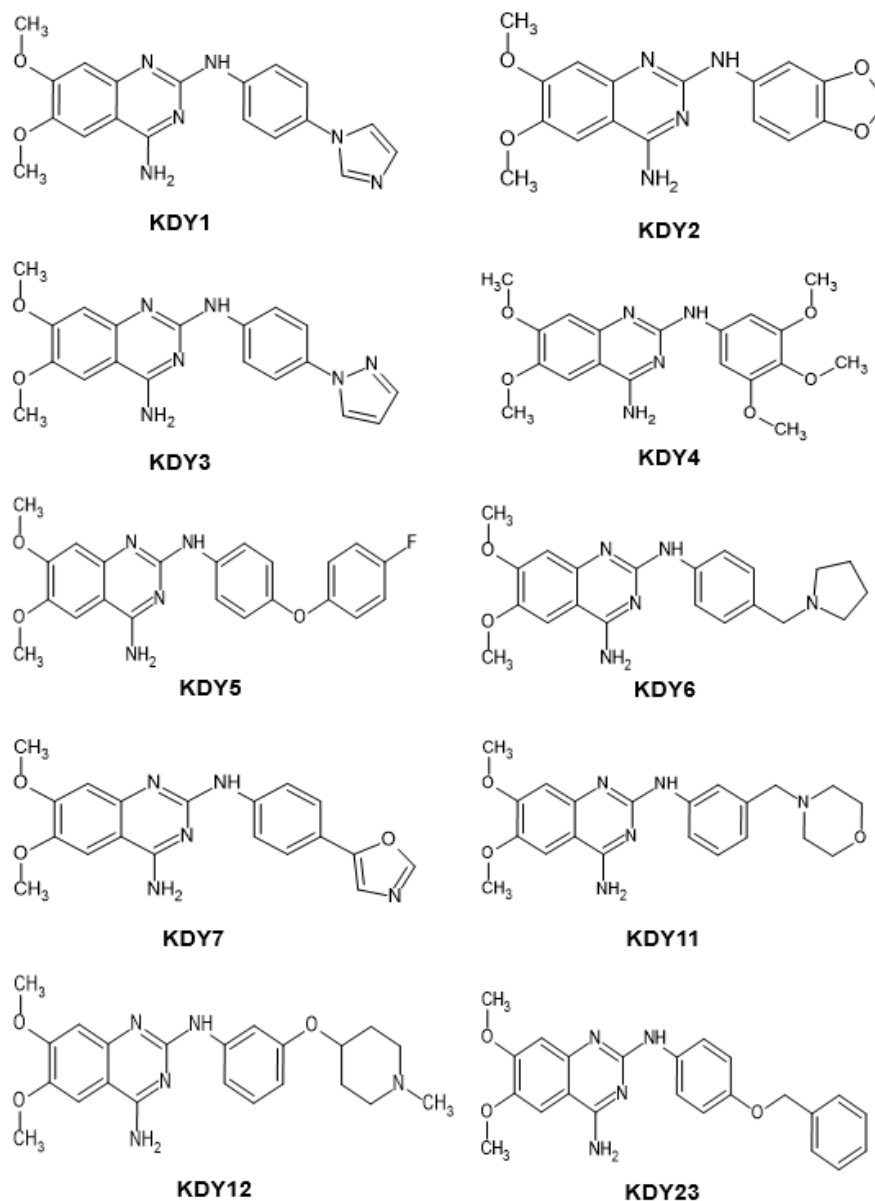
4 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Imunologia, e no biotério da Faculdade de Medicina do Mucuri da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, situado no Campus do Mucuri em Teófilo Otoni-MG (FAMMUC).

4.1 Substâncias teste

Uma série de derivados 2-anilquinazolinás denominados KDY1, KDY3, KDY4, KDY5, KDY6, KDY7, KDY11, KDY12 e KDY23 foram sintetizados para avaliação da atividade citotóxica. As estruturas dessas moléculas estão presentes na figura 4. Em particular, os derivados de 2-anilquinazolinás KDY3 e KDY23 foram sintetizados, caracterizados e testados *in vitro* em estudos prévios e patenteadas (BR 10 2024 019192 7) (Folly, 2024; Franco, 2025).

Figura 4 – Estrutura molecular dos derivados de quinazolinas estudados.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

4.2 Ensaios *in vitro*

Para os ensaios *in vitro* foi realizado o cultivo de células de câncer de mama de diferentes linhagens (4T1, MCF-7 e MDA-MB-231). As células foram utilizadas para realização de ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.

4.2.1 Cultura de células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231

As linhagens de células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em frascos de manutenção de 20 cm² em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI 1640 suplementado com 0,5% de penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos e 10% de soro fetal bovino, previamente inativado por tratamento em banho maria a 56° C por 30 minutos. As células foram incubadas em estufa (a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido). Ao atingirem 90% de confluência, as células foram lavadas com PBS e em seguida destacadas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25%. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL meio de cultura, e em seguida as células foram diluídas em corante de exclusão azul de tripan e contadas em uma câmara de Neubauer (Hausser Scientific 3100). Após a contagem, foi realizada diluição em meio de cultura em diferentes densidades de acordo com o ensaio experimental.

4.2.2 Ensaio de viabilidade celular MTT

Para verificar se os derivados de quinazolininas possuem efeito citotóxico sobre as células, foi realizado o ensaio MTT, que é um ensaio colorimétrico cujo princípio se baseia na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, produzindo o formazan, um produto azul roxo que precipita no interior da célula é solubilizado por um solvente orgânico (por exemplo, DMSO) e a absorbância a 570 nm é medida em um espectrofotômetro (Mosmann, 1983).

As células das linhagens 4T1, MDA-MB-231 e MCF-7 foram incubadas em placas de 96 poços (2 x 10⁴ células por poço) em meio RPMI-1640 suplementado com 0,5% de penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos e 10% de soro fetal bovino. As condições da incubação foram: 37°C, atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% de CO₂. As células foram tratadas com 9 derivados de quinazolininas denominados KDY1, KDY3, KDY4, KDY5, KDY6, KDY7, KDY11, KDY12 e KDY23, e foram selecionadas um grupo de células para serem tratadas com doxorubicina. Todos os tratamentos foram realizados nas concentrações de 50, 25, 10, 7,5, 5 e 1 µM, durante 48 horas. Também foram selecionadas um grupo de células para serem tratadas com DMSO, que foi o solvente utilizado para obter as soluções de estoque das moléculas.

A concentração de DMSO por poço de tratamento foi em torno de 0,5%, que foi a concentração máxima de solvente presente nas células tratadas com os derivados de quinazolina e que não representa significativa redução da viabilidade celular (Vieira et al., 2026). Os tratamentos foram realizados em triplicata. Como controle positivo, células sem tratamento também foram incubadas.

Após 48 horas de tratamento, foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 µL de RPMI-1640 suplementado e 10 µL de uma solução a 5 mg/mL de MTT, com posterior incubação à 37°C em estufa de CO₂, durante quatro horas. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de DMSO. Em seguida, foi realizada a leitura em leitor de microplaca EZ Read 2000 (Biochrom San Diego, USA) a 570nm. A viabilidade celular (%) foi obtida pela equação 1, considerando X1 e X2 a média da OD nos poços de células tratadas e células não tratadas, respectivamente.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (X1/X2) * 100 \quad (1)$$

Em que:

X1 = média da OD nos poços de células tratadas

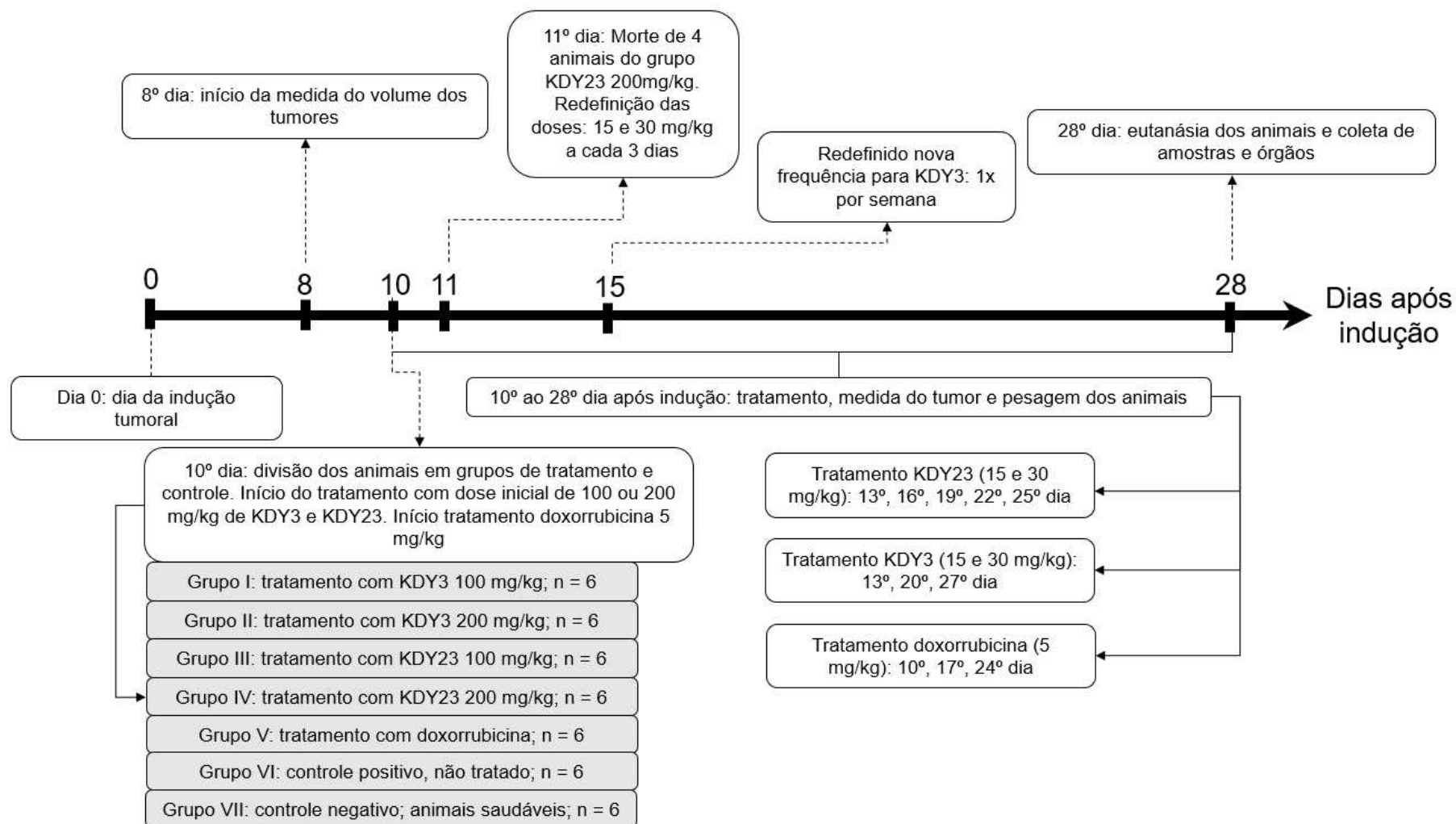
X2 = média da OD nos poços de células não tratadas

Com os valores da viabilidade celular para cada dose testada, foi feito o cálculo da concentração inibitória semimáxima (IC₅₀) usando ajuste não linear por meio do software GraphPad Prism versão 10.1.2.

4.3 Ensaio *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram conduzidos em camundongos para avaliar a eficácia antitumoral dos derivados de quinazolininas que demonstraram atividade citotóxica nos ensaios *in vitro*. Os derivados de quinazolininas KDY3 e KDY23 foram selecionados para os estudos *in vivo*. Os experimentos estão de acordo com protocolos experimentais aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA-Mucuri/UFVJM) sob a proposta registrada com o nº 01-2024 R (anexo A). O esquema 1 mostra o delineamento experimental do ensaio *in vivo*.

Esquema 1 – Delineamento experimental do ensaio *in vivo*



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

4.3.1 Animais

Camundongos isogênicos (*inbred*) BALB/c fêmeas (*Mus musculus*), entre 6 a 7 semanas de idade, foram adquiridos no biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro e transportados de carro até o biotério da FAMMUC. Os animais receberam água filtrada e ração própria industrializada, disponíveis à vontade. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno de 30,5 cm de comprimento x 19,7 cm de largura x 20 cm de altura com cama de maravalha, sendo 6 animais por gaiola. As gaiolas foram mantidas em estantes aclimatizadas (21 ± 1 °C), com exaustão do ar, com controle de iluminação em ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. O ambiente foi enriquecido com a disponibilização de papéis para estimular o comportamento de escavar e esconder. Foi respeitado um período de cinco dias de ambientação dos animais antes de iniciar o experimento.

4.3.2 Indução tumoral

O carcinoma mamário 4T1 é uma linhagem celular tumoral transplantável capaz de crescer em camundongos BALB/c e em cultura de tecidos (Pulaski, 2001; Zhang et al., 2018).

Células 4T1 foram mantidas em meio RPMI-1460 suplementado em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Após atingirem 90% de confluência, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e destacadas do frasco com tripsina a 0,25%. Foi adicionado 5 mL de meio sem soro para coleta das células tripsinizadas da placa e as células foram transferidas para um tubo cônico e centrifugadas por 10 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com 1 mL de meio. As células foram diluídas e coradas com azul de tripan, e em seguida contadas na câmara de Neubauer. Após a contagem, o volume de meio foi ajustado de maneira que as células ficassem na concentração desejada para injeção (4×10^5 cel /mL, equivalente à 2×10^4 /50 µL).

Os animais foram sedados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.). Após sedados, foi inoculado por via subcutânea (s.c.), na almofada de gordura mamária da mama caudal esquerda, 50 µL de meio contendo 2×10^4 células de adenocarcinoma mamário 4T1 (figura 5). Os animais foram

observados até recobrar a consciência. Os animais do grupo controle negativo não foram submetidos à indução tumoral.

Figura 5 – Indução tumoral: aplicação das células 4T1 na gordura mamária da mama caudal esquerda.



Fonte: própria autora (2026).

4.3.3 Avaliação do volume do tumor e do peso dos animais

A partir do oitavo dia após a indução, o tamanho do tumor foi medido a cada dois dias utilizando paquímetro (200MM Pd 200 Vonder®), conforme ilustrado na figura 6. O volume tumoral (mm^3) foi calculado utilizando a equação 2. O peso dos animais também foi avaliado periodicamente utilizando balança de precisão semi-analítica.

$$V = d^2 \times D \times 0,5 \quad (2)$$

Em que:

V = volume tumoral (mm^3)

d= diâmetro menor

D = diâmetro maior

Figura 6 – Medida da largura do tumor utilizando paquímetro.



Fonte: Própria autora (2026).

4.3.4 Grupos experimentais e tratamento

No 10º dia após a indução, os animais foram divididos em 7 grupos e foi iniciado o tratamento, conforme descrito a seguir:

I - Grupo inoculado com 4T1 e tratado com KDY3 (dose de inicial de 100mg/kg no 10º dia após indução; subsequentemente, dose reduzida de 15 mg/kg/semana, i.p.) – (n = 6 animais/grupo).

II - Grupo inoculado com 4T1 e tratado com KDY3 (dose de inicial de 200 mg/kg no 10º dia após indução; subsequentemente, dose reduzida de 30 mg/kg/semana, i.p.) - (n = 6 animais/grupo).

III - Grupo inoculado com 4T1 e tratado com KDY23 (dose de inicial de 100 mg/kg no 10º dia após indução; subsequentemente, dose reduzida de 15 mg/kg/a cada 3 dias, i.p.) - (n = 6 animais/grupo).

IV - Grupo inoculado com 4T1 e tratado com KDY23 (dose de inicial de 200mg/kg no 10º dia após indução; subsequentemente, dose reduzida de 30 mg/kg/ a cada 3 dias, i.p) - (n = 6 animais/grupo).

V - Grupo Tratamento Padrão: Inoculado com 4T1 e tratado com doxorrubicina (5 mg/kg/semana, i.p.) - (n = 6 animais/grupo).

VI – Grupo controle não tratado: inoculado com 4T1 e não tratado, aplicado veículo (solução salina 0,9% e pilossorbato 80 1,3%) - (n = 6 animais/grupo).

VII – Grupo controle negativo (não inoculado e não tratado) - (n = 6 animais/grupo).

Os tempos de administração estão detalhados no esquema 1 (página 45). Para a administração da KDY3 e KDY23 nos animais, foi feita uma suspensão destes derivados utilizando como veículo solução de cloreto de sódio 0,9% p/v estéril e 5% de polissorbato 80. O procedimento consistiu em misturar os pós com uma pequena quantidade do agente molhante (polissorbato 80), seguida de trituração com graal e pistilo para formar uma pasta espessa, que foi então suspensa na solução cloreto de sódio 0,9% p/v estéril. O polissorbato 80 foi utilizado como um agente molhante, levando à obtenção de uma suspensão uniforme e suave. A concentração de polissorbato 80 utilizada não apresenta toxicidade aos animais (Gad et al., 2006).

As suspensões foram aliqüotadas em microtubos e congeladas a -80°C. Para a administração nos animais, foi feito o descongelamento e agitação das suspensões, e posteriormente, diluição em solução cloreto de sódio 0,9% p/v estéril, de acordo com o peso dos animais e a dose necessária para cada grupo de tratamento.

Os camundongos receberam as doses pela via intraperitoneal, que permite que compostos em suspensão atinjam a circulação sistêmica, uma vez que na camada submesotelial do peritônio estão contidos vasos sanguíneos e linfáticos, e a presença desses vasos fornece uma superfície para a absorção rápida de fármacos para o plasma (Al Shoyaib et al., 2019).

4.3.5 Eutanásia dos animais

No 28º dia após a inoculação, os animais foram eutanasiados por exsanguinação após aprofundamento da anestesia, em que foi injetado 300 µL de uma solução contendo cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Em dois animais de cada grupo, foram realizadas as coletas do tumor, fígado e pulmão, que foram então colocados em tubos de 5 mL contendo solução de formalina 10%. No dia seguinte, a solução de formalina foi substituída por álcool 70%. Posteriormente, estes tumores e órgãos serão usados para análises histopatológicas em estudos futuros. Nos demais animais, foi realizada a coleta do tumor para dosagem de citocinas intratumorais e também a coleta do baço e dos linfonodos inguinais para pesagem. Os tumores foram mantidos a -80°C até as análises de citocinas.

4.4 Dosagem das citocinas

Para a dosagem das citocinas, as amostras de tumor foram descongeladas e macerados em solução de extração de citocinas (1 mL de solução para cada 100 mg de tecido) composto de: 0,4 M de NaCl, 0,05% de polissorbato 20, 0,5% de soroalbumina bovina, 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil, 0,1 M de cloreto de benzetônico, 10 mM de EDTA e 20 pM de aprotinina. Em seguida, o material foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80°C. Os extratos dos tumores obtidos por este processo foram utilizados para dosagem das citocinas IL-10, IL-12, TNF e IFN- γ pelo método ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura.

As placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão de revestimento, preparado conforme especificação do fabricante (BD Biosciences OptEIA™). As placas foram seladas e incubadas em refrigeração (4°C) até o dia seguinte. Após a incubação, as placas foram lavadas com tampão (PBS contendo 0,05% de polissorbato 20) e secas. Em seguida, realizou-se a etapa de bloqueio com diluente de ensaio (PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino), incubando por uma hora à temperatura ambiente. Após este período de incubação, as placas foram lavadas e secas. As amostras e os padrões da curva de calibração foram então distribuídos nos respectivos poços e incubados por duas horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem e secagem, adicionou-se a solução de trabalho contendo o anticorpo de detecção conjugado à enzima, preparada conforme as instruções do fabricante (BD Biosciences OptEIA™), seguida de incubação por uma hora. As placas foram então novamente lavadas e secas, e a reação foi iniciada pela adição do substrato cromogênico (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio), com incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em até 30 minutos após a parada da reação, utilizando um leitor de microplaca EZ Read 2000 (Biochrom, San Diego, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

4.5 Análise estatística

Os dados foram relatados como média \pm erro padrão da média. Todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal, por meio do teste de normalidade

Shapiro-Wilk. Para avaliar a significância dos efeitos observados, a comparação entre os grupos com distribuição normal foi analisada utilizando *one-way* ANOVA com o teste de comparação múltipla de Dunnett. Entre os grupos com distribuição não normal, a análise foi feita utilizando Kruskal-Wallis com o teste de comparação múltipla de Dunn. A comparação entre os pesos dos animais no início do experimento e no final do experimento foram feitas utilizando o teste t pareado. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism versão 10.1.2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de p menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os valores de p foram representados como: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

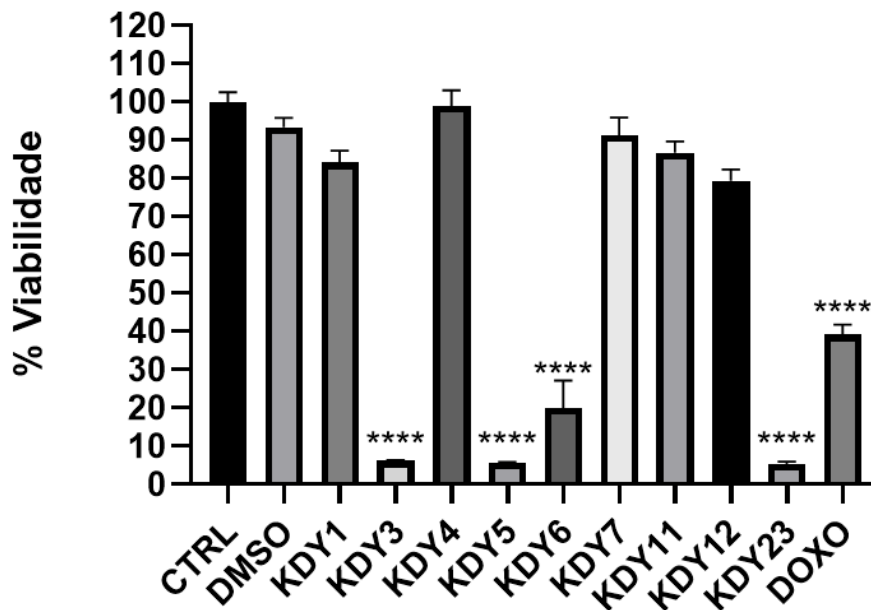
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de viabilidade das células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com os derivados de quinazolina

Neste teste, nove derivados de quinazolina denominados KDYs previamente sinterizados foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica em três linhagens celulares de câncer de mama: 4T1 (triplo-negativa), MDA-MB-231 (triplo-negativa) e MCF-7 (receptor de estrógeno positivo). Para tanto, foi realizado o ensaio MTT. A absorbância é diretamente proporcional à quantidade de formazan formado, que é proporcional à taxa de metabolismo celular. Quando as células morrem, elas perdem a capacidade de reduzir o MTT e, portanto, menor será a quantidade de formazan formado e conseqüentemente menor será a absorbância em 570 nm medida - dessa maneira é possível medir a quantidade de células viáveis (Gutiérrez et al., 2017).

Os resultados dos ensaios de viabilidade das células após tratamento com os nove derivados de quinazolininas pelo período de 48 horas demonstraram que as quinazolininas KDY1, KDY4, KDY7, KDY11 e KDY12 não foram capazes de reduzir de forma significativa a viabilidade na maior concentração testada (50 μ M), portanto foram consideradas como inativas. Em contrapartida, KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23 mostraram significativa inibição da viabilidade celular ($p < 0,0001$), conforme demonstrado nas figuras 7, 8 e 9.

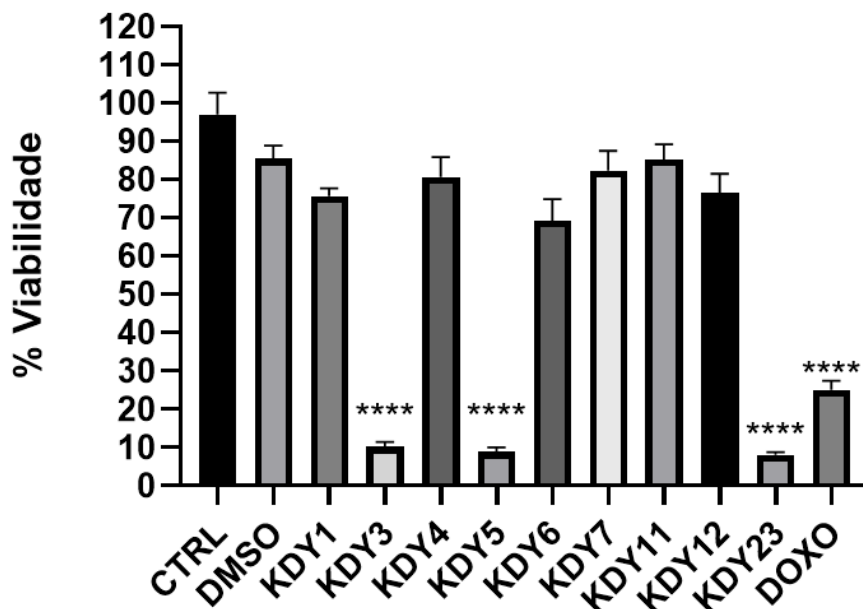
Figura 7 – Viabilidade celular das células MDA-MB-231 tratadas com 50 μ M por 48 horas



Legenda: Barras representam a média \pm erro-padrão. DMSO = dimetilsulfóxido na concentração final de 0,5%; CTRL = controle, células não tratadas; DOXO = doxorrubicina. ****p<0,0001 comparado com DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

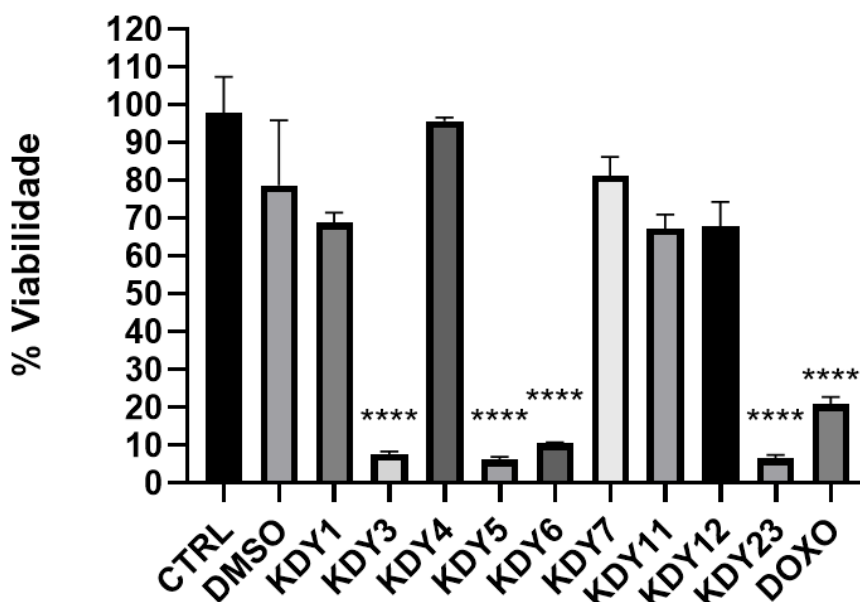
Figura 8 – Viabilidade celular das células MCF-7 tratadas com 50 μ M por 48 horas



Legenda: Barras representam a média \pm erro-padrão. DMSO = dimetilsulfóxido na concentração final de 0,5%; CTRL = controle, células não tratadas; DOXO = doxorrubicina. ****p<0,0001 comparado com DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura 9 – Viabilidade celular das células 4T1 tratadas com 50 μM por 48 horas

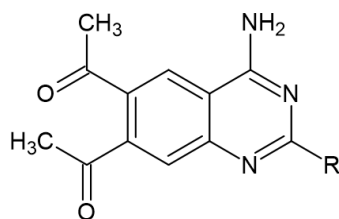


Legenda: Barras representam a média \pm erro-padrão. DMSO = dimetilsulfóxido na concentração final de 0,5%; CTRL = controle, células não tratadas; DOXO = doxorubicina. **** $p < 0,0001$ comparado com DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Os valores de IC_{50} das substâncias ativas estão presentes na tabela 1. KDY23 destacou-se como a substância mais potente da série (potência se refere à concentração em que a substância produz 50% de sua resposta máxima), apresentando os menores valores de IC_{50} : 5,72 μM (4T1), 10,66 μM (MDA-MB-231) e 8,36 μM (MCF-7). Em segundo lugar, a KDY3 também demonstrou atividade relevante, com IC_{50} de 6,54 μM (4T1), 14,74 μM (MDA-MB-231) e 13,92 μM (MCF-7). As moléculas KDY5 e KDY6 apresentaram a menor atividade citotóxica dentre as moléculas ativas da série, com valores de IC_{50} superiores a 18 μM nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 e superior a 11 μM na linhagem 4T1. A doxorubicina demonstrou IC_{50} na faixa de 0,65 a 3,65 μM . Esses resultados corroboram com os resultados de IC_{50} da doxorubicina reportados na literatura (Pilco-Ferreto; Calaf, 2016; Wan et al., 2021; Yosefi et al., 2025).

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ (μM) dos derivados de quinazolinas contra três linhagens de células de câncer de mama tratadas por 48 horas *in vitro* (continua).



Substância	R	IC ₅₀ (μM)		
		4T1	MDA-MB-231	MCF-7
KDY1		-	-	-
KDY2		-	-	-
KDY3		6,538	14,74	13,92
KDY4		-	-	-
KDY5		11,66	22,50	27,98
KDY6		20,54	24,91	18,20

(Continua na próxima página)

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ (μM) dos derivados de quinazolinas contra três linhagens de células de câncer de mama tratadas por 48 horas *in vitro* (conclusão).

Substância	R	IC ₅₀ (μM)		
		4T1	MDA-MB-231	MCF-7
KDY7		-	-	-
KDY11		-	-	-
KDY12		-	-	-
KDY23		5,722	10,66	8,362
DOXO	-	1,339	0,6519	3,648

Legenda: DOXO: doxorubicina; (-) Substância considerada inativa por apresentar redução da viabilidade celular insignificante ($p > 0,05$) na maior concentração testada.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O termo citotoxicidade se refere ao potencial de uma substância química de induzir alterações celulares que, conseqüentemente, diminuem a viabilidade celular da célula ou desencadeiam a morte celular. Os testes de citotoxicidade representam uma ferramenta crucial na descoberta de fármacos antitumorais. A citotoxicidade pode ser expressa como o valor da concentração inibitória semimáxima (IC₅₀), que corresponde à concentração do fármaco na qual 50% das células são mortas. Este parâmetro pode ser utilizado como referência para avaliar a eficácia de agentes

antitumorais: um valor de IC₅₀ baixo significa que o fármaco é potente em baixas concentrações (Berrouet et al., 2020; Femina et al., 2023; Hou et al., 2025).

Embora a doxorubicina convencional seja potente, ela possui vários problemas devido à falta de seletividade com subsequente falha terapêutica e reações adversas. A cardiotoxicidade induzida por DOXO é um grande problema que necessita da presença de novas formas farmacêuticas para diminuir o risco de morbidade associada (Shafei et al., 2017). Diante disso, é importante a busca por outras alternativas terapêuticas que possam ser usadas.

Os valores de IC₅₀ dos derivados de quinazolina KDY3 e KD23 foram inferiores aos do gefitinibe nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (16,5 µM e 33,89 µM, respectivamente) conforme os dados reportados na literatura (El Guerrab et al., 2016; Li et al., 2026). O gefitinibe é um derivado de quinazolina inibidor de tirosina quinase de primeira geração, aprovado para o tratamento do câncer de pulmão de não pequenas células, tem como alvo principal o EGFR (Ahmadi; Mohammednejadi; Razzaghi-asl, 2023).

Os resultados demonstrados neste estudo corroboram com os resultados do estudo de Franco (2025) em que também foi demonstrado que o tratamento com KDY3 frente a linhagem MCF-7 foi capaz de reduzir a viabilidade celular a partir da concentração de 10 µM. Assim como neste estudo, o tratamento com 50 µM de KDY3 reduziu a viabilidade celular em mais de 90%.

Foi relatado que KDY3 e KDY23 também inibiu a proliferação de outras linhagens tumorais. Em estudo de Folly (2024), a citotoxicidade da molécula KDY23 foi testada frente a linhagem de células de glioblastoma U87-MG, e foi capaz de reduzir a viabilidade celular com tratamento por 24 horas, reduzindo a viabilidade a partir da concentração de 5 µM (31,81% de redução da viabilidade). Nas demais concentrações de 7,5 µM, 10 µM, 25 µM e 50 µM houve redução significativa da viabilidade das células, sendo observada a redução de 68,98%, 85%, 95,03%, 96,04% respectivamente.

A quinazolina KDY3 também demonstrou capacidade de reduzir significativamente a viabilidade celular das linhagens de glioblastoma U87-MG e T98G nas concentrações 25 µM e 50 µM, sendo observada a redução de aproximadamente 70% na concentração de 50 µM. De forma contrária, os derivados de quinazolina KDY5 e KDY6 não reduziram significativamente a viabilidade celular desta linhagem de células tumorais (Franco, 2025).

A atividade demonstrada no ensaio de viabilidade celular *in vitro* abre caminho para estudos que buscam elucidar o possível mecanismo de ação pelo qual esses derivados de quinazolina atuam, como a avaliação de apoptose ou avaliação da inibição de vias de sinalização específicas.

No estudo de Folly (2024) realizado com linhagens de células de glioblastoma U87-MG tratadas com KDY23, foi observado um aumento de aproximadamente 3,5 vezes na quantidade da proteína caspase-3 clivada quando comparado ao controle (DMSO). Em relação a PARPc, observou-se um aumento na quantidade da proteína de aproximadamente 5 vezes no tratamento em relação ao controle; A PARPc e a caspase-3-clivada são marcadores-chave de apoptose (morte celular programada), e tais resultados sugerem que a KDY23 exerce seu efeito citotóxico a partir da indução de apoptose.

A atividade antiproliferativa das substâncias testadas demonstrada *in vitro* é a etapa inicial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, uma vez que uma das características mais fundamentais das células cancerosas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação crônica, e, portanto, a inibição da proliferação celular é um processo fundamental para o controle do crescimento desordenado de células no organismo (Martorana et al., 2022).

O efeito citotóxico dos derivados de quinazolina KDY3 e KDY23 nas linhagens de câncer de mama e de glioblastoma foram demonstrados neste tudo e em estudos anteriores, portanto, essas quinazolininas foram selecionadas para estudos do efeito antitumoral em estudos *in vivo*.

5.2 Atividade antitumoral

No primeiro dia de tratamento, foi administrada uma dose inicial aos grupos de tratamento experimental (100 mg/kg e 200 mg/kg). As concentrações dos tratamentos foram baseadas em um outro estudo de molécula análoga de KDY3 e KDY23, onde animais foram tratados com dose de 100 mg/kg, não promovendo mortes ou outros sinais/sintomas visíveis de intoxicação dos animais (Antunes, 2013).

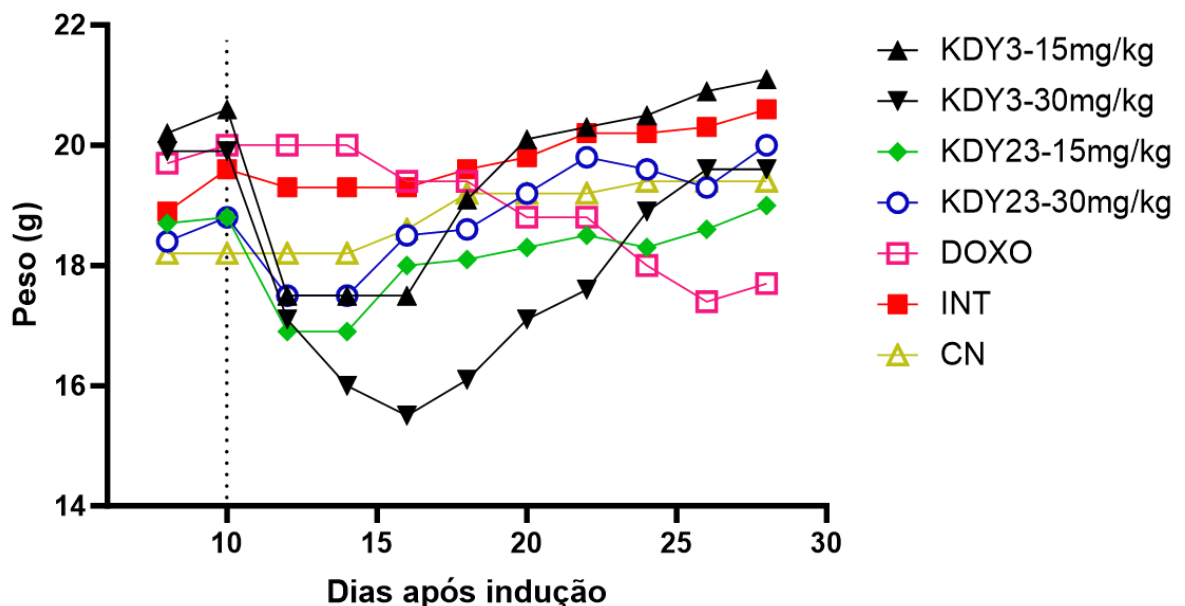
Um dia após essa primeira aplicação, foi constatada a morte de 4 animais do grupo IV (KDY23 200 mg/kg), restando apenas 2 animais neste grupo. Por conseguinte, os resultados encontrados neste grupo não são estatisticamente significativos. A morte desses animais foi atribuída a toxicidade aguda causada pela

KDY23 nesta dose, uma vez que a necrópsia desses animais não apontou danos físicos que poderiam ser a causa da morte.

Os animais que receberam a aplicação de 100 mg/kg e 200 mg/kg de KDY3 (grupos I e II, respectivamente) também apresentaram sintomas de toxicidade após a administração dessa dose de inicial, uma vez que estavam com pelo eriçado (piloereção) e também não estavam se alimentando normalmente, porém todos os animais sobreviveram. Diante desses sintomas, o esquema de dose foi ajustado e o grupo I passou a receber 15 mg/kg de KDY3 e o grupo II passou a receber 30 mg/kg de KDY3, uma vez a cada semana. O grupo III passou a receber 15 mg/kg de KDY23 e o grupo IV 30 mg/kg de KDY23, uma vez a cada três dias (Lin et al., 2025; Liu et al., 2025).

A figura 10 demonstra a variação do peso médio dos animais de cada grupo ao longo dos dias de tratamento, e este parâmetro foi usado para avaliar a toxicidade causada pela administração dos derivados de quinazolina e doxorrubicina.

Figura 10 – Massa corporal dos grupos de camundongos BALB/c ao longo do tratamento.



Legenda: A linha tracejada indica o início do tratamento. INT: Induzido e não tratado, injetado com salina 0,9% i.p. e polissorbato 80. DOXO: doxorrubicina (5 mg/kg/semana, i.p.). CN: controle negativo, não induzido.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Após a dose inicial de 100 e 200 mg/kg, foi observado uma queda abrupta do peso dos animais tratados com KDY3, onde a média de peso entre os grupos I e II

passou de $20,3 \pm 0,49$ g no dia da aplicação da primeira dose para $17,3 \pm 0,28$ g dois dias após (redução de ~15% em 48 horas). Cinco dias após a primeira aplicação, os animais do grupo I chegaram a uma média de $17,2 \pm 1,56$ g, e o grupo II chegou a uma média de $15,2 \pm 1,33$ g (perda de peso de 16,5% e 23,6%, respectivamente).

A perda de peso abrupta observada nos grupos tratados com KDY3 após a primeira dose reflete sua toxicidade em altas doses (Silva, A. et al., 2021). Essa observação justificou a redução da frequência de administração para semanal, estratégia que permitiu recuperação ponderal até o final do experimento (grupo I com $21,1 \pm 1,35$ g e grupo II $19,6 \pm 1,43$ g no 28º dia após indução). Após a redução da dosagem não houve morte dos animais, o que pode ser considerado como um parâmetro positivo de não toxicidade desta quinazolina em baixa dose.

A quinazolina KDY23, embora tenha causado a morte de quatro animais com a dose elevada, não causou perda de peso significativa nos animais sobreviventes (<10% de perda de peso em 48 horas), o que contribuiu para estabelecer o esquema de dose para uma frequência mais curta em relação à KDY3, isto é, uma vez a cada três dias. Assim como ocorreu com os grupos tratados com a KDY3, esta estratégia também permitiu recuperação ponderal até o final do experimento, em que os animais dos grupos III e IV apresentaram peso médio de $19,0 \pm 1,84$ g e $20 \pm 1,63$ g, respectivamente.

Os animais tratados com a doxorrubicina possuíam em média $20 \pm 0,89$ g no primeiro dia do tratamento, e ao final do experimento, estavam com a média de $17,7 \pm 1,66$ g (11,5% de perda de peso). Análise estatística com teste t-pareado comparando o peso no início e no fim do tratamento demonstrou que essa foi uma diferença de peso significativa ($p = 0,0058$).

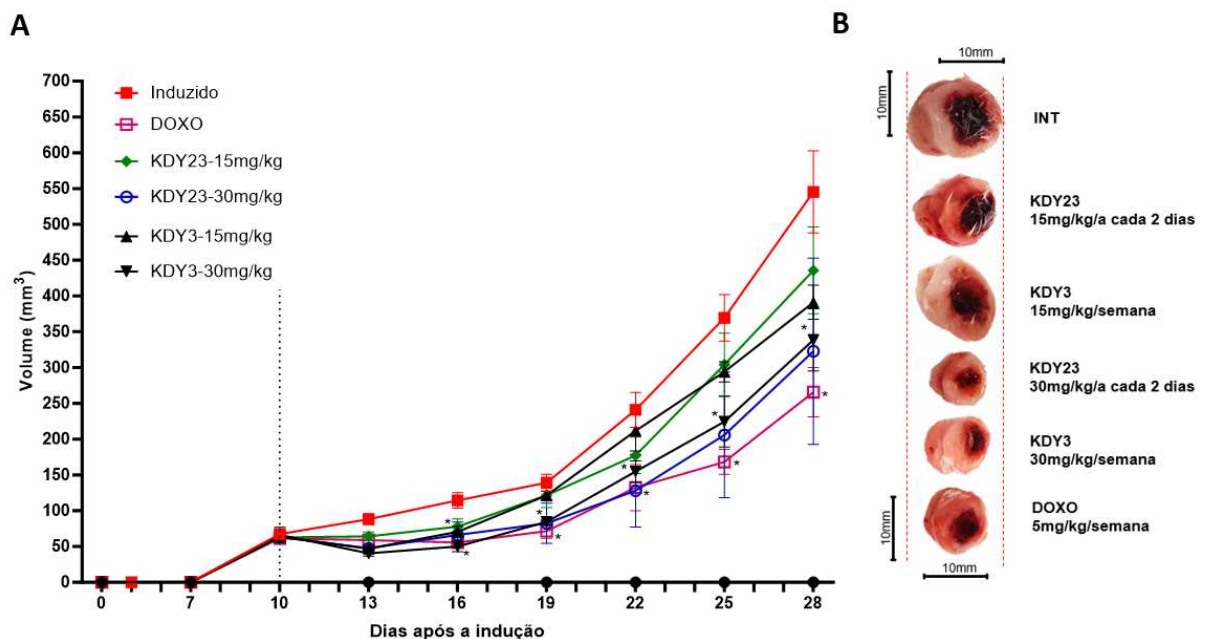
Utilizando um modelo experimental que mimetiza de perto os ciclos de tratamento quimioterápico empregados em pacientes com câncer, um estudo demonstrou que o tratamento com doxorrubicina, administrado em ciclos, resultou em perda significativa de peso corporal, atrofia muscular esquelética, perda de força e comprometimento da função física (Van Asbroeck et al., 2025).

Embora a doxorrubicina seja eficaz na destruição de células cancerosas, ela está associada a diversas reações adversas que podem impactar significativamente a qualidade de vida dos pacientes com câncer. Entre eles, incluem-se cardiotoxicidade, miopatias esqueléticas, mielossupressão e fadiga. Todos estão associados à atrofia e fraqueza muscular, contribuindo para o desenvolvimento de

caquexia e sarcopenia (Van Asbroeck et al., 2025). Este resultado reforça a necessidade de alternativas menos tóxicas.

Para avaliação da atividade antitumoral, o crescimento do tumor foi monitorado a cada dois dias com medições do comprimento e da largura, usando um paquímetro. O valor das duas medições foi registrado e aplicado na equação 2 (vide metodologia página 47) para obtenção do volume do tumor em mm^3 . O gráfico da média e o DP do volume tumoral de cada grupo ao longo do tratamento está demonstrado na figura 11. A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à redução no crescimento dos tumores nos animais.

Figura 11 – Volume tumoral dos grupos de tratamento e controle inoculados com carcinoma mamário 4T1.



Legenda: **A.** O tamanho dos tumores foi mensurado a cada dois dias a partir do 8º dia de indução dos animais com células 4T1 com auxílio de um paquímetro digital. A linha tracejada indica o início do tratamento. **B.** Comparação visual de tumores extraídos após a eutanásia. Os tumores selecionados para a comparação representam tumores com volume tumoral mediano do grupo, exceto para o grupo KDY23 30 mg/Kg, em que foi incluído o menor tumor. INT: Induzido e não tratado, injetado salina 0,9% com polissorbato 80 i.p. DOXO: doxorrubicina (5 mg/kg/semana, i.p.). * $p < 0,05$; quando comparado ao INT.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Em todos os grupos, o volume dos tumores no primeiro dia de tratamento (dia 10) estavam com uma média de $64,20 \pm 2,29 \text{ mm}^3$. No dia 28 após indução, os volumes dos tumores foram significativamente menores nos grupos V (doxorrubicina 5 mg/kg/semana) e II (KDY3 30 mg/kg/semana) quando comparado com o com o grupo

de controle induzido e não tratado ($p = 0,0029$ e $0,0338$, respectivamente). A média de volume tumoral do grupo tratado com doxorubicina não apresentou diferença significativa quando comparado com a média do volume tumoral do grupo II ($p = 0,224$), sugerindo que este tratamento demonstrou efeito semelhante ao efeito da doxorubicina.

Embora o grupo tratado com KDY3 na dose de 15 mg/kg/semana (Grupo I) tenha apresentado um menor volume tumoral médio ($403,6 \pm 53,2 \text{ mm}^3$) em comparação ao controle não tratado ($514,6 \pm 151,6 \text{ mm}^3$), essa diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,1578$). A toxicidade inicial observada (perda de peso pós-dose inicial) e subsequente ajuste para doses semanais podem ter limitado a exposição tumoral ao derivado de quinazolina, reduzindo sua eficácia.

Quanto à KDY23, a morte de quatro animais causada pela toxicidade da dose inicial de 200 mg/kg limitou a análise estatística do grupo IV devido ao número amostral (n) baixo, mas os animais sobreviventes exibiram volume tumoral inferior ao grupo controle não tratado ($322,8 \pm 184,1 \text{ mm}^3$ vs. $514,6 \pm 151,6 \text{ mm}^3$). O grupo III, tratado com uma dose de 15 mg/kg de KDY23, não demonstrou efetividade *in vivo* quando comparado com o grupo controle ($416,7 \pm 148,6 \text{ mm}^3$; $p = 0,399$).

Apesar da limitação amostral, a diferença numérica entre os grupos III e IV sugere um possível efeito dose-dependente. Esses resultados reforçam a necessidade de novos estudos com ajustes posológicos para otimizar a concentração plasmática de KDY23 *in vivo* (por ex.: 30 e 60 mg/kg/a cada 3 dias), de maneira que seja alcançada uma concentração plasmática que esteja na janela terapêutica, isto é, o intervalo seguro de concentração de um fármaco na corrente sanguínea que produz o efeito desejado com toxicidade mínima, de modo a atingir um equilíbrio mais favorável entre eficácia e segurança (Hait; Rubin; Bertino, 2015).

Para explorar o impacto do tratamento experimental nos órgãos linfoides secundários, foi feita a coleta e a pesagem dos linfonodos inguinais e baço, que estão apresentados na tabela 2 e nas figuras 12 e 13.

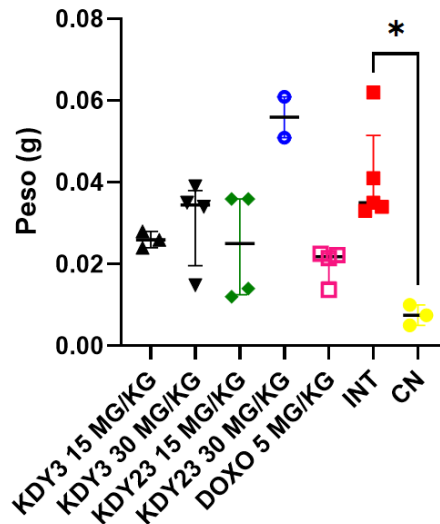
Tabela 2 – Peso do baço e linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c dos grupos de tratamento e controle.

GRUPO	TRATAMENTO	POSOLOGIA	PESO BAÇO (g)	PESO LINFONODOS INGUINAIS (g)
I	KDY3	DI: 100 mg/kg DS:15 mg/kg/semana	0,599 ± 0,178	0,026 ± 0,002
II	KDY3	DI: 200 mg/kg DS:30 mg/kg/semana	0,643 ± 0,154	0,030 ± 0,10
III	KDY23	DI: 100 mg/kg DS: 15 mg/kg/a cada 3 dias	0,611 ± 0,102	0,024 ± 0,013
IV	KDY23	DI: 200 mg/kg DS: 30 mg/kg/ a cada 3 dias	0,522 ± 0,242	0,056 ± 0,007
V	DOXO	5 mg/kg/semana	0,312 ± 0,122	0,020 ± 0,004
VI	INT	-	0,532 ± 0,040	0,041 ± 0,012
VII	CN	-	0,100 ± 0,010***	0,007 ± 0,002*

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Legenda: INT: Induzido e não tratado. DOXO: doxorubicina. CN: controle negativo (não induzido). DI: dose inicial. DS: dose ajustada, subsequente à dose inicial. *p<0,05, ***p<0,001, quando comparado ao grupo induzido e não tratado (grupo VI).

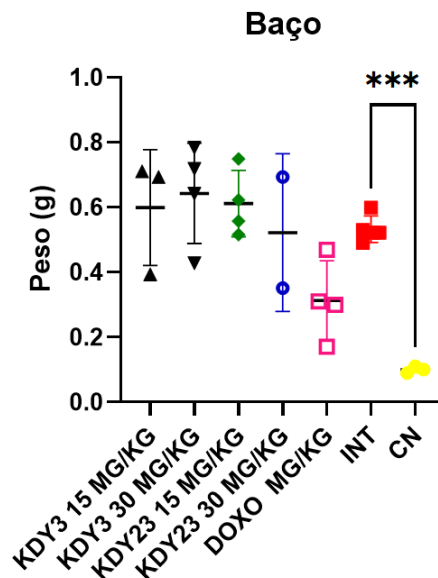
Figura 12 – Peso dos linfonodos inguinais dos animais dos grupos de tratamento e controle inoculados com carcinoma mamário 4T1.



Legenda: Barras representam a mediana e intervalos interquartil. DOXO: doxorubicina (grupo V). INT: Induzido e não tratado (grupo VI). CN: controle negativo (grupo VII). * $p < 0,05$ comparado com INT.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura 13 – Peso dos baços dos animais dos grupos de tratamento e controle inoculados com carcinoma mamário 4T1.



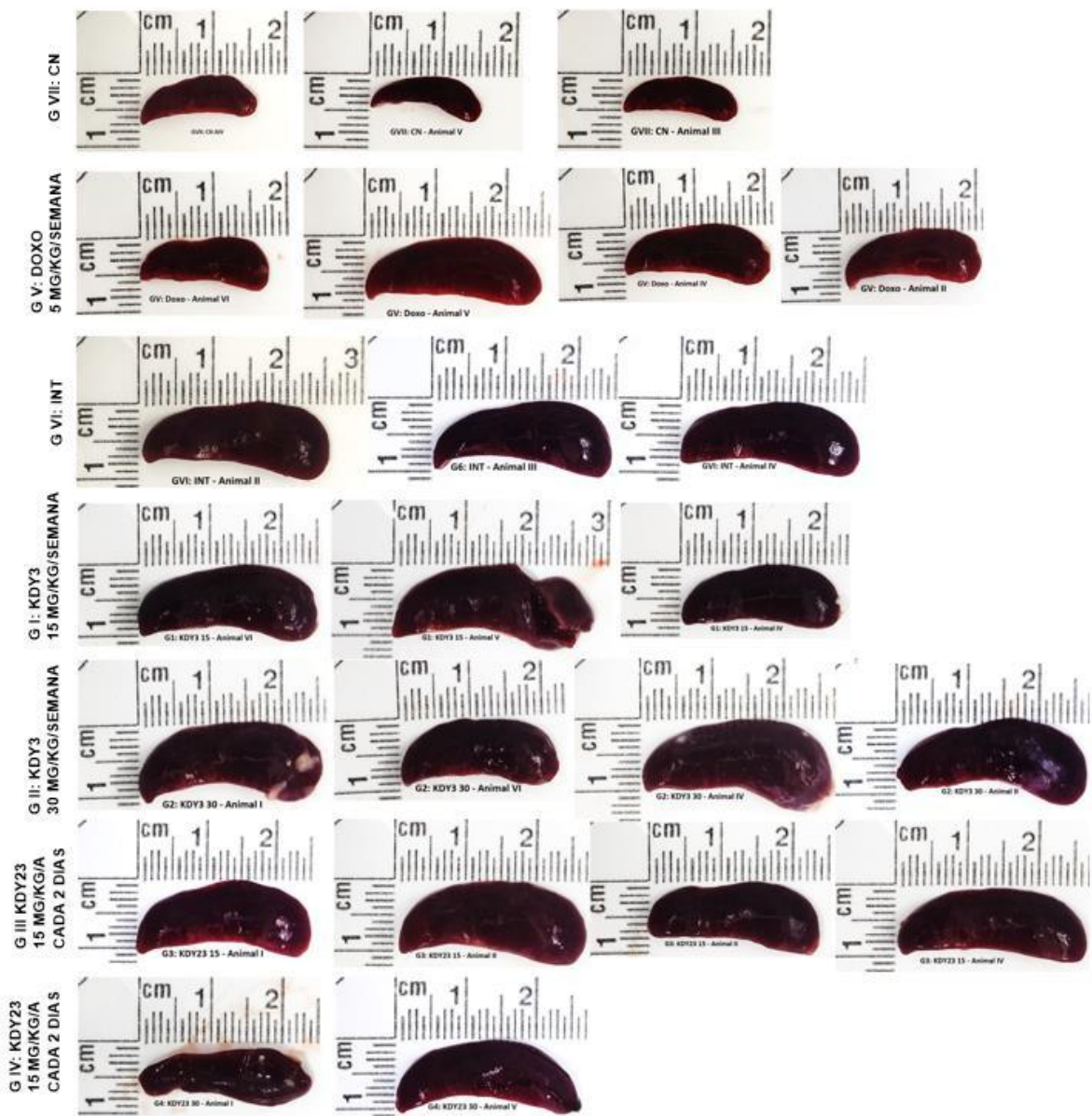
Legenda: Barras representam a média e desvio padrão. DOXO: doxorubicina (grupo V). INT: Induzido e não tratado (grupo VI). CN: controle negativo (grupo VII). *** $p < 0,001$ comparado com INT.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O baço tem um papel importante e único na função dos sistemas hematopoiético e imune. O parênquima deste órgão contém um tecido com função eritropoiética denominada polpa vermelha, e um tecido linfoide denominada polpa branca, onde ocorrem as respostas imunológicas a antígenos veiculados pela circulação. Em um camundongo adulto jovem, o baço pesa aproximadamente 100 mg (Covelli, 2025).

Foi observado que nos grupos de tratamento experimental (grupos I, II, III e IV) e no grupo tratado com doxorrubicina (grupo V), não houve um aumento significativo do tamanho do baço quando comparado ao grupo introduzido e não tratado (grupo VI, controle positivo). O grupo de controle positivo demonstrou aumento significativo do peso do baço quando comparado com o grupo de controle negativo (grupo VII). Pela figura 14 é possível fazer uma comparação visual do aumento do baço nos grupos experimentais.

Figura 14 – Comparação visual dos baços extraídos dos camundongos BALB/c.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A esplenomegalia observada em modelos experimentais de camundongos portadores do tumor 4T1 está frequentemente associada à reação leucemoide. Essa reação é caracterizada por uma granulocitose, isto é, aumento do número de granulócitos, que se infiltram no baço causando seu aumento. Estudo de DuPre' et al. (2007) revelou que a esplenomegalia observada em camundongos portadores de tumor 4T1 era principalmente resultado do aumento do número de granulócitos

esplênicos. Esses granulócitos podem ter vindo do pool expandido de granulócitos do sangue periférico e/ou da granulopoiese extramedular.

Esses achados são confirmados por Yuan et al. (2019), que demonstram que uma característica única do modelo 4T1 é a alta secreção constitutiva de fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) para estimular a produção de células mieloides imaturas, que são sequestradas pelo câncer, dando origem às CSDMs. As CSDMs infiltram os tecidos linfoides periféricos (linfonodos e baço), bem como o tecido tumoral.

A análise do peso dos linfonodos inguinais mostra que nenhum dos tratamentos (tanto experimental quanto com doxorrubicina) alterou de forma significativa o peso destes em comparação com o grupo de controle positivo (induzido e não tratado, grupo VI). Houve diferença significativa entre grupo VI (controle não tratado) e VII (controle negativo, animais saudáveis).

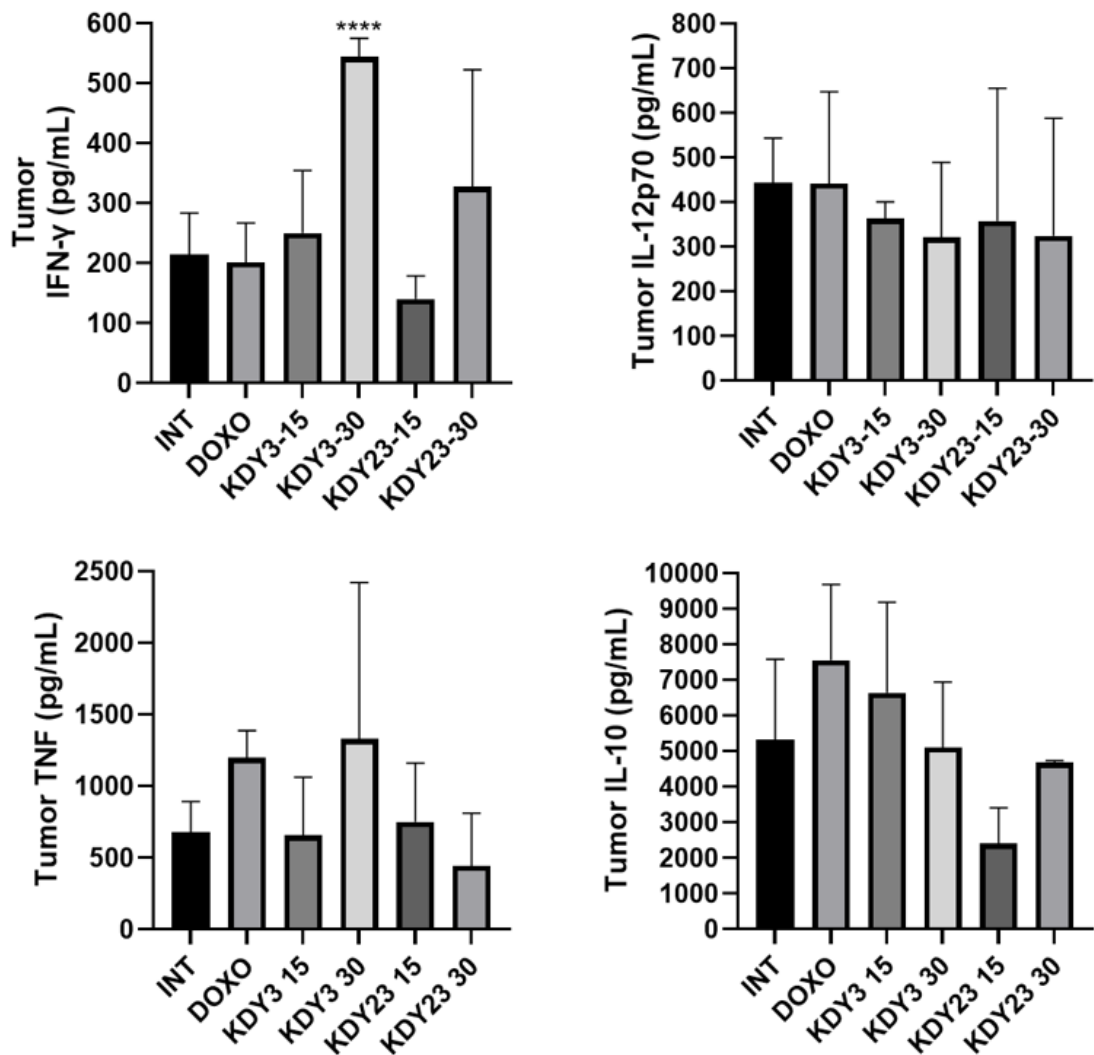
Commerford et al. (2018) utilizaram o câncer de mama murino 4T1 para investigar alterações morfológicas e moleculares da rede linfática em linfonodos que drenam o tumor ao longo do tempo, antes da chegada das células tumorais metastáticas. O crescimento tumoral foi acompanhado por um aumento no peso do linfonodo inguinal que drena o tumor, mas não do linfonodo inguinal contralateral que não drena, indicando um efeito local mediado pelo tumor. Eles descobriram que o inchaço dos linfonodos induzido por tumor está associado a uma remodelação maciça da rede vascular linfática, mediada pelo brotamento e proliferação de células endoteliais linfáticas. Essas alterações são provavelmente induzidas por fatores linfangiogênicos drenados do tumor primário ou produzidos por leucócitos ativados, como, por exemplo, células B.

Segundo Zhang e colaboradores (2013), o aumento significativo no peso dos linfonodos no grupo VI (controle não tratado: 0,041 g) em comparação ao grupo VII (controle negativo: 0,007 g) também pode ser resultado de metástase linfática, um fenômeno bem documentado no modelo 4T1. A ausência de diferença significativa entre os grupos tratados (I-V) e o controle negativo (VII) sugere que os tratamentos podem ter inibido a disseminação metastática.

5.3 Análise de citocinas

Para avaliar o efeito de modulação do microambiente tumoral (MAT) dos tratamentos no modelo murino 4T1, foram analisadas as alterações nos níveis de citocinas dentro do microambiente tumoral. Os tumores foram macerados e avaliados quanto aos níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF e IL-12p70 e a citocina anti-inflamatória IL-10 por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados estão sumarizados na tabela 3 e representados pelos gráficos da figura 15.

Figura 15 – Avaliação das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-12p70 no tumor de camundongos BALB/c induzidos com células 4T1.



Legenda: Barras representam a média \pm erro-padrão. INT: Induzido e não tratado, injetado com salina 0,9% com polissorbato 80 i.p. DOXO: doxorrubicina (5 mg/kg/semana, i.p.). ****p < 0,0001; quando comparado ao grupo induzido e não tratado.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Tabela 3 – Concentração de citocinas (pg/mL) nos tumores dos grupos tratados (I-V) e não tratado (VI).

CITOCINA	GRUPO					
	I	II	III	IV	V	VI
IFN-γ	250,4 \pm 104,5	544,3 \pm 30,72 ^a	140,4 \pm 38,5	327,1 \pm 195,6	201,6 \pm 65,5	214,5 \pm 69,48
TNF	655,3 \pm 409,1	1330 \pm 1096	750,2 \pm 411,6	442,1 \pm 369,3	1198 \pm 189,9	681,1 \pm 211,5
IL-12p70	363,1 \pm 37,73	320,8 \pm 168,9	358,4 \pm 296,9	352,3 \pm 262,9	441,6 \pm 205,9	442,9 \pm 100,7
IL-10	6643 \pm 2548	5101 \pm 1844	2406 \pm 1009	4676 \pm 65,12	7560 \pm 2128	5333 \pm 2257

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Legenda: ^a $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo VI (induzido e não tratado).

Apesar das diferenças numéricas observadas, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis das citocinas IL-12p70, TNF e IL-10 entre os grupos tratados e o grupo controle induzido e não tratado (grupo VI). O Grupo IV teve seu resultado considerado exploratório devido ao número insuficiente de amostras.

Em relação ao IFN- γ , o grupo tratado com KDY3 na dose alta apresentou o maior nível médio (544,3 \pm 30,72 pg/mL), valor significativamente superior aos dos grupos controle positivo (214,5 \pm 69,48 pg/mL, $p < 0,0001$) e DOXO (201,6 \pm 65,5 pg/mL, $p = 0,0004$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa.

Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, estudo anterior em camundongos BALB/c com tumores mamários 4T1 mostrou que os níveis tumorais de TNF- α e IFN- γ aumentaram ligeiramente com o tratamento com doxorrubicina 2 mg/kg/a cada dois dias i.v., mas este aumento não foi significativo (Gao et al., 2024). Outro estudo em que camundongos BALB/c foram tratados com doxorrubicina 5 mg/kg i.v. a cada 7 dias também não demonstrou elevação significativa nos níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 intratumorais (Du et al., 2010). Outro estudo observou que embora houvesse uma tendência de aumento da IL-12p70 intratumoral no grupo tratado com doxorrubicina em comparação com o grupo tratado com solução PBS, esse aumento não foi significativo (Masteria et al., 2018).

A citocina IFN- γ inibe o desenvolvimento do tumor. Ela é secretada principalmente na primeira fase da imunoeedição do câncer, que é a fase de eliminação, na qual as células do sistema imunológico inato e adaptativo são recrutadas para o local dos antígenos tumorais e tentam destruir as células tumorais

por meio de mecanismos de ataque imunológico. Essa citocina é secretada por células T auxiliares Th1 e atua para limitar o crescimento tumoral, promover o processamento e a apresentação de antígenos e ativar macrófagos M1, células NK e células T CD8+, que irão auxiliar na destruição das células tumorais (Tower, Ruppert; Britt, 2019; Gatti-Mays et al., 2019; Purnomosari et al., 2025).

Os resultados demonstraram que os animais tratados com KDY3 na dose maior expressaram níveis mais elevados de IFN- γ em comparação com o grupo induzido e não tratado, indicando que o a KDY3 induz a resposta imune antitumoral em um efeito dose-dependente. As células CD4+ Th1 são a principal fonte de IFN- γ , que impulsiona uma variedade de respostas antitumorais. Promover respostas imunes Th1 e gerar uma resposta de células T CD8+ são objetivos centrais da imunoterapia tumoral, tornando a KDY3 um promissor tratamento complementar em regimes de imunoterapia (Holicek et al., 2024).

6 CONCLUSÕES

Os ensaios *in vitro* demonstraram que, dentre os nove derivados de quinazolina avaliados, quatro compostos (KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23) apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens de câncer de mama, enquanto KDY1, KDY4, KDY7, KDY11 e KDY12 não exibiram citotoxicidade significativa. Entre os compostos ativos, KDY3 e KDY23 destacaram-se pelos maiores efeitos citotóxicos, sendo selecionados para avaliação *in vivo*.

Nos experimentos *in vivo*, o tratamento com KDY3 (30 mg/kg/semana, com dose inicial de 200 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o crescimento do adenocarcinoma mamário em modelo murino, evidenciando atividade antitumoral. Além disso, a análise ponderal indicou menor toxicidade sistêmica em comparação ao tratamento padrão com doxorrubicina.

Por outro lado, KDY23 apresentou toxicidade aguda em dose elevada e ausência de eficácia antitumoral em doses menores, indicando a necessidade de reavaliação posológica para validação de seu potencial terapêutico.

Observou-se ainda que o tratamento com KDY3 promoveu efeito imunomodulador, caracterizado pelo aumento de IFN- γ intratumoral, sugerindo que a modulação dessa citocina constitui um dos possíveis mecanismos de ação da substância.

Em conjunto, os resultados indicam que KDY3 é um derivado de quinazolina promissor como candidato a fármaco para o tratamento do câncer de mama, apresentando atividade citotóxica *in vitro*, eficácia antitumoral *in vivo* e perfil inicial de segurança favorável.

REFERÊNCIAS

AKBABA, M. et al. In Vivo Investigation of Supportive Immunotherapeutic Combination of Bifidobacterium infantis 35624 and Doxorubicin in Murine Breast Cancer. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 3 fev. 2022.

ADMOUN, Claudia; MAYROVITZ, Harvey N. The etiology of breast cancer. In: MAYROVITZ, Harvey N. Breast Cancer. Brisbane (AU): Exon Publications, 2022.

AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, p. 12, 23 dez. 2019.

AHMADI, A.; MOHAMMADNEJADI, E.; RAZZAGHI-ASL, Nima. Gefitinib derivatives and drug-resistance: A perspective from molecular dynamics simulations. **Computers in Biology and Medicine**, v. 163, p. 107204, 2023.

American Type Culture Collection. Breast Cancer Resource Book. 2024. Disponível em: <https://www.atcc.org/-/media/resources/brochures/breast-cancer-resource-book.pdf?rev=0351bea8d1744777bdb660cd0fee93c5>. Acesso: 16 de janeiro de 2026.

AMIN, A. et al. A Review on The Medicinal And Industrial Applications of N-Containing Heterocycles. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 16, n. 1, 16 nov. 2022.

ANTUNES, João Eustáquio. Novas Quinazolininas 2,4,8-dissubstituídas com Potencial Atividade de Inibição da Quinase de Adesão Focal (FAK). 2013. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas- Unicamp, Campinas, 2013.

BAI, Xue et al. Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer. **Cell Discovery**, v. 9, n. 1, p. 18, 2023.

BANSAL, R.; MALHOTRA, A. Therapeutic progression of quinazolines as targeted chemotherapeutic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 211, p. 113016, 2021.

BANSAL, Isha; PANDEY, Amit Kumar; RUWALI, Munindra. Small-molecule inhibitors of kinases in breast cancer therapy: recent advances, opportunities, and challenges. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1244597, 2023.

BATHULA, R. et al. Evaluation of antitumor potential of synthesized novel 2-substituted 4-anilinoquinazolines as quinazoline-pyrrole hybrids in MCF-7 human

breast cancer cell line and A-549 human lung adenocarcinoma cell lines. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 44, 2020.

BERROUET, Catherine et al. Comparison of drug inhibitory effects (IC 50) in monolayer and spheroid cultures. **Bulletin of mathematical biology**, v. 82, n. 6, p. 68, 2020.

BHULLAR, K. S. et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. **Molecular Cancer**, v. 17, p. 48, 2018. DOI: 10.1186/s12943-018-0804-2.

BHUSHAN, A.; GONSALVES, A.; MENON, J. U. Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 723, 2021.

BIGNOLD, Leon P. Principles of tumors: a translational approach to foundations. **Academic press**, p. 389-418, 2020.

BOIX-MONTESINOS, P. et al. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 173, p. 306–330, 1 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Câncer de Mama*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2024/RRPCDTCncerdeMama_CP.pdf. Acesso em: 27 jun. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: câncer de mama. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer-de-mama>. Acesso em: 15 set. 2025.

BRASIL. Instrução Normativa nº 353, de 18 de março de 2025. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 mar. 2025. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-353-de-18-de-marco-de-2025-618786910>. Acesso em: 25 jul. 2025.

BURGUIN, A.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 8, p. 808, 19 ago. 2021.

BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182–201, abr. 2014.

BURUGU, S.; ASLEH-ABURAYA, K.; NIELSEN, T. O. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. **Breast Cancer**, v. 24, n. 1, p. 3–15, 2016.

CAMARILLO, IGNACIO G. et al. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: An in vitro model study. **Electroporation-based therapies for cancer**, p. 55-102, 2014.

CHANDLER, C. et al. The double edge sword of fibrosis in cancer. **Translational Research**, v. 209, p. 55-67, 2019.

CHA, Y. J.; KOO, J. S. Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1785, 27 jul. 2020.

CHUNG TDY, TERRY DB, SMITH LH. In Vitro and In Vivo Assessment of ADME and PK Properties During Lead Selection and Lead Optimization – Guidelines, Benchmarks and Rules of Thumb. 2015 Sep 9. In: Markossian S, et al., Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326710/>> Acesso: janeiro de 2026.

CILIBRASI, C. et al. Reconstituting Immune Surveillance in Breast Cancer: Molecular Pathophysiology and Current Immunotherapy Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 12015, 2021.

CIRINGIONE, A.; RIZZI, F. Facing the Challenge to Mimic Breast Cancer Heterogeneity: Established and Emerging Experimental Preclinical Models Integrated with Omics Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 10, p. 4572, 2025. DOI: 10.3390/ijms26104572.

COMMERFORD, Catharina D. et al. Mechanisms of tumor-induced lymphovascular niche formation in draining lymph nodes. **Cell reports**, v. 25, n. 13, p. 3554-3563. e4, 2018.

COVELLI, V. Guide to the Necropsy of the Mouse. [S.l.]: Pathbase, [s.d.]. Disponível em: http://www.pathbase.net/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php. Acesso em: 22 jun. 2025.

COWELL, C. F. et al. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 5, p. 859-869, 2013.

DENAYER, T.; STÖHR, T.; VAN ROY, M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 5-11, 2014.

DU, Gangjun et al. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 7, p. 819-826, 2010.

DUELEN, R. et al. Medicinal Biotechnology for Disease Modeling, Clinical Therapy, and Drug Discovery and Development. **Introduction to Biotech Entrepreneurship: From Idea to Business**, p. 89–128, 2019.

DUPRE' SA, KWH Jr. et al. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. **Experimental and molecular pathology**, v. 82, n. 1, p. 12-24, 2007.

DVIR, Kathrin; GIORDANO, Sara; LEONE, Jose Pablo. Immunotherapy in breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, p. 7517, 2024.

ELDEHNA, W. M. et al. Discovery of new sulfonamide-tethered 2-aryl-4-anilinoquinazolines as the first-in-class dual carbonic anhydrase and EGFR inhibitors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, p. 135010, 2024.

EL GUERRAB, Abderrahim et al. Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, p. 73618, 2016.

EVREN, Asaf Evrim et al. Pharmacophore-based modeling, synthesis, and biological evaluation of novel quinazoline/quinoline derivatives: discovery of EGFR inhibitors with low nanomolar activity. **Advanced Theory and Simulations**, v. 8, n. 1, p. 2400811, 2025.

FEMINA, T. Arokia et al. Non-uniformity in in vitro drug-induced cytotoxicity as evidenced by differences in IC50 values—implications and way forward. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 119, p. 107238, 2023.

FERREIRA, Elizabeth I.; BARREIRO, Eliezer J.; GIAROLLA, Jeanine; et al. Fundamentos de química farmacêutica medicinal. Barueri: Manole, 2022. E-book. p.89. ISBN 9786555762600. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786555762600/>. Acesso em: 26 dez. 2025.

FERLAY, J. et al. **Cancer Today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.who.int/today>>. Acesso em: 27 jun. 2025.

FRANCO, Larissa Moura de Matos. Estudos in silico e in vitro de KDYs como Candidato a Fármaco Anticâncer para Glioblastoma e Câncer de Mama. Orientador: Prof. Dr. João Eustáquio Antunes. 2025. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, 2025.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-194, 2009

FOLLY, Mariany Lopes da Costa. Avaliação do Efeito Antitumoral de Derivados de Quinazolininas em Células de Glioblastoma. Orientador: Prof.(a) Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes. 2024. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, 2024.

GAD, Shayne C. et al. Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species. **International journal of toxicology**, v. 25, n. 6, p. 499-521, 2006.

GAO, Wenjuan et al. Biosynthetic MnSe nanobomb with low Mn content activates the cGAS-STING pathway and induces immunogenic cell death to enhance antitumour immunity. **Acta Biomaterialia**, v. 184, p. 383-396, 2024.

GARCÍA-ARANDA, M.; REDONDO, M. Protein Kinase Targets in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2543, 2017.

GATTI-MAYS, Margaret E. et al. If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. **NPJ breast cancer**, v. 5, n. 1, p. 37, 2019.

GHEYSEN, Mathilde et al. Oral SERDs changing the scenery in hormone receptor positive breast cancer, a comprehensive review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 130, p. 102825, 2024.

GIORELLO, M. B. et al. Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 26, p. 135-155, 2021.

HABANJAR, O. et al. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 4002, 2023.

HAIT, William N.; RUBIN, Eric; BERTINO, Joseph R. Cancer therapeutics. In: CRAIG, T. (Ed.). **The Molecular Basis of Cancer**. Philadelphia, PA: Saunders, 2015. p. 635–650.

HASHEM, H. E. Synthesis of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives. **IntechOpen eBooks**, 27 abr. 2020.

HEALY, M. Understanding Your Pathology Report: Breast Cancer | OncoLink. Disponível em: <<https://www.oncolink.org/cancers/breast/screening-diagnosis/understanding-your-pathology-report-breast-cancer>>.

HEKAL, M.; EL-AZM, F. New potential antitumor quinazolinones derived from dynamic 2-undecyl benzoxazinone: Synthesis and cytotoxic evaluation. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 20, p. 2391-2402, 2018.

HERRMANN, Joerg et al. **Cancer therapeutic drug guide**. In: Cardio-Oncology Practice Manual: A Companion to Braunwald's Heart Disease. Elsevier, 2023. p. 451-506.

HOLICEK, Peter et al. Type I interferon and cancer. **Immunological Reviews**, v. 321, n. 1, p. 115-127, 2024.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714-726, 2013.

HOU, Hsien-San et al. Determination of Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC50) of Drugs Using Contrast Surface Plasmon Imaging on Gold-Coated Periodic Nanowires. **Analytical Chemistry**, v. 97, n. 38, p. 20817-20824, 2025.

IBARROLA-VILLAVA, M.; CERVANTES, A.; BARDELLI, A. Preclinical models for precision oncology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, 2018.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em: 27 jun. 2025.

Trastuzumabe e pertuzumabe: anticorpos monoclonais para tratamento de câncer de mama HER2+. / Irene von der Weid [Et al.] – Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Brasil.) – INPI. Diretoria de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados. Coordenação-Geral de Estudos, Projetos e Disseminação de Informação Tecnológica. Divisão de Estudos e projetos. Rio de Janeiro: INPI, agosto 2024.

KAUR, R. et al. Breast cancer preclinical models: a vital resource for comprehending disease mechanisms and therapeutic development. **EXCLI Journal**, v. 24, p. 267-285, 2025.

KHAN, I.; IBRAR, A.; AHMED, W.; SAEED, A. Synthetic approaches, functionalization and therapeutic potential of quinazoline and quinazolinone skeletons: the advances continue. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 124-169, 2015.

Kim, J., Harper, A., McCormack, V. *et al.* Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. **Nat Med** **31**, 1154–1162 (2025).

KING, J.; MIR, H.; SINGH, S. Association of cytokines and chemokines in pathogenesis of breast cancer. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 151, p. 113-136, 2017.

KROEMER, G. *et al.* Immunosurveillance in clinical cancer management. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 2, p. 187-202, 2024.

KUMAR, D. *et al.* Design, synthesis and cytotoxic evaluation of novel imidazolone fused quinazolinone derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 344-350, 2017.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-1134, 2010.

LI, J. J.; TSANG, J. Y.; TSE, G. M. Tumor Microenvironment in Breast Cancer-Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment. **Cancers**, v. 13, n. 16, p. 4233, 2021.

LI, Xiyin *et al.* Challenges and prospects in HER2-positive breast cancer-targeted therapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 207, p. 104624, 2025.

LI, Joshua J.; TSANG, Julia Y.; TSE, Gary M. Tumor microenvironment in breast cancer—updates on therapeutic implications and pathologic assessment. **Cancers**, v. 13, n. 16, p. 4233, 2021.

LI, Yue *et al.* Structural Modification of Gefitinib with 1, 2, 3-Triazole Hybrids and Evaluation of Their Anti-Breast Cancer Activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 9, 2026.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacological Reviews*, v. 49, n. 4, p. 403-449, 1997.

LIN, Ren-Jie *et al.* Design, synthesis and anti-tumor evaluation of novel pyrimidine and quinazoline analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 282, p. 117057, 2025.

LIU, Changqun *et al.* Hybridization-based discovery of novel quinazoline-2-indolinone derivatives as potent and selective PI3K α inhibitors. **Journal of Advanced Research**, v. 68, p. 459-475, 2025.

MARTORANA, A. *et al.* Antiproliferative Activity Predictor: A New Reliable In Silico Tool for Drug Response Prediction against NCI60 Panel. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14374, 2022.

MASTRIA, Eric M. et al. Nanoparticle formulation improves doxorubicin efficacy by enhancing host antitumor immunity. **Journal of Controlled Release**, v. 269, p. 364-373, 2018.

MEDSCAPE. *Breast cancer overview*. [S. l.], [20--]. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/2007112-overview>. Acesso em: 7 jun. 2025.

MEHLICH, Dawid; MARUSIAK, Anna A. Kinase inhibitors for precision therapy of triple-negative breast cancer: Progress, challenges, and new perspectives on targeting this heterogeneous disease. **Cancer Letters**, v. 547, p. 215775, 2022.

MISKI, Hanna et al. HER2-Positive Breast Cancer—Current Treatment Management and New Therapeutic Methods for Brain Metastasis. **Biomedicines**, v. 13, n. 5, p. 1153, 2025.

MOAWAD, Emad Y. Clinical and pathological staging of the cancer at the nanoscale. **Cancer nanotechnology**, v. 3, n. 1, p. 37-46, 2012.

MOCTEZUMA-RAMÍREZ, A. et al. Designing an In Vivo Preclinical Research Study. **Surgeries**, v. 4, n. 4, p. 544-555, 2023.

MORADI, M. et al. Quinazoline-based VEGFR-2 inhibitors as potential anti-angiogenic agents: A contemporary perspective of SAR and molecular docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 259, p. 115626, 2023.

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

NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, p. 1-8, 2020.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (EUA). *Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes*. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>. Acesso em: [11 de setembro de 2025].

NÖEL F. Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). (2019, dezembro). Hit & Lead: Conceitos básicos em descoberta e desenvolvimento de fármacos [Apresentação de slides]. SBFTE. Disponível em: https://sbfte.org.br/wp-content/uploads/2019/12/13.-Hit_Lead.pdf Acesso: janeiro de 2026.

ORRANTIA-BORUNDA, E. et al. **Subtypes of Breast Cancer**. In: Mayrovitz HN, editor. Breast Cancer [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>>.

PARK, M. K.; LEE, C. H.; LEE, H. Mouse models of breast cancer in preclinical research. **Lab Animal Research**, v. 34, n. 4, p. 160-165, 2018.

PARK, Woong Ki et al. Long-term oncologic outcomes of unselected triple-negative breast cancer patients according to BRCA1/2 mutations. **npj Precision Oncology**, v. 8, n. 1, p. 96, 2024.

PATEL, Rima et al. An emerging generation of endocrine therapies in breast cancer: a clinical perspective. **NPJ Breast Cancer**, v. 9, n. 1, p. 20, 2023.

PILCO-FERRETO, Nesstor; CALAF, Gloria M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **International journal of oncology**, v. 49, n. 2, p. 753-762, 2016.

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. *PDQ Breast Cancer Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2025. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>. Acesso em: 25 jul. 2025.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 20.2.1-20.2.16, 2000.

PURNOMOSARI, Dewajani et al. Targeting immune cells in tumor microenvironment in triple negative breast cancer therapy: future perspective to overcome doxorubicin resistance and toxicity. **Medical Oncology**, v. 42, n. 5, p. 150, 2025.

QIU, S. Q. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? **Cancer Treatment Reviews**, v. 70, p. 178-189, 2018.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

RIAZ, Fauzia; GRUBER, Joshua J.; TELLI, Melinda L. New Treatment Approaches for Triple-Negative Breast Cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 45, n. 3, p. e481154, 2025.

ROLAND AKINSEYE, O. Role of Protein Kinases in Cellular Signaling. **IntechOpen**, 2024.

SALEMME, V. et al. The Crosstalk between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 610303, 2021.

SANTOS, Harryson WG et al. Expression Profile of IL-2, IL-6, IL-10, and TNF- α in Breast Tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 16, p. 7841, 2025.

SANTOS, M. O. et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

SCHRÖRS, B. et al. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1195, 2020.

SHAFEI, A. et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1209-1218, 2017.

SHAGUFTA; AHMAD, I. An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents. **MedChemComm**, v. 8, n. 5, p. 871-885, 2017.

SHEIBANI, M. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. **Cardiovascular Toxicology**, v. 22, p. 292-310, 2022.

SHIGEHIRO, T. et al. Immune State Conversion of the Mesenteric Lymph Node in a Mouse Breast Cancer Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11035, 2022.

SCHÜTZ, Florian et al. PD-1/PD-L1 pathway in breast cancer. **Oncology research and treatment**, v. 40, n. 5, p. 294-297, 2017.

SILVA, Antero V. et al. Associations between clinical signs and pathological findings in toxicity testing. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 38, n. 2, p. 198-214, 2021.

SILVA, E. V. S. et al. Elucidating tumor immunosurveillance and immunoediting: a comprehensive review. **Ciência Animal Brasileira**, v. 22, p. e-68544, 2021.

SINGH, S. S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. *Current Drug Metabolism*, v. 7, n. 2, p. 165-182, 2006. DOI: 10.2174/138920006776359286.

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Diretrizes de tratamentos oncológicos. Mama: estadiamento. 2021. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/11145/1/Diretriz%20SBOC%202021.pdf>. Acesso em 19 de setembro de 2025.

TANG, Qing et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 964442, 2022.

TOWER, H.; RUPPERT, M.; BRITT, K. The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1375, 2019.

TRAYES, Kathryn P.; COKENAKES, Sarah EH. Breast cancer treatment. **American family physician**, v. 104, n. 2, p. 171-178, 2021.

VAN ASBROECK, Birgit et al. Distinct Impact of Doxorubicin on Skeletal Muscle and Fat Metabolism in Mice: Without Dexrazoxane Effect. **International journal of molecular sciences**, v. 26, n. 3, p. 1177, 2025.

VIEIRA, João Paulo de Jesus et al. Effect of Ageratum fastigiatum on Viability, Migration and Proliferation of Breast Cancer Cells in 2D and 3D Culture Models. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-20, 2026.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast cancer treatment: a review. **Jama**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019.

WAN, Xiaoqing et al. Estrogen receptor α mediates doxorubicin sensitivity in breast cancer cells by regulating E-cadherin. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 583572, 2021.

WANG, J.; WU, S. G. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 15, p. 721-730, 2023.

WDOWIAK, Paulina et al. Quinazoline derivatives as potential therapeutic agents in urinary bladder cancer therapy. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 765552, 2021.

WELSH, J. Chapter 40 - Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. In: CONN, M. (Ed.). **Animal Models for the Study of Human Disease**. Boston (Massachusetts): Academic Press, 2013. p. 997–1018.

WITT, B. L.; TOLLEFSBOL, T. O. Molecular, cellular, and technical aspects of breast cancer cell lines as a foundational tool in cancer research. **Life**, v. 13, n. 12, p. 2311, 2023.

XIONG, X. et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, p. 49, 2025.

YUAN, S. J. et al. Doxorubicin-polyglycerol-nanodiamond conjugate is a cytostatic agent that evades chemoresistance and reverses cancer-induced immunosuppression in triple-negative breast cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 110, 2019.

YOSEFI, Sedighe et al. Combinatorial Effects of Chrysin with Doxorubicin, 5-Fluorouracil, and Cyclophosphamide on Triple-Negative Breast Cancer Cell Line. **IJ Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 1, 2025.

ZAGAMI, Paola; CAREY, Lisa Anne. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **NPJ breast cancer**, v. 8, n. 1, p. 95, 2022.

ZAYED, M. F. Medicinal Chemistry of Quinazolines as Anticancer Agents Targeting Tyrosine Kinases. **Scientia Pharmaceutica**, v. 91, n. 2, p. 18, 2023.

ZENG, S. et al. An assessment of breast cancer HER2, ER, and PR expressions based on mammography using deep learning with convolutional neural networks. **Scientific Reports**, v. 15, p. 4826, 2025.

ZENG, Z. et al. TISMO: syngeneic mouse tumor database to model tumor immunity and immunotherapy response. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D1391-D1397, 2022.

ZHANG, F. et al. Differentiation of reactive and tumor metastatic lymph nodes with diffusion-weighted and SPIO-enhanced MRI. **Molecular Imaging and Biology**, v. 15, n. 1, p. 40-47, 2013.

ZHANG, Y. et al. Establishment of a murine breast tumor model by subcutaneous or orthotopic implantation. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 6233-6240, 2018.

ZHOU, Z. et al. Phosformer: an explainable transformer model for protein kinase-specific phosphorylation predictions. **Bioinformatics**, v. 39, n. 2, p. btad046, 2023.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA
DIAMANTINA – MG

CERTIFICADO

Teófilo Otoni, 19 de setembro de 2024.

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO *IN VIVO* PARA AVALIAR A AÇÃO ANTITUMORAL DE KDY3 E KDY23 EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER DE MAMA", registrada com o nº 01-2024 R, sob a responsabilidade de Sandra Bertelli Ribeiro de Castro - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-Mucuri/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 41ª Reunião Ordinária, no dia 18 de setembro de 2024.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/11/2024 a 01/11/2026
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	126
Peso/Idade	22g / 6 a 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA-Mucuri/UFVJM durante a vigência do projeto.

Com o recebimento deste Certificado, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA-Mucuri/UFVJM.

Ernani Aloysio Amaral

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-Mucuri/UFVJM



Documento assinado eletronicamente por **Ernani Aloysio Amaral, Coordenador(a)**, em 20/09/2024, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).