



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Atividades biológicas de um complexo de cobre(II) contendo β -dicetona e
1,10-fenantrolina: citotoxicidade, genotoxicidade, toxicidade aguda e
propriedade antitumoral**

Discente: Lorena Polloni

Orientador: Prof. Dra. Sandra Morelli

Co-orientador: Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

Uberlândia-MG

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Atividades biológicas de um complexo de cobre(II) contendo β -dicetona e
1,10-fenantrolina: citotoxicidade, genotoxicidade, toxicidade aguda e
propriedade antitumoral**

Discente: Lorena Polloni

Orientador: Profa. Dra. Sandra Morelli

Co-orientador: Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção
do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica
(Área Genética).**

Uberlândia-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P777a Polloni, Lorena, 1993
2017 Atividades biológicas de um complexo de cobre(II) contendo β -dicetona e 1,10-fenantrolina: citotoxicidade, genotoxicidade, toxicidade aguda e propriedade antitumoral / Lorena Polloni. - 2017.
85 f. : il.

Orientadora: Sandra Morelli.
Coorientador: Robson José de Oliveira Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.734>
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Cobre - Teses. 3. Apoptose - Teses. 4. Tumores - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Oliveira Júnior, Robson José de, 1984. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Atividades biológicas de um complexo de cobre(II) contendo β -dicetona e
1,10-fenantrolina: citotoxicidade, genotoxicidade, toxicidade aguda e
propriedade antitumoral**

Discente: Lorena Polloni

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Sandra Morelli

Examinadores: _____

Data da defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas

Profa. Dra. Sandra Morelli

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton.

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, Luiz Sergio
Polloni e Aparecida Genoveva Silingardi Polloni, que sempre
estiveram me apoiando e me incentivando a alcançar meus sonhos.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte e apoio financeiro.

À Deus por toda força, sabedoria e proteção concedida a mim que proporcionou a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Aos meus anjos, meus amados pais, Luiz Sergio Polloni e Aparecida Genoveva Silingardi Polloni, por todo amor, dedicação, por todos finais de semana me ajudando no laboratório, por todo suporte e por todas as palavras sábias que me deram forças para continuar essa jornada árdua. Obrigada por me ensinarem a trilhar meu caminho.

Aos meus fiéis escudeiros, meus queridos irmãos, Lorraine Cristina Polloni e Luiz Paulo Polloni, pelo companheirismo, por todo carinho e por toda ajuda nos finais de semana no laboratório, por todos os conselhos e brincadeiras que tornaram essa jornada mais alegre.

Ao meu cunhado, Heber Leão Barros pela paciência e ensinamentos nos ensaios *in vivo*, obrigada pela sua dedicação.

Aos amigos de jornada, Ana Carolina, Samuel, Adriele, Douglas, Victor, Isadora, Bruna, Danyelle, Edgar, Mariana e Fernanda que concederam parte do seu conhecimento e tempo para me auxiliar nos experimentos que enriqueceram meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Wendell Guerra e sua aluna Janaína do Couto Almeida que sintetizaram e forneceram o complexo de cobre para nossa pesquisa.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Sandra Morelli e o Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior, pela oportunidade concedida, confiança depositada, ensinamentos transmitidos, pelo acompanhamento e orientação durante todo o trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem este trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer todos que de alguma maneira fizeram parte dessa jornada, tornando-a mais inesquecível.

Resumo

O uso de compostos metálicos como fármacos vem ganhando destaque desde a descoberta da cisplatina e na tentativa de encontrar complexos mais seguros e efetivos, vários compostos tendo como base metais essenciais têm sido sintetizados. O uso dos metais essenciais é justificado por eles estarem presentes nos organismos vivos participando de diversos processos biológicos. Dentre os elementos traços destaca-se o cobre, que é considerado um metal redox ativo, o que possibilita a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo esta considerada sua principal função. Além disso, o cobre é encontrado em maiores concentrações nas células tumorais, quando comparado com as células normais, tornando-o assim um metal essencial vantajoso para ser estudado. Diversos estudos demonstraram que complexos de cobre possuem a capacidade de clivar a molécula de DNA, instigando assim a síntese e caracterização de novos complexos a base de cobre(II) como o $[\text{Cu}(\text{BTA})\text{phen}]\text{ClO}_4$, estudado no presente trabalho. O complexo $[\text{Cu}(\text{BTA})\text{phen}]\text{ClO}_4$ apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Além disso, o complexo apresentou seletividade perante as células tumorais testadas *in vitro*. O mecanismo de ação pode estar relacionado com a reação redox do composto, que ocasiona a produção de ROS, auxiliando a ação direta ou indireta do complexo sobre o DNA, promovendo assim, o aprisionamento das células tumorais na fase G0/G1 e, conseqüentemente, a indução da morte celular. Evidências mostraram que a morte celular é iniciada pela disfunção da autofagia, culminando na indução da apoptose. Os ensaios *in vivo* mostraram que o complexo apresentou potencial atividade de agente antitumoral, a partir da redução do volume do tumor sólido em proporções similares à cisplatina. Vale ressaltar que o complexo $[\text{Cu}(\text{BTA})\text{phen}]\text{ClO}_4$ apresentou menor toxicidade durante o tratamento quando comparado com a cisplatina, sendo esse fato evidenciado pela perda de peso observada no grupo tratado com a cisplatina. Portanto, o complexo em estudo pode ser considerado um promissor agente antitumoral.

Palavras-chave: complexo de cobre(II), ROS, apoptose, autofagia, redução tumoral.

Abstract

The use of metal compounds as therapeutic drugs has gained prominence since the discovery of cisplatin. In the attempt to find safe and more effective drugs, several metal based-drugs have been synthesized as potential antitumor agents. The use of the essential metals is justified because they are present in living organisms, participating in various biological processes. Among the trace elements it is found the copper, which is considered an active redox metal that makes it possible the production of reactive oxygen species (ROS), which is considered its main function. In addition, copper is found at higher concentrations in tumor cells when compared to normal cells, which makes it an advantageous essential metal for new drugs development. Several studies have demonstrated that the complexation of copper with other ligands has provided the ability to cleave the DNA molecule, thus instigating the synthesis and characterization of new copper(II)-based complexes such as [Cu(BTA)phen]ClO₄, evaluated in the present work. The [Cu(BTA)phen]ClO₄ complex showed *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. The mechanism of action of the complex is related to the redox reaction of the compound, which causes the production of ROS, aiding the direct or indirect action of the complex on the DNA, promoting the entrapment of the tumor cells in the G0/G1 phase and, consequently, inducing cell death. Evidences have shown that cell death is initiated by autophagy dysfunction, culminating in the induction of apoptosis. It was also observed that the complex under display selectivity to the tumor cells tested *in vitro*. Besides, *in vivo* assays showed that the complex possess potential antitumor, once that it reduce solid tumor volume in proportions very similar to cisplatin. It is noteworthy that the [Cu(BTA)phen]ClO₄ complex presented lower toxicity during treatment when compared to cisplatin, which is evidenced by the weight loss observed in the cisplatin treated group. Therefore, the complex under study may be considered a promising antitumor agent.

Keywords: copper(II) complex, ROS, apoptosis, autophagy, tumor reduction.

Lista de figuras e tabelas

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ilustração da disposição das células nos tumores benignos e malignos..... | 03 |
| Figura 2. Estrutura química dos representantes das diferentes classes de quimioterápicos..... | 10 |
| Figura 3. Representação dos modos de interação com o DNA..... | 14 |
| Figura 4. Mecanismo de ação da cisplatina..... | 16 |
| Figura 5. Estruturas representativas dos compostos pertencentes à família das Casiopéinas® | 20 |
| Figura 6. Representação da estrutura química proposta para o complexo metálico Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ | 21 |
| Figura 7. Esquema experimental do ensaio de toxicidade do complexo Cu(BTA)(phen)ClO ₄ utilizado para calcular a dose letal..... | 31 |
| Figura 8. Curva concentração-dependente da viabilidade celular das linhagens..... | 34 |
| Figura 9. Curva concentração-dependente da viabilidade celular da linhagem Sarcoma 180, tratadas com Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ e em associação com N-acetilcisteína (NAC)..... | 35 |
| Figura 10. (A) Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrados nas células binucleadas após tratamento com Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ . (B) e (C) – Imagens representativas de micronúcleos encontrados em células binucleadas no tratamento Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ 1 µM e no controle positivo (Colchicina), respectivamente..... | 36 |
| Figura 11. Gráfico representativo da distribuição das células em cada fase do ciclo celular após tratamento de 12 h e 24 h com o complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ na linhagem sarcoma 180..... | 37 |
| Figura 12. Imagem representativa das células de sarcoma 180 (A) tratadas com 50 µM de Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ (célula com corpos apoptóticos apontada pela seta e evidenciada) e (B) do controle não tratado..... | 38 |
| Figura 13. (A) Citogramas de anexina V PE e 7AAD de células sarcoma 180 após serem tratadas por 24 h com Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ . (B) Gráfico representativo da porcentagem de células em necrose, apoptose inicial e apoptose tardia..... | 39 |
| Figura 14. Imagem representativa da ação autofágica do complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ perante a linhagem tumoral sarcoma 180..... | 40 |
| Figura 15. (A) Gráfico representativo da produção de ROS em células viáveis (7AAD -) e (B) mortas (7AAD +). (C) controle não tratado, células tratadas com Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ a (D) 1 µM, (E) 10 µM e (F) 50 µM..... | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Efeitos observados <i>in vivo</i> após o tratamento do tumor sólido sarcoma 180 com o complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ | 44 |
| Figura 17. Efeitos colaterais associados a porcentagem de perda de peso dos camundongos tratados com diferentes doses do complexo metálico Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ | 45 |
| Figura 18. Diagrama esquemático representando os danos celulares induzidos pelo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ | 56 |
| | |
| Tabela 1. Drogas a base de platina que foram aprovadas para utilização no tratamento de pacientes com câncer em pelo menos um país..... | 17 |
| Tabela 2. Valores de IC ₅₀ (μM) e índices de seletividade (IS) calculados para o complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ | 33 |

Lista de abreviaturas

7-AAD - 7- aminoactinomicina D

BTA - 4,4,4-trifluor-1-fenil-1,3-butanodiona

C2C12 - mioblasto murino

CBP-01 (Cu(BTA)(phen)ClO₄) - complexo de cobre(II) (4,4,4-trifluor-1-fenil-1,3-butanodiona)(1,10-fenantrolina)

Cyt-B - citocalasina-B

DCF - 2',7' diclorofluoresceína

DCFH-DA - 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína

DL₅₀ - Dose letal mediana

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Ehrlich - adenocarcinoma mamário murino

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HeLa - tumor cervical humano

HO• - radical hidroxil

IARC - Agência Internacional para pesquisa em Câncer

IC₅₀ - Concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IP - intraperitoneal

IS - índice de seletividade

MDC - monodansilcadaverina

NAC - N-acetilcisteína

O₂^{•-} - anion superóxido

Phen - 1,10-fenantrolina

PI - iodeto de propídio

PS - fosfatidilserina

ROS - espécies reativas de oxigênio

TG180 - sarcoma murino

VTR - volume relativo do tumor

WHO - Organização Mundial da Saúde

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 Epidemiologia evidenciando a importância dos estudos sobre câncer | 1 |
| 1.2 Câncer: definições e etiologia | 2 |
| 1.3 Tratamentos do câncer | 7 |
| 1.3.1 Quimioterapia – Classificação dos antineoplásicos | 9 |
| 1.3.2 Complexos metálicos no tratamento oncológico..... | 13 |
| 1.4 <i>Screening</i> de compostos antitumorais à base de metais | 16 |
| 1.4.1 Potencial farmacológico de complexos de cobre(II)..... | 17 |
| 1.4.2 Complexo de cobre associado a β -dicetona e 1,10-fenantrolina | 20 |
| 2. Objetivos..... | 22 |
| 2.1 Objetivo geral | 22 |
| 2.2 Objetivos específicos | 22 |
| 3. Metodologia | 23 |
| 3.1 Testes <i>in vitro</i> | 23 |
| 3.1.1 Manutenção das linhagens celulares..... | 23 |
| 3.1.2 Avaliação de atividade citotóxica pelo método Alamar Blue | 24 |
| 3.1.3 Índice de seletividade (IS)..... | 25 |
| 3.1.4 Avaliação da citotoxicidade do Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ em associação com o antioxidante NAC utilizando Alamar Blue..... | 26 |
| 3.1.5 Avaliação de atividade genotóxica pelo teste de micronúcleo | 26 |
| 3.1.6 Análise do ciclo celular por iodeto de propídeo (PI)..... | 27 |
| 3.1.7 Ensaio de apoptose | 28 |
| 3.1.8 Teste de Autofagia..... | 28 |
| 3.1.9 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS)..... | 29 |
| 3.2 Testes <i>in vivo</i> | 30 |
| 3.2.1 Manutenção dos animais | 30 |
| 3.2.2 Determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀)..... | 30 |
| 3.2.3 Determinação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> | 31 |
| 3.3 Análises estatísticas..... | 32 |
| 4. Resultados..... | 32 |
| 4.1 Avaliação da citotoxicidade do complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vitro</i> ... | 32 |
| 4.2 Avaliação da citotoxicidade do Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ em associação com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) <i>in vitro</i> | 34 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.3 | Avaliação da genotoxicidade do Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ pelo teste de micronúcleo <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.4 | Avaliação da atividade antiproliferativa do Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vitro</i> .. | 36 |
| 4.5 | Avaliação da indução de apoptose pelo complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vitro</i> | 37 |
| 4.6 | Avaliação de indução de autofagia pelo complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vitro</i> | 39 |
| 4.7 | Avaliação da produção de ROS pelo composto Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.8 | Avaliação da toxicidade do complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vivo</i> | 42 |
| 4.9 | Avaliação da redução tumoral do complexo Cu(BTA)(Phen)ClO ₄ <i>in vivo</i> | 44 |
| 5. | Discussão | 45 |
| 6. | Conclusões | 54 |
| 7. | Referências..... | 57 |

1. Introdução

1.1 Epidemiologia evidenciando a importância dos estudos sobre câncer

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, e segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) foram relatados em 2012 cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de óbitos por câncer. Esses dados mundiais deverão aumentar para 22 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes por ano nas próximas duas décadas. Dentre os vários tipos de câncer, os mais comuns foram os de pulmão (1,8 milhões de novos casos), de mama (1,7 milhões), intestino grosso (1,4 milhões) e próstata (1,1 milhão). Na população masculina os cânceres com maior incidência foram de pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%), enquanto que na feminina, os mais frequentes foram os de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (IARC/WHO, 2012).

No Brasil, os dados obtidos entre 2014 e 2015 pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), apontaram para a ocorrência de 576 mil novos casos de câncer, levando em consideração os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2014). De acordo com as estimativas de 2016 e 2017 podemos observar um aumento de novos casos de câncer para 596 mil, se não considerarmos os casos de câncer de pele (aproximadamente 180 mil), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Na população masculina brasileira, os tipos mais frequentes de câncer serão o de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Já na população feminina brasileira, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) apresentarão maior frequência (INCA, 2015).

Nota-se que tanto os índices brasileiros, quanto os mundiais apresentam os tipos mais prevalentes de câncer derivados de populações de células que se dividem ativamente, como por exemplo, células epiteliais do intestino, dos pulmões ou da glândula prostática. E os casos mais raros são aqueles oriundos

de populações celulares que tipicamente não se dividem, como as células diferenciadas musculares ou nervosas (SNUSTAD e SIMMONS, 2010).

Com base nessas estatísticas sobre a incidência e mortalidade do câncer, é possível ressaltar a necessidade de desenvolvimento de tratamentos eficazes para conter essa doença.

1.2 Câncer: definições e etiologia

A replicação e divisão do genoma é realizado com alta fidelidade e precisão, e por isso as taxas de mutações endógenas nas células somáticas são baixas ($0,77 \times 10^{-9}$ por divisão celular local), assim como as taxas de erro na segregação cromossômica, sendo de 1 erro a cada 100 divisões (BURREL *et al.*, 2013). Entende-se por mutação toda e qualquer mudança que ocorra na sequência do DNA, englobando diferentes tipos de alterações que variam de uma simples troca de um par de base por outro, até o desaparecimento de um cromossomo inteiro (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

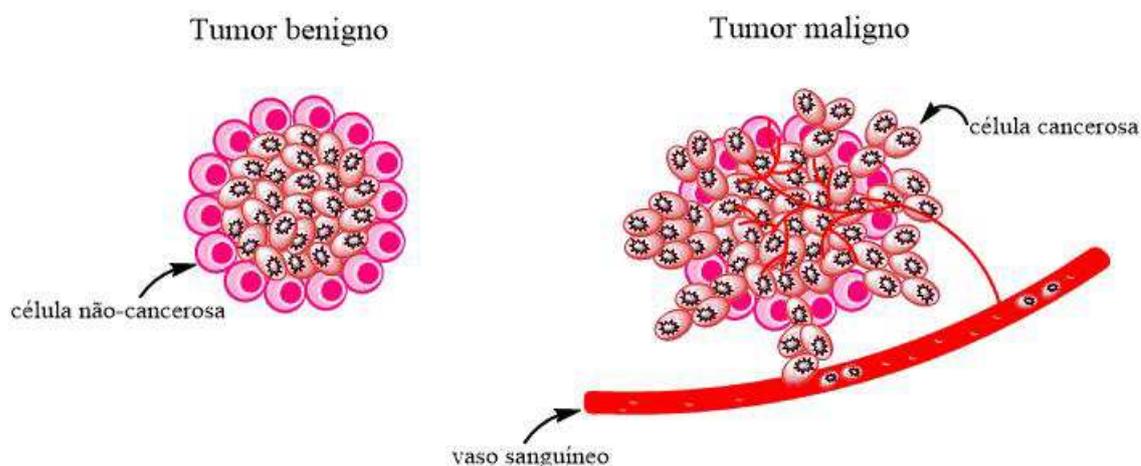
O aumento das taxas de mutações endógenas pode estar relacionado com exposição de mutágenos exógenos e/ou disfunções nos mecanismos que mantêm a integridade genômica (BURREL *et al.*, 2013), resultando no mau funcionamento das células. Visto que, alterações presentes no material genético das células irão produzir proteínas alteradas em quantidade e/ou função, de modo que, se essas proteínas estiverem relacionadas com fatores críticos para o desenvolvimento das células, como por exemplo, a divisão celular, elas estimularão a divisão incontrolável das mesmas (AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2014). Essa proliferação anormal das células num tecido ou órgão é denominada neoplasia, que vem do grego e significa “novo crescimento”. Devido a esse crescimento descontrolado ocorre o empilhamento das células, que perderam suas características iniciais, formando assim uma massa anormal de tecido conhecido como tumor (BOYLE e LEVIN, 2008).

Os tumores podem ser classificados em benignos e malignos (Figura 1), dos quais nos tumores benignos as células neoplásicas permanecem agrupadas numa única massa celular, apresentando proliferação expansiva que provoca a compressão dos tecidos vizinhos (THULLER, 2012). Outra peculiaridade dos

tumores benignos é que eles têm semelhanças com as células dos tecidos que lhes deram origem. Além disso, possuem um lento crescimento (GADELHA *et al.*, 2014).

Os tumores malignos têm como característica a capacidade de suas células se desprenderem da massa inicial e de migrarem, acometendo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático, originando outros focos tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2005). Esse processo resulta na formação de metástases no organismo, no qual células neoplásicas se desenvolvem sem continuidade e sem dependência do foco primário, devido sua capacidade invasivo/destrutiva. Por apresentarem rapidez e desorganização da proliferação os tumores malignos não possuem as características das células que os originaram (GADELHA *et al.*, 2014).

Figura 1. Ilustração da disposição das células nos tumores benignos e malignos (Fonte: Autoria própria)



Um fenômeno essencial para o desenvolvimento do tumor maligno e das metástases, originadas a partir dele, é a angiogênese, ou seja, o surgimento de novos vasos sanguíneos que podem penetrar no tumor ou serem periféricos (ROCHA, 2013). O processo de angiogênese ocorre a partir da migração, proliferação e diferenciação de células endoteliais, sendo controlado por sinais químicos pró-angiogênicos (SAGHIRI *et al.*, 2015). Existem diversos fatores pró-angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de

necrose tumoral α (TNF), interleucina 8, angiogina, entre outros. Porém, a família VEGF e seus receptores (VEGFR) são os fatores pró-angiogênicos mais relevantes na tumorigênese, uma vez que o aumento na expressão dos mesmos está diretamente relacionado com a condição de hipóxia resultante da escassa presença de vasos sanguíneos. Condição essa perceptível quando as células tumorais atingem 1-2 mm³, em que se faz necessário a ativação da angiogênese para proporcionar a continuação do seu crescimento, sendo assim, elas estimulam a liberação de mais fatores pró-angiogênicos e reduzem aqueles que inibem a angiogênese (como por exemplo a angiostatina que tem como uma das suas funções inibir a síntese de VEGF) (NISHIDA *et al.*, 2006). Essas condições permitem a iniciação do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos possibilitando a obtenção de oxigênio e nutrientes para a sobrevivência e desenvolvimento das células tumorais (SAGHIRI *et al.*, 2015). Caso não ocorra a formação de novos vasos sanguíneos os tumores param de se desenvolver, atingindo no máximo 2 mm³, e adquirem característica necrótico ou até mesmo apoptótico (NISHIDA *et al.*, 2006).

O termo câncer, utilizado como sinônimo de tumor maligno, é designado para um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2014). A carcinogênese ou oncogênese (processo de formação do câncer), geralmente, ocorre lentamente, podendo levar anos entre a proliferação das células cancerosas e a formação de uma massa tumoral visível. O progresso gradual da oncogênese está relacionado com o acúmulo de diferentes agentes cancerígenos (ou carcinógenos), sendo responsáveis pela iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação é caracterizado pela alteração de alguns genes pelos agentes cancerígenos. No estágio de promoção as células geneticamente alteradas sofrem ação de agentes oncopromotores. E no estágio de progressão é caracterizado pela proliferação descontrolada e irreversível das células alteradas (THULLER, 2012).

Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e tipos celulares que os originou, no qual o sufixo *-oma* significa literalmente tumor. Como por exemplo, o carcinoma (derivados de células epiteliais) que incluem o revestimento interno da boca, estômago, intestino, útero, próstata, entre outros; sarcoma

(tecido conectivo ou células musculares) origina-se de ossos, tecido fibroso, músculo entre outros; linfomas (células hematopoiéticas); leucemia (células da medula óssea que produzem as células brancas); mieloma (células plasmáticas da medula óssea); melanomas (células da pele – melanócitos); e gliomas (células do tecido de suporte cerebral ou medula espinhal) (ALMEIDA *et al*, 2005).

Os tumores, tanto benignos quanto malignos, são doenças genéticas cujas mutações que lhes dão origem podem ser de causas extrínsecas ou intrínsecas, podendo ambas estar inter-relacionadas. Compreende-se por causas extrínsecas, aquelas relacionadas ao meio ambiente como as substâncias químicas, irradiação, infecções crônicas e fatores comportamentais (THULLER, 2012). Elas podem causar disfunções no DNA ou exacerbar aquelas previamente existentes (SNUSTAD e SIMMONS, 2010). Segundo Thuller (2012), cerca de 80% a 90% dos casos de câncer estão associados a fatores ambientais.

As causas intrínsecas estão associadas com fatores genéticos, os quais na maioria das vezes, são pré-determinados ou estão relacionados à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (THULLER, 2012). A relação entre as alterações genéticas e o surgimento do câncer é explicada pelas mutações pontuais e cromossômicas. Na mutação pontual há alteração de um único par de base do DNA ou de um pequeno número de pares de bases adjacentes. Já a mutação cromossômica está relacionada com grandes variações na estrutura cromossômica ou no número de cópias de cromossomos em uma célula (GRIFFITHS *et al.*, 2013). Em linhas gerais, podemos dizer que as causas intrínsecas desencadeiam mutações que ocorrem na sequência do DNA que envolvem substituições, inserções, translocações, ou deleções de pequenos ou grandes fragmentos de DNA, amplificação genômica, rearranjos cromossômicos e ganho ou perda de segmentos ou de todo cromossomo (BURREL *et al.*, 2013).

Acredita-se que o DNA humano contém cerca de 23.000 genes, e destes milhares (3.000 – 5.000) codificam proteínas envolvidas na tumorigênese, as quais nesse processo encontram-se desreguladas (BOYLE e LEVIN, 2008). Tendo como exemplo, os genes que controlam a proliferação celular: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes normalmente encontram-se inativados nas células e só estão ativos quando recebem sinais de regulação apropriados. Porém quando sofrem alterações esses genes

apresentam ativação constitutiva, ou seja, se transformam em oncogenes que tem a capacidade de induzir a proliferação descontrolada da célula. Os genes supressores tumorais codificam reguladores negativos que tem como funções a redução da proliferação celular, reparo de erros no DNA e indução da apoptose. Mutações nesses genes permitem o acúmulo de mutações ou sobrevivência das células que apresentam proliferação anormal (AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2014).

Na maioria dos casos, o câncer é derivado de uma única célula somática e de seus clones neoplásicos, que acumulam uma série de mudanças genéticas e modificam a atividade do gene (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2014). A morfologia das células cancerosas geralmente difere das demais, sendo mais variáveis em tamanho e forma, com núcleo maior. A instabilidade genética ou mudanças no número e estrutura cromossômica são fatores de grande importância na oncogênese (SNUSTAD e SIMMONS, 2010).

Vários estudos demonstraram que a instabilidade genética aumenta a probabilidade do câncer desenvolver cada uma das características relatadas por Hanahan e Weinberg (2000, 2011). Segundo esses autores, todos os cânceres desenvolvem diversas características que são essenciais por atribuir as células tumorais vantagens consideradas adaptativas perante as células normais. São elas: (i) sustentação da sinalização proliferativa; (ii) evasão de supressores de crescimento; (iii) resistência à morte celular programada; (iv) imortalidade replicativa; (v) ativação de invasão e metástase; (vi) indução de angiogênese; (vii) instabilidade genômica; (viii) inflamação promovida pelo tumor; (ix) reprogramação do metabolismo energético; e (x) evasão da destruição imune. Essas características são conhecidas na oncologia molecular como *hallmarks* do câncer (HANAHAN e WEINBERG 2000; HANAHAN E WEINBERG, 2011).

A maioria dos *hallmarks* são ativos e ocorrem em diferentes graus nas células neoplásicas (ROCHA, 2013), ou seja, em cada etapa do desenvolvimento tumoral uma célula adquire uma ou mais mutações que irão conferir vantagens seletivas perante às células que as circundam. Esse processo de seleção natural permite que as células cancerosas sobrevivam em um ambiente inóspito, dentro do tumor, o qual apresenta baixo nível de oxigênio, escassez de nutrientes e com barreiras naturais ao crescimento impostas pelo tecido adjacente (ALBERTS *et*

al., 2010). Desse modo, a seleção das células que possuem mutações desejáveis e que são passadas para as suas descendentes permitem que o tumor se torne mais adaptado, favorecendo seu desenvolvimento. Além disso, essa seleção favorece a formação de uma população subclonal heterogênea, ou seja, células geneticamente distintas (BURREL *et al.*, 2013).

Como descrito até o presente momento a desordem genética é conhecida como a causa primária do câncer. Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando que o câncer não é somente influenciado por fatores genéticos, mas também pode estar relacionado com eventos epigenéticos anormais. O termo epigenética se refere a mudanças hereditárias na expressão gênica e na estrutura da cromatina, as quais não envolvem alterações na sequência de DNA (AHMED *et al.*, 2016; BABA *et al.*, 2016). Diferentemente do que ocorre nas desordens genéticas que envolvem alterações na sequência de DNA (AHMED *et al.*, 2016). As alterações epigenéticas, que ocorrem nas células tumorais, são responsáveis pela metilação dos dinucleotídeos CpG que podem causar o silenciamento dos genes supressores de tumor e mudanças no padrão de acetilação de histonas que pode levar a ativação de oncogenes (BABA *et al.*, 2016). Diversos estudos relatam a presença de mudanças no padrão epigenético de células normais antes do surgimento de células tumorais, e em estágios iniciais da tumorigênese. Indicando que as alterações epigenéticas possam ocorrer antes da etapa que envolve modificações genéticas no processo de tumorigênese (FEINBERG *et al.*, 2006), ou seja, as mudanças genéticas seriam consequência da modificação do padrão epigenético das células (AHMED *et al.*, 2016).

1.3 Tratamentos do câncer

As modalidades de tratamento do câncer mais comumente utilizadas são três: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Elas podem ser utilizadas em conjunto no tratamento das neoplasias malignas (GADELHA *et al.*, 2014), tendo como objetivo a erradicação completa da doença, prolongar o tempo de vida do paciente e contenção do crescimento das células tumorais, ou para amenizar os

sintomas associados ao processo canceroso (LORENCETTI e SIMONETTI, 2005).

Atualmente, são poucos os casos de tumores malignos que são tratados com apenas uma modalidade terapêutica, sendo que a escolha do tratamento ou da combinação entre eles está relacionado com a suscetibilidade dos tumores aos mesmos (THULLER, 2012). Além disso, o tamanho do tumor primário e da ocorrência ou não de metastização influenciam na escolha de qual técnica será usada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). A detecção precoce e o início imediato do tratamento do câncer proporcionam índices curativos para um terço dos casos de câncer, podendo citar como exemplo os cânceres de mama, colo de útero, cavidade oral e cólon (THULLER, 2012).

Na maioria dos casos, a cirurgia é escolhida como tratamento inicial para remoção de vários tipos de cânceres sólidos, quando esses não apresentam metástases, tendo como objetivo a remoção da massa tumoral. Esta modalidade de tratamento pode ser classificada como curativa ou paliativa (LORENCETTI e SIMONETTI, 2005), ou seja, respectivamente, quando há a remoção total da massa tumoral ou quando a remoção da massa tumoral é realizada para reduzir a população de células tumorais, proporcionando assim o bem-estar dos pacientes que estão em um estágio mais avançado do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

A radioterapia é o método de tratamento que faz uso de altas doses de radiação no intuito de matar as células cancerosas, impedindo assim que se espalhem. Esse tratamento pode ser realizado tanto externamente (máquina responsável por irradiar as células tumorais de uma determinada região do corpo) quanto internamente (radioisótopos são injetados no corpo, próximo das células cancerosas) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012a). Diferentemente do tratamento cirúrgico, a radioterapia não é específica para as células cancerosas, devido a sua ação de inibição de crescimento sobre as células que se dividem rapidamente (VOLPATO *et al.*, 2007). Mas como as células malignas crescem em uma proporção maior do que as células normais, elas se tornam mais suscetíveis à radioterapia. Porém, esse fato não evita que as células normais sofram ação desse tratamento, fato esse evidenciado a partir dos efeitos colaterais que esse

tratamento causa, como exemplo, as alterações cutâneas (LORENCETTI e SIMONETTI, 2005).

A quimioterapia é a forma de tratamento do câncer que usa compostos químicos denominados antineoplásicos ou quimioterápicos administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos (THULER, 2012). Os quimioterápicos possuem capacidade de induzir morte celular ou de abrandar o ritmo da divisão das células. Assim como a radioterapia, a quimioterapia não é específica para as células cancerosas, podendo causar danos às células saudáveis do organismo que possuem divisão acelerada, como por exemplo as células da mucosa bucal, do intestino e as células que são responsáveis pelo crescimento do cabelo (NATIONAL INSTITUTE OF CANCER, 2012b).

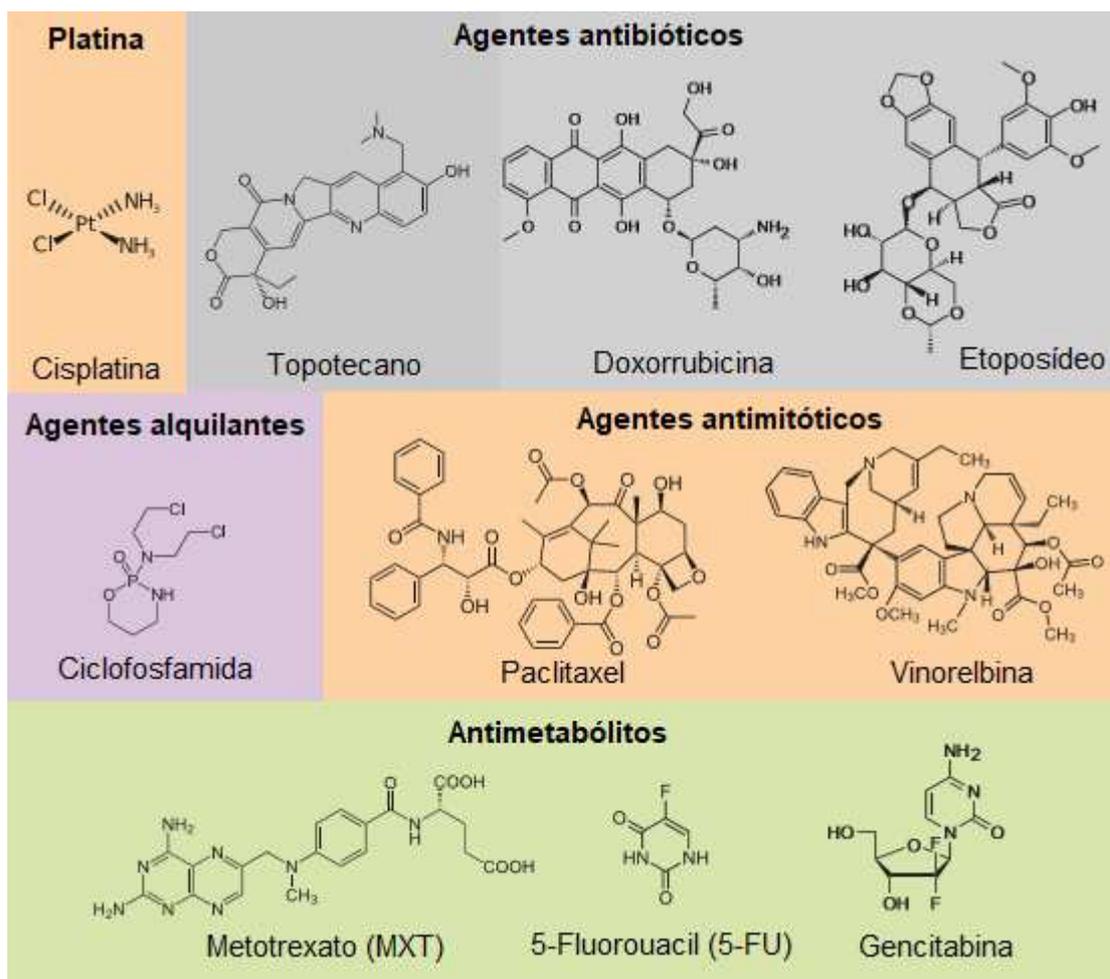
Os antineoplásicos podem ser administrados pela via oral (sob forma de comprimidos, cápsulas ou em líquido), topicamente (sob a forma de líquido ou pomada), intravenosa (aplicada na veia sob forma de injeções ou dentro do soro), intramuscular (injeções no músculo), intratecal (no fluido cefalo-raquidiano), ou subcutânea (abaixo da pele – injeções no tecido gorduroso acima do músculo). Porém a principal via de administração dos quimioterápicos é a intravenosa (sistêmica) (INCA, 2010), ou seja, o tratamento pode atuar por todo corpo do paciente. Diferentemente da cirurgia e da radioterapia que remove, mata ou causa danos nas células de uma determinada região (tratamento local) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015a).

1.3.1 Quimioterapia – Classificação dos antineoplásicos

A quimioterapia é o uso de diferentes drogas no tratamento de qualquer doença, como o câncer. Mais de 100 quimioterápicos são utilizados atualmente, o que torna essa classe de medicamentos um grupo heterogêneo de substâncias químicas (com diferentes composições) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015a) capazes de inibir o crescimento e/ou os processos vitais das células tumorais com uma toxicidade tolerável sobre as células normais (não-tumorais). Os quimioterápicos possuem diversas moléculas celulares como alvo (FONTES *et al.*, 2005), desse modo, um dos critérios utilizados para classificá-los se baseiam

em seu mecanismo de ação, estrutura química e ação fisiológica. Por esse modo de classificação podemos destacar cinco classes de quimioterápicos mais utilizados, sendo eles: os alquilantes, os antimetabólitos, os antibióticos, os inibidores mitóticos (REDDY e COUVREUR, 2010), como ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química dos representantes das diferentes classes de quimioterápicos (Fonte: Adaptado de WIJDEVEN *et al.*, 2016).



Agentes alquilantes são capazes de modificar quimicamente o DNA, sendo que os sítios de ação mais comuns são a base guanina e a adenina (WIJDEVEN *et al.*, 2016), a partir de ligações covalentes por reação de alquilação (ALMEIDA *et al.*, 2005). O DNA alquilado pode então formar ligações cruzadas (“Cross – linked”) inter- ou intra- filamentosas, desencadeando uma resposta ao dano no DNA e consequentemente a morte celular (WIJDEVEN *et al.*, 2016). Os agentes alquilantes podem atuar em qualquer fase do ciclo celular, desse modo são

utilizados para tratar diversos tipos de cânceres, dentre eles: leucemia, linfoma, doença de Hodgkin, sarcoma, câncer de pulmão, mama e ovário. Vale ressaltar que, devido a ação similar dos compostos de platina na maneira de matar as células cancerosas, algumas vezes eles são agrupados à classe de quimioterápicos alquilantes. Podemos citar como exemplos de agentes alquilantes a ciclofosfamida e a fosfamida (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015b).

Agentes antimetabólitos podem atuar de duas maneiras: inibindo enzimas essenciais para a biossíntese dos nucleotídeos ou mimetizando os nucleotídeos do DNA ou RNA, bloqueando a replicação do DNA e conseqüentemente a proliferação celular (WIJDEVEN *et al.*, 2016). Devido este mecanismo de ação, os agentes antimetabólitos atuam sobre células que estão na fase S do ciclo celular. Essa classe de antineoplásicos podem ser usados nos tratamentos de leucemias, câncer de ovário, mama, trato intestinal, entre outros. O 5-Fluorouracil (5-FU), Metotrexato (MXT) e o Mercaptopurina são exemplos de agentes antimetabólitos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015b).

Os antibióticos antitumorais atuam em todas as fases do ciclo celular interferindo no funcionamento de enzimas envolvidas na replicação do DNA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015b). Como o caso da topoisomerase II, a qual tem sua atividade reduzida pelo fato dos antibióticos antitumorais formarem ligações interfilamentares com o DNA. Além disso, promovem a formação de radicais livres por apresentarem em suas estruturas anéis insaturados que possibilitam a agregação de elétrons. Outra função dos antibióticos está relacionada com a sua interação com fosfolipídeos da membrana celular, modificando a sua fluidez e conseqüentemente o transporte de íons. Alguns dos quimioterápicos existentes nesse grupo são a doxorubicina e a daunorubicina. Vale lembrar que, algumas drogas dessa classe, como a mitomicina C e a bleomicina, apresentam ainda outros mecanismos de ação como, respectivamente, alquilação e quebras filamentosas no DNA (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Outra classe de agentes antineoplásicos são os inibidores mitóticos que atuam sobre os microtúbulos. Essa maquinaria é essencial para estrutura do citoesqueleto, sinalização, transporte e segregação dos cromossomos durante a divisão celular. Várias drogas têm sido desenvolvidas para atuar sobre a dinâmica

dos microtúbulos, interagindo com a subunidade β -tubulina do fuso para estabilizar (como os taxanos e epotilones) ou desestabilizar os microtúbulos (como o alcaloide vinca – vinblastina e vincristina). Ambas as classes inibem a formação correta do fuso mitótico ocasionando o aprisionamento da célula na mitose (WIJDEVEN *et al.*, 2016) na fase M do ciclo celular. Outros compostos de inibidores mitóticos podem atuar em qualquer fase do ciclo celular, quando seus alvos são as enzimas responsáveis pela multiplicação celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015b).

Apesar de existirem diferentes tipos de quimioterápicos e uma vasta possibilidade de mecanismos de atuação, o uso destes pode ocasionar problemas relacionados à resistência das linhagens tumorais (LUQMANI, 2005). As células tumorais desenvolvem mecanismos que dificultam a indução da morte celular perante o uso de drogas anticâncer. De modo geral, esses mecanismos que conferem às células tumorais resistência aos agentes antineoplásicos pode ser intrínseca ou adquirida durante e/ou após a quimioterapia (GATTI *et al.*, 2015). A resistência intrínseca está relacionada a uma característica inerente do tumor maligno que impede a ação do fármaco anticâncer, por lhe conferir proteção aos danos causados pela droga, possivelmente associada ao efluxo da mesma (SHARMA *et al.*, 2010). Como por exemplo, a amplificação da ATPase transportadora B1 (ABCB1; Glicoproteína-p; proteína de resistência a múltiplas drogas 1 [MDR1]) pela célula tumoral que, conseqüentemente, irá conferir maior codificação de uma ATPase de transporte, nomeada ABC. Essa proteína de transporte encontra-se embutida na membrana plasmática, e tem como função o bombeamento unidirecional de substâncias endógenas e compostos xenobióticos para fora da célula. Desse modo, a superprodução dessa proteína impede o acúmulo intracelular dos fármacos anticâncer, insensibilizando assim as células cancerosas (WOLKING *et al.*, 2015).

A resistência adquirida durante o tratamento quimioterápico, também conhecida como quimiorresistência, está associada a modificações epigenéticas ou alterações em vias de sinalização que promovem mudanças no padrão de transcrição das células cancerosas. Tal característica, pode também ser adquirida através de subpopulações de células cancerosas que apresentam mutações ou alterações da expressão de genes de resistência, sendo esta uma característica

peculiar à natureza heterogênea do tumor. A ativação do fator de transcrição κ B (NF κ B), é um exemplo de quimiorresistência desenvolvida pelas células cancerosas a qual inibe a indução da apoptose (WIJDEVEN *et al.*, 2016). Uma vez que, o NF κ B é o principal fator de transcrição de genes pró-sobrevivência (p.ex. proteína inibitória c-FLIP - FLIP) (DOLCET *et al.*, 2005) e de citocinas pró-inflamatórias (p.ex. ciclooxigenase 2 - COX 2) (LI e SETHI, 2010).

1.3.2 Complexos metálicos no tratamento oncológico

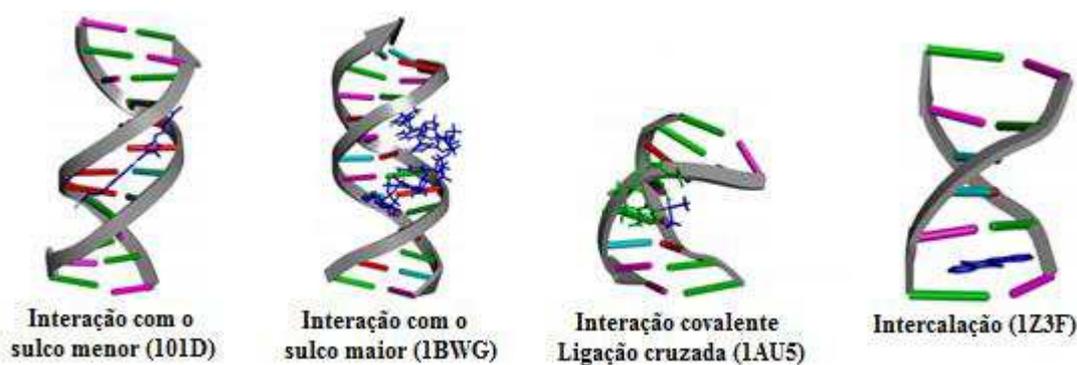
O uso de compostos metálicos para aplicação medicinal teve início a partir da descoberta da ação antineoplásica do composto *cis*-diaminodicloroplatina(II), denominado cisplatina, em 1969. O emprego da cisplatina como agente quimioterápico teve início em 1978 e atualmente é um dos compostos mais utilizados e mais eficiente no tratamento de cânceres de pulmão, cabeça, pescoço, ovário, bexiga (HARTINGER *et al.*, 2008), testículo (que se obtém até 90% taxa de cura), melanoma, linfomas e mielomas (WHEATE *et al.*, 2010).

Os metais são indispensáveis para realização de diversos processos bioquímicos celulares. As concentrações intracelulares dos metais necessitam de uma forte regulação por apresentarem como característica alta reatividade (FLOREA e BÜSSELBERG, 2011) e bioacumulação, podendo causar efeitos colaterais graves (RODRIGUES *et al.*, 2009) quando encontrados no organismo em concentrações fora dos padrões sendo associados a patologias, como o câncer (FLOREA e BÜSSELBERG, 2011). Por outro lado, os compostos metálicos apresentam características como diversidade estrutural, propriedades fotoquímicas e fotofísicas, e habilidade de formar interações específicas com biomoléculas que os tornam uma excelente alternativa para a descoberta de novas drogas. A atividade biológica está diretamente relacionada com a escolha do metal, seu estado de oxidação e do ligante presente no complexo. O sinergismo ou a soma das funções do metal com seus ligantes podem tornar o complexo biologicamente ativo, de modo a proporcionar interações com moléculas biológicas através da formação covalente de adutos, que podem provocar disfunções celulares (LEUNG *et al.*, 2016).

O DNA é considerado um dos principais alvos terapêuticos, justamente pelo fato de regular diversas funções celulares (GILAD e SENDEROWITZ, 2014), como os processos de replicação e de transcrição, que são essenciais para a divisão celular e para a produção de proteínas. Qualquer agente que interfira em algum desses processos pode ser citotóxico, sendo que agentes inibidores da replicação do DNA são considerados pró-apoptóticos (FONTES *et al.*, 2005).

A rica estrutura do DNA permite uma fácil interação com diversos complexos metálicos, seja por meio de ligação direta (covalente) do composto com as bases nitrogenadas ou grupo fosfato do DNA; ou a partir de interações eletrostáticas e hidrofóbicas com os sulcos maior/menor do DNA; ou por intercalação (Figura 3) (BARRA e NETTO, 2015). Essas interações ocorrem graças às propriedades metálicas de facilidade de formação de íons carregados positivamente em solução aquosa, o que possibilita sua ligação a moléculas biológicas carregadas negativamente (FREZZA *et al.*, 2010), como o DNA.

Figura 3. Representação dos modos de interação com o DNA. Os ligantes estão representados em azul com o código PDB entre parênteses (Fonte: GILAD e SENDEROWITZ, 2014).

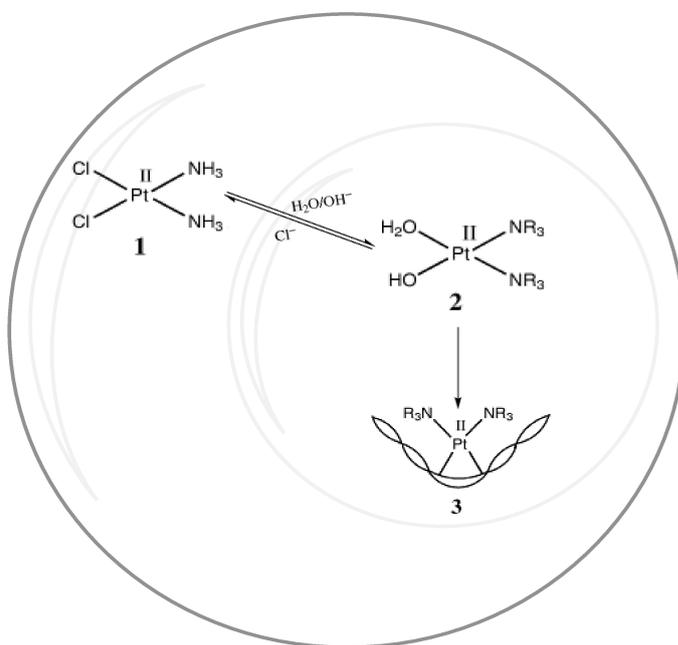


A interação dos complexos metálicos com o DNA pode ocorrer através de diversos mecanismos, dentre eles ligação covalente, formando ligações inter-intra-filamentares, de caráter irreversível, induzindo a apoptose por inviabilizar o uso do DNA. Os complexos também podem interagir com o sulco maior e menor do DNA, onde interações intermoleculares são formadas por ligações de hidrogênio, porém o sulco maior possui os grupamentos metil da base de timina

expostos, permitindo uma maior interação com diversos compostos. Essa variação no modo de interação com os complexos metálicos confere um padrão de seletividade imposto pelos sulcos do DNA, onde no sulco maior ocorre interação com moléculas maiores e no sulco menor, preferencialmente, com moléculas menores. De modo geral, este tipo de interação interfere na ligação de proteínas ao DNA (p.ex. fatores de transcrição), ocasionando aprisionamento proliferativo e morte celular. A intercalação é a inserção de uma pequena molécula entre dois pares de bases adjacentes na fita do DNA, podendo existir interação com os sulcos. Esse tipo de interação gera mudanças conformacionais na estrutura do DNA, incluindo a abertura de um *gap* entre as bases, alongamento, desenrolamento das hélices do DNA (GILAD e SENDEROWITZ, 2014) e enrijecimento, ou seja, o DNA perde a estrutura helicoidal regular. Estas mudanças na estrutura secundária do DNA afetam suas funções biológicas como a replicação e, conseqüentemente, inibem a progressão de cânceres ou causam morte celular (BARRA e NETTO, 2015).

O mecanismo de ação da cisplatina pode ser utilizado para exemplificar a interação de um complexo metálico e a molécula de DNA. Ele consiste, inicialmente, da difusão da cisplatina (identificado como 1 na Figura 4) até o núcleo da célula, no qual irá sofrer modificações em sua estrutura a partir da substituição dos ligantes dicloreto (grupos de saída) pela água ou hidróxido. Dando origem a uma estrutura parcialmente hidrolisada (identificado como 2 na Figura 4) que então se liga ao DNA (identificado como 3 na Figura 4). Esse produto formado a partir da aquação e/ou hidrólise, na maioria das vezes, interage com duas bases guaninas adjacentes na cadeia do DNA, ocasionando distorções na estrutura do mesmo, o que induz a morte celular apoptótica, uma vez que os mecanismos de reparo existentes não são capazes de reparar tal dano na molécula de DNA. Vale ressaltar que, caso ocorra a aquação/hidrólise prematura da cisplatina, ou seja, modificação na estrutura da molécula no meio extracelular irá promover a interação de adutos de platina com proteínas (p.ex. albumina), ocasionando efeitos adversos (LEVINA *et al.*, 2009).

Figura 4. Mecanismo de ação da cisplatina (Fonte: Adaptado de LEVINA *et al.*, 2009)



1.4 **Screening** de compostos antitumorais à base de metais

A descoberta de Barnett Rosenberg da cisplatina foi o marco inicial que impulsionou a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos anticancerígenos à base de metais (RODRIGUES *et al.*, 2009). Uma vez que, a utilização da cisplatina como agente antineoplásico permitiu o tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, efeitos colaterais, aliados à toxicidade e resistência desenvolvida pelo uso desse quimioterápico são fatores limitantes no tratamento (LEUNG *et al.*, 2016). Os efeitos colaterais estão relacionados com a dose administrada da cisplatina que podem ser originados pela absorção indiscriminada do composto por células que se dividem rapidamente e pela tentativa do organismo de excretar a droga pelos rins. Os efeitos que podem ser observados são: nefrotoxicidade, ototoxicidade neurotoxicidade e supressão mieloide (redução da atividade da medula óssea). Além disso, a restrição da dose administrada de cisplatina pode ocasionar o surgimento de linhagens tumorais resistentes (principalmente nos casos de câncer de ovário) a outros tipos de quimioterápicos, pois a dose administrada pode ser insuficiente para induzir a morte de todas as células tumorais (WHEATE *et al.*, 2010).

Com conhecimento dessas limitações, pesquisas foram direcionadas para o *screening* de novos complexos metálicos que apresentem maior atividade antitumoral, maior espectro de ação, principalmente sobre linhagens tumorais resistentes ao tratamento com cisplatina, e menor toxicidade (RODRIGUES *et al.*, 2009). Desse modo, seis novos compostos a base de platina foram sintetizados, sendo que destes, apenas dois (carboplatina e oxaliplatina) obtiverem aprovação mundial e os outros três conseguiram aprovação em determinados países (lobaplatina na China, heptaplatina na Coréia do Sul e nedaplatina no Japão). Apesar desses complexos de platina revelarem resultados mais promissores do que a cisplatina, eles não deixaram de apresentar alguns efeitos colaterais (Tabela 1) (WHEATE *et al.*, 2010). Frente ao exposto, na perspectiva de encontrar novos antitumorais mais eficazes do que os presentes no mercado, vários novos compostos à base de diferentes metais como rutênio, ródio, ouro, paládio, titânio, ósmio, ferro e cobre estão sendo sintetizados e investigados suas propriedades antitumorais (HARTINGER *et al.*, 2008).

Tabela 1. Drogas a base de platina que foram aprovadas para utilização no tratamento de pacientes com câncer em pelo menos um país (Fonte: Adaptado de WHEATE *et al.*, 2010)

| Droga | País | Toxicidade dose-limitante |
|---------------------|-------------|---|
| Cisplatina | Global | Nefrotoxicidade |
| Carboplatina | Global | Mielosupressão |
| Oxaliplatina | Global | Neurotoxicidade |
| Nedaplatina | Japão | Mielosupressão |
| Lobaplatina | China | Trombocitopenia |
| Heptaplatina | Coréia | Nefrotoxicidade/ Sangramento intra-abdominal |

1.4.1 Potencial farmacológico de complexos de cobre(II)

Na tentativa de encontrar compostos inorgânicos menos tóxicos, foram sintetizados vários complexos a base de metais essenciais como potenciais antineoplásicos (RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ, 2010). O uso dos metais

essenciais é justificado por eles estarem presentes nos organismos vivos, participando de diversos processos biológicos, tais como na transferência de elétrons, na catálise, e por serem co-fatores enzimáticos (FREZZA *et al.*, 2010). Dentre os elementos traços (micronutrientes) destaca-se o cobre. Várias pesquisas demonstraram que complexos a base de cobre podem proporcionar maior espectro de atividade antitumoral e efeitos colaterais relativamente menores quando comparados aos compostos à base de platina, além de possuir menor probabilidade de resistência das células tumorais (RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ, 2010).

Em condições biológicas normais o cobre pode ser encontrado em dois estados de oxidação, sendo eles: +1, íon cuproso (Cu^{1+}) e +2, íon cúprico (Cu^{2+}) (DING *et al.*, 2011). Desse modo, pode ser considerado um metal redox ativo, ou seja, que muda facilmente do estado reduzido Cu(I) para o estado oxidado Cu(II). Com essas mudanças no estado redox, o cobre pode participar de reações que envolvem oxidação-redução, fazendo com que compostos à base de cobre possam reagir diretamente com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio (ROS) (TISATO *et al.*, 2009), tais como os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (SAGHIRI *et al.*, 2015). Em vista disso, a reação de oxidação-redução é considerada a principal função das moléculas biológicas que possuem cobre em sua estrutura (RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ, 2010). Vale ressaltar que o cobre também pode participar no processo de defesa contra as ROS (SAGHIRI *et al.*, 2015).

O cobre é indispensável para o funcionamento de diversas enzimas e proteínas relacionadas (como grupo protético), por exemplo ao metabolismo energético, à respiração mitocondrial (p. ex. citocromo oxidase), à antioxidação (p.ex. Cu, Zn-superóxido dismutase), formação do tecido conectivo (lisil oxidase), síntese de melanina (tirosinase) e metabolismo de ferro (SAGHIRI *et al.*, 2015; TISATO *et al.*, 2009).

Outro motivo que despertou interesse em utilizar os complexos a base de cobre como um antitumoral é a presença de elevadas concentrações de cobre em diferentes tipos de cânceres humanos como sarcoma, leucemia, linfoma de Hodkin's, cânceres de pulmão, mama, cérebro, fígado, colo do útero (SAGHIRI *et al.*, 2015) e próstata, quando comparado com células saudáveis (FREZZA *et al.*,

2010). O aumento na concentração dos níveis de cobre nas células tumorais pode estar relacionado com seu papel de cofator na angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos. Sabe-se que o crescimento dos tumores e a formação de metástases estão diretamente relacionados com a angiogênese (XIAO *et al.*, 2010).

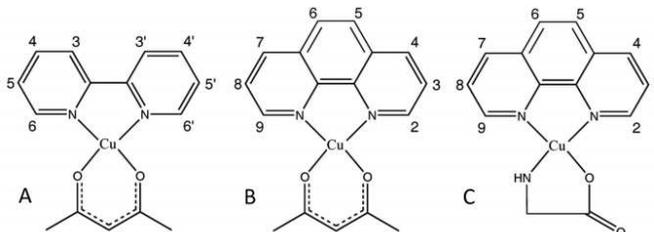
Testes *in vitro* demonstraram que o cobre pode estimular a proliferação e migração de células endoteliais humanas, visto que esse elemento é cofator de diversos mediadores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), interleucinas 1 (IL-1) e 8 (IL-8), os quais são primordiais para o processo de angiogênese tumoral (TISATO *et al.*, 2009). Desse modo, o cobre participa das etapas iniciais da angiogênese tumoral através da ativação de fatores angiogênicos, que se ligam a células endoteliais induzindo a mudança da fase G_0 para a fase G_1 e, conseqüentemente, a proliferação celular (NASULEWICZ *et al.*, 2004). O cobre pode ser considerado angiogênico por si só, mas não é o participante central na angiogênese (SAGHIRI *et al.*, 2015).

Com relação aos complexos de cobre, diversos estudos demonstraram que eles apresentam capacidade de clivar a molécula de DNA, sendo que a interação com o DNA está relacionada com o tamanho do complexo, afinidade eletrônica e à geometria do aduto formado. A interação entre complexos de cobre e DNA pode ocorrer de modo não covalente podendo ser uma ligação eletrostática, uma intercalação, ou uma ligação no sulco maior ou menor do DNA. Essa interação induz uma alteração conformacional irreversível na estrutura do ácido desoxirribonucleico (SANTINI *et al.*, 2013).

Com base nestas informações, vários complexos de cobre foram e estão sendo testados como compostos promissores, que têm como alvo o DNA. Podemos citar como exemplo o complexo $[\text{Cu}(\text{1,10-Phen})_2]^{2+}$, que possui atividade de clivagem de DNA eficiente. O mecanismo de clivagem deste complexo consiste num processo ordenado, o qual se inicia pela redução $[\text{Cu}(\text{1,10-Phen})_2]^{2+}$ para $[\text{Cu}(\text{1,10-Phen})_2]^+$, seguido da ligação ao sulco menor do DNA e a subsequente formação de um complexo através da reação com peróxido de hidrogênio, dando assim origem a estrutura cobre-oxo que é responsável pelos danos oxidativos no DNA (SILVA *et al.*, 2013).

As Casiopeínas[®] são um grupo de complexos à base de cobre que vêm apresentando resultados promissores, sendo que dois complexos dessa família encontram-se na fase clínica 1 de testes. Essa família tem em comum a fórmula $[Cu(NN)(NO)]NO_3$ e $[Cu(NN)(OO)]NO_3$, na qual (NN) representa os ligantes aromáticos 2,2'-bipiridina ou 1,10-fenantrolina; (NO) representa um aminoácido essencial ou um peptídeo e (OO) representa um ligante não aromático (acetilacetato ou salicilaldehidato), como ilustrado na Figura 5. Diversos estudos realizados com as Casiopeínas e complexos de cobre similares demonstraram capacidade de clivar o DNA. Além disso, tais complexos apresentam atividade antitumoral perante diversas linhagens *in vitro* e *in vivo* (GALINDO-MURILLO *et al.*, 2015).

Figura 5. Estruturas representativas dos compostos pertencentes à família das Casiopeínas[®]. (A) $Cu[(2,2'-bipyridina)(acetilacetato)]^+$, (B) $Cu[(1,10-fenanthrolina)(acetilacetato)]^+$ e (C) $Cu[(1,10-fenanthrolina)(glicinato)]^+$ (Fonte: GALINDO-MURILLO *et al.*, 2015)



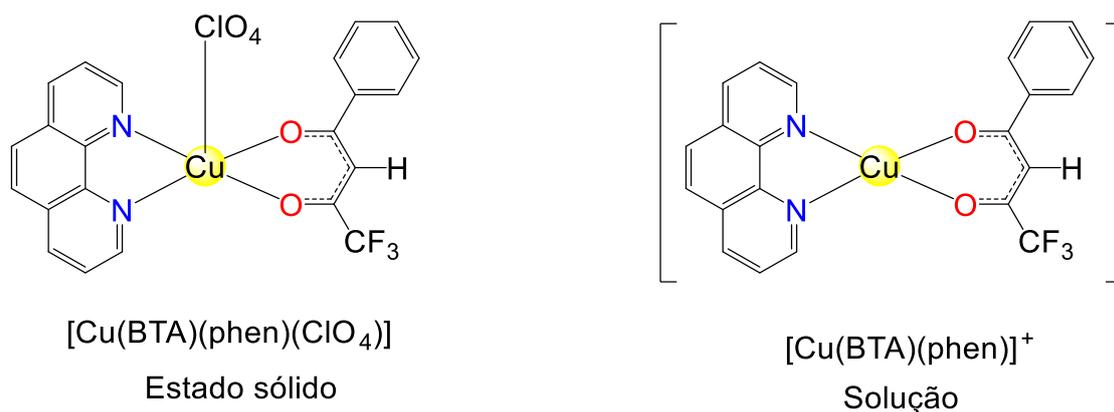
1.4.2 Complexo de cobre contendo β -dicetona e 1,10-fenantrolina

O uso de elementos presentes na tabela periódica oferece várias possibilidades de incorporar diferentes elementos em novos compostos (KLJUN e TUREL, 2017). Vários aspectos biológicos dos complexos a base de metais estão relacionados com a facilidade de separar o íon metálico e o ligante. Desse modo, é fundamental entender a relação entre o ligante e o metal no sistema biológico (SHEIKH *et al.*, 2011).

O complexo ternário do tipo $[Cu(O-O)(N-N)ClO_4]$, sintetizado por Almeida *et al.* (2015), onde O-O = 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (HBTA); N-N = 1,10-

fenantrolina (phen) (Figura 6), genericamente chamado de $\text{Cu}(\text{BTA})(\text{Phen})\text{ClO}_4$ (CBP-01) foi objeto de estudo do presente trabalho.

Figura 6. Representação da estrutura química proposta para o complexo metálico $\text{Cu}(\text{BTA})(\text{Phen})\text{ClO}_4$



Esse composto é formado a partir da associação da fenantrolina e a β -dicetona ao cobre (II) (ALMEIDA *et al*, 2015). Sabe-se que a fenantrolina, uma amina aromática, apresenta alta afinidade de ligação ao cobre e devido à presença de anéis aromáticos em sua estrutura possibilita sua interação com o DNA (RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ, 2010). Várias pesquisas demonstraram o potencial citotóxico do complexo [cobre – 1,10 fenantrolina], desse modo diversos estudos testaram a adição de diferentes coligantes a esse complexo para potencializar a ação antitumoral do mesmo. As β -dicetonas e seus derivados, são exemplos de ligantes utilizados para potencializar a ação do complexo [cobre – 1,10-fenantrolina], sendo que as β -dicetonas possuem atividade antitumoral (ALMEIDA *et al*, 2015).

Estudos recentes mostraram que as β -dicetonas podem ser utilizadas como grupos de saída (ligante funcional) de complexos metálicos. Além disso, foi descoberto que o substituinte CF_3 presente na estrutura das β -dicetonas são os responsáveis pelo aumento da lipofilicidade e, conseqüentemente, da absorção celular (KLJUN e TUREL, 2017). Além do mais as β -dicetonas possivelmente modulam as propriedades redox do metal central (RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ, 2010).

Com os crescentes índices de novos casos de câncer se faz necessário a busca por novos agentes antitumorais que sejam mais eficazes e apresentem menos efeitos colaterais, proporcionando assim melhor qualidade de vida aos pacientes em tratamento. Desse modo, é de extrema importância a pesquisa de potenciais agentes quimioterápicos, como os complexos metálicos a base de cobre(II).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos citotóxicos do complexo $\text{Cu}(\text{BTA})(\text{Phen})\text{ClO}_4$ (CBP-01), bem como sua toxicidade e efeitos antitumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Testar a atividade citotóxica do CBP-01 e de seus ligantes isolados, utilizando as linhagens murinas tumorigênicas de sarcoma (TG180) e de carcinoma mamário (Ehrlich); linhagem tumoral de colo de útero humano (Hela); e a linhagem não tumorigênica murina de mioblasto (C2C12);
- Determinar a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) do CBP-01 nas diversas linhagens utilizadas;
- Testar a atividade citotóxica do CBP-01 em associação com o antioxidante NAC (N-acetilcisteína);
- Testar a atividade genotóxica do CBP-01, por meio de teste de micronúcleo, utilizando a linhagem celular murina de mioblasto (C2C12);
- Avaliar a progressão do ciclo celular após tratamento com o complexo CBP-01 na linhagem tumorigênica sarcoma 180;
- Determinar o potencial de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do tratamento da linhagem tumorigênica de sarcoma 180 com o complexo CBP-01;
- Determinar o tipo de morte celular induzido pelo complexo CBP-01 perante a linhagem tumorigênica sarcoma 180;
- Determinar a dose Letal 50% (DL_{50}) do CBP-01;

- Avaliar a atividade antitumoral do complexo CBP-01;

3. Metodologia

O complexo metálico de cobre(II) contendo β -dicetona e 1,10 fenantrolina, Cu(BTA)(Phen)ClO₄ (CBP-01), foi sintetizado pelo grupo de pesquisa do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, coordenado pelo professor Dr. Wendell Guerra. O complexo CBP-01 foi gentilmente cedido para a realização da nossa pesquisa.

3.1 Testes *in vitro*

3.1.1 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares mioblasto (C2C12) e tumor cervical (HeLa) foram mantidas *in vitro*, cultivadas em frascos de 25 cm² em meio RPMI-1640 (Gibco®, Paisley, UK), suplementado com 25 mM HEPES, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co.®, St. Louis, USA), 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab®, Campinas, Brazil) e foram mantidas em uma estufa a 37°C e 5% CO₂.

As linhagens celulares Sarcoma 180 e Ehrlich foram mantidas *in vivo* por meio de repiques semanais, nos quais 200 μ L do tumor ascítico presente na cavidade peritoneal eram transferidos para outro animal, via inoculação intraperitoneal. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia sob condições controladas, sendo mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de 26 \pm 2°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi composto de ração comercial padrão e água estéreis. Foram utilizados camundongos Balb/c machos para o repique das células sarcoma e Balb/c fêmeas para o repique das células Ehrlich. A utilização dos animais nesse trabalho foi possível a partir da aprovação do projeto 141/16 pela Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As linhagens murinas utilizadas no presente trabalho foram: sarcoma 180, também conhecida como tumor Crocker, é proveniente de células de tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo Swiss macho (*Mus musculus*) (ZUCKERBERG, 1973). Sarcoma 180 teve origem de um tecido conjuntivo (ASSEF *et al.*, 2002); Ehrlich, também conhecida como tumor ascítico de Ehrlich (EAC), é uma das linhagens celulares modelo mais comumente utilizada para experimentos com tumor. Foi isolada de um câncer de mama espontâneo, proveniente de um camundongo fêmea (OZASLAN *et al.*, 2011); e mioblasto (C2C12), essa linhagem é um subclone da linhagem celular murina de mioblastos C2, sendo considerada uma linhagem progenitora (BURATTINI *et al.*, 2004). Estes mioblastos consistem em uma população de células miogênicas que tem a capacidade de proliferarem e diferenciarem rapidamente *in vitro* (GRABOWSKA *et al.*, 2011). Além disso, foi utilizado a linhagem humana de colo do útero HeLa. A linhagem celular HeLa foi isolada de um tumor cervical de uma paciente chamada Henrietta Lacks (por isso a linhagem celular recebeu o nome de HeLa), a qual morreu com esse câncer em 1951 e, desde então, se tornou uma das linhagens celulares mais utilizadas para estudos de biologia celular e molecular humana (LANDRY *et al.*, 2013).

3.1.2 Avaliação de atividade citotóxica pelo método Alamar Blue

O Alamar Blue (Resazurina) é um composto capaz de indicar por uma reação de oxidação-redução a presença de células viáveis, ocorrendo a passagem do estado oxidado, coloração azul não fluorescente (resazurina), para o estado reduzido, coloração rosa altamente fluorescente (resorufina) (COLLINS e FRANZBLAU, 1997). A quantidade de resofurina produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis com metabolismo ativo, a qual pode ser quantificada pela mensuração da mudança na absorção (RISS *et al.*, 2016). A análise da variação na absorbância é realizada a 570 nm (excitação) e 600 nm (emissão).

Para a realização do ensaio de viabilidade celular utilizando Alamar blue as linhagens celulares (1×10^5 cels mL⁻¹) foram incubadas em 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 96 poços. O complexo

de cobre CBP-01 e seus ligantes (BTA e Phen) foram diluídos de forma seriada, sendo utilizadas as concentrações de 1 µM, 5 µM; 10 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM. A microplaca foi incubada a 37 °C com 5 % de CO₂, por 24 horas. Na sequência, com 20 horas de tratamento, foi adicionado em cada poço da microplaca 20 µL do agente revelador Alamar Blue, procedendo à leitura após 4 horas de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata. A leitura da placa foi realizada em uma leitora de placa a 570 e 600 nm.

De acordo com Bénéré *et al.* (2007), a porcentagem de viabilidade celular obtida pelo teste de Alamar Blue é dada pela seguinte fórmula:

$$\%viabilidade\ celular = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Em que:

O1 = coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 570nm (pré-determinado em 117216);

O2 = valor de coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 600nm (pré-determinado em 80586);

A1 = absorbância das células tratadas com Cu(BTA)(Phen)ClO₄ à 570nm;

A2 = absorbância das células tratadas com Cu(BTA)(Phen)ClO₄ à 600nm;

P1 = valores de absorbância do controle negativo à 570nm;

P2 = valores de absorbância do controle negativo à 600nm.

Esse ensaio foi realizado nas linhagens sarcoma 180, ehrlich, C2C12 e Hela.

3.1.3 Índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) é determinado a partir dos valores de concentrações necessárias para reduzir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) obtidos nas linhagens tumorais e não tumoral. O IS foi calculado a partir da seguinte fórmula: IS = IC₅₀ linhagem não tumoral/IC₅₀ linhagem tumoral, sendo considerado significativo um valor de IS ≥ 2 (BADISA, *et al.*, 2009). Esse índice possibilita verificar a seletividade do complexo em estudo sobre as células tumorais.

3.1.4 Avaliação da citotoxicidade do Cu(BTA)(Phen)ClO₄ em associação com o antioxidante NAC utilizando Alamar Blue

Para realizar o experimento, o NAC em associação com a solução tampão HEPES foram diluídos em PBS 1x, e acrescentado às placas, em co-tratamento com as diluições do complexo CBP-01, em uma concentração final de 10mM. Os procedimentos para plaqueamento das linhagens utilizadas nesse trabalho, adição do CBP-01 e leitura das placas, foram realizados de acordo com a metodologia para o teste Alamar Blue citado acima.

As concentrações de CBP-01 em associação com o NAC utilizadas foram: 1 µM, 5 µM; 10 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. A linhagem utilizada para esse ensaio foi a de sarcoma 180.

3.1.5 Avaliação de atividade genotóxica pelo teste de micronúcleo

As análises de genotoxicidade foram realizadas pelo teste de micronúcleo *in vitro* acompanhando o protocolo OECD 487, com algumas modificações. Para a realização do ensaio, 2×10^4 células de mioblasto (C2C12) com pelo menos 90% de viabilidade, foram dispostas em placas de cultura de 96 poços. Após 4 horas mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, foram adicionadas diferentes concentrações do complexo de cobre CBP-01: 0,125 µM; 0,25 µM e 1 µM. Essas concentrações foram escolhidas com base no teste de viabilidade celular realizado perante a linhagem C2C12, as quais apresentaram uma citotoxicidade inferior a 50%. Desse modo, todas as concentrações utilizadas apresentaram mais de 80 % de viabilidade celular após exposição com o CBP-01. Foi utilizado um controle negativo que não recebeu adição do complexo de cobre e um controle positivo, ao qual foi adicionado a droga com comprovada atividade mutagênica colchicina (0,3 µg mL⁻¹). As células foram incubadas com os tratamentos por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Os testes foram conduzidos em duplicatas. Após 24 horas com o tratamento, o sobrenadante dos poços foi retirado e a citocalasina B (5 µg mL⁻¹) foi adicionada e mantida por mais 24 horas a 37 °C e 5 % CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram fixadas com formol 10 % diluído em PBS 1x. As células foram

incubadas a 4 °C overnight. Para remover o fixador foi adicionado PBS 1x e posteriormente foi adicionado o fluorocromo Hoechst 33342 (0,9 mg mL⁻¹) na concentração de 5 µM, com intuito de marcar o DNA da célula, sendo incubada por 20 min em 37°C no escuro. Logo após foi adicionado PBS 1x e por fim foi adicionado a solução de montagem (Na₂HPO₄ 0,2 M em PBS 1x). As imagens foram capturadas no microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA). Foi contado um valor mínimo de 2000 células binucleadas por concentração e apenas os micronúcleos presentes em células binucleadas foram considerados.

3.1.6 Análise do ciclo celular por iodeto de propídeo (PI)

O ciclo celular foi analisado pela quantificação do conteúdo de DNA por célula, a partir do uso da citometria de fluxo de células coradas com iodeto de propídeo, como previamente descrito na literatura por Krishan (1975). Para verificar se o composto CBP-01 é antiproliferativo, a linhagem sarcoma 180 (0,5 x 10⁶ células mL⁻¹) foi incubada em 500 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 12 poços. As concentrações utilizadas do complexo de cobre CBP-01 no tratamento foram: 1 µM, 10 µM e 50 µM, sendo estas escolhidas de acordo com o IC₅₀ obtido pelo teste de viabilidade celular após exposição com o CBP-01. Desse modo, as concentração de 1 µM, 10 µM e 50 µM correspondem a valores menor, próximo e maior que o IC₅₀, respectivamente. As células foram tratadas em dois tempos sendo eles de 12 horas e 24 horas. Após o tratamento as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e o pellet foi ressuscitado em PBS 1x, esse procedimento foi repetido por duas vezes. Logo após, o pellet foi ressuscitado em uma solução de etanol 70 % diluído em PBS 1x, com intuito de fixar as mesmas. Em seguida, as células foram armazenadas a 4°C overnight. Para marcação com iodeto de propídeo as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e ressuscitadas em PBS 1x, com intuito de remover o etanol esse procedimento foi realizado 2 vezes. Após essa etapa o pellet foi ressuscitado em PBS 1x contendo 10 µg mL⁻¹ de iodeto de propídeo e 100 µg mL⁻¹ de RNase, para ter certeza que somente o DNA seria marcado. As células foram incubadas por 45 minutos a 37 °C no escuro. E em seguida, as

amostras foram analisadas em citômetro ACCURI (BD) no canal FL2. Os dados obtidos foram analisados a partir do software Kaluza.

3.1.7 Ensaio de apoptose

Para verificar se o composto CBP-01 induz apoptose, a linhagem sarcoma 180 (2×10^5 cels mL⁻¹) foi adicionado em 250 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 24 poços. As concentrações utilizadas no tratamento do complexo de cobre CBP-01 foram: 1 µM e 50 µM, que correspondem a um valor menor e maior ao IC₅₀, respectivamente. As células foram tratadas por 24 horas. Após o tratamento, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm e o pellet foi lavado em PBS 1x e centrifugado. O pellet foi novamente ressuscitado em 100 µL da solução de tampão de ligação de anexina V (Kit I de Detecção de Apoptose PE Anexina V - BD) na proporção 1:10 de água destilada e em seguida foi adicionado 5 µL de anexina V PE e 5 µL de 7-AAD (Kit de Detecção de Apoptose Anexina V PE - BD). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Logo após, as amostras foram analisadas no citômetro ACURRI C6 (BD) nos canais FITC e PE. Os dados obtidos foram analisados a partir do software Kaluza. A indução de apoptose pelo complexo CBP-01 na linhagem sarcoma 180 também foi observada através de imagens capturadas no microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA).

3.1.8 Teste de Autofagia

A fim de verificar se o composto CBP-01 possui ação autofágica. 2×10^5 de linhagem de sarcoma 180 foi adicionado em uma placa de cultura de 24 poços com 250 µL de meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10 % SFB por poço. Foram utilizadas para o tratamento do complexo de CBP-01 as concentrações de 1, 10 e 50 µM, sendo estas equivalentes a aproximadamente 100, 50 e 0% de viabilidade celular. As células foram tratadas por 24 horas. Após o tratamento, foi adicionado uma solução de 0,05 mM de Monodansilcadaverine (MDC) (Sigma-Brasil) por poço e incubado a 37 °C, no escuro, em estufa 5 % CO₂ por 30

minutos. Em seguida as células foram recolhidas, centrifugadas e o pellet lavado com PBS 1x (3 vezes). O pellet foi ressuspensionado em uma solução de PBS+Glicina 0,1 M e colocados 500 µL dessa solução de células-PBS-Glicina em placa de 24 poços e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss L5M510, Alemanha).

3.1.9 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Existem diversos métodos para quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre eles o uso do 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Para verificar se o composto CBP-01 induz a produção de ROS, a linhagem sarcoma 180 (2×10^5 cels mL⁻¹) foram adicionada em 250 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 24 poços. Esta linhagem celular foi tratada por 24 h com o complexo de cobre CBP-01 nas seguintes concentrações: 1 µM, 10 µM e 50 µM, sendo um valor menor que a IC₅₀, próximo a IC₅₀ e maior que a IC₅₀, respectivamente, encontrado para a linhagem sarcoma 180. Após o tratamento as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e o pellet foi ressuspensionado em PBS 1x, em seguida as células foram centrifugadas novamente. O pellet obtido foi ressuspensionado em sonda ROS (DCFH-DA) (20 µM) e 2 µL 7-AAD diluídos em 100 µL PBS 1x. As células foram incubadas por 1 hora a 37 °C, etapa realizada no escuro. Foi utilizado um controle negativo que não recebeu adição do complexo de cobre e da sonda DCFH-DA+7-AAD, e três controles positivos, aos quais um deles foi adicionado peróxido (100 µM) e a sonda DCFH-DA (20 µM), no outro foi adicionado 7-AAD e no terceiro foi realizado a dupla marcação das células com sonda DCFH-DA e 7-AAD. Após o término da incubação as amostras foram analisadas por citometria de fluxo nos canais FITC e PE. Os dados obtidos foram analisados a partir do software Kaluza. A produção de ROS intracelular na linhagem sarcoma 180 também foi analisada a partir de imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA).

3.2 Testes *in vivo*

3.2.1 Manutenção dos animais

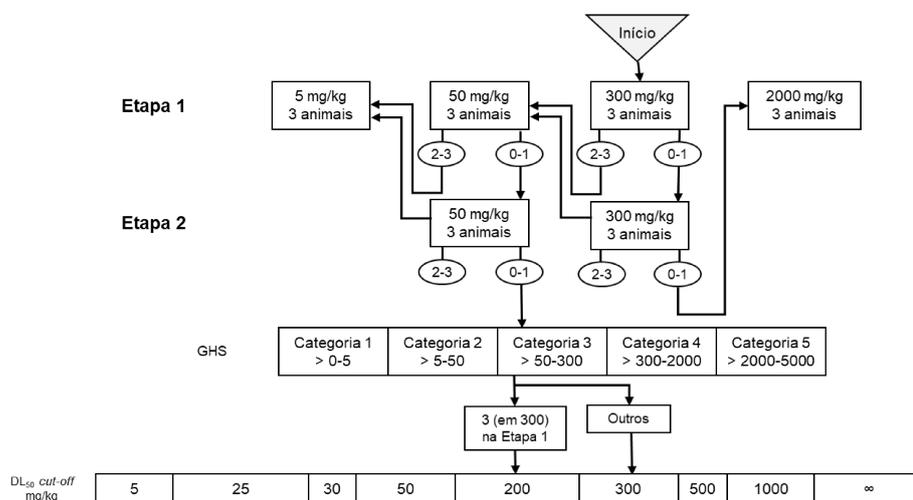
Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob condições controladas. Foram utilizados camundongos isogênicos machos e fêmeas, com peso médio de 25 g e com 8-9 semanas de idade, agrupados em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de 26 ± 2 °C, com ciclos claro-escuro de 12 h. O regime alimentar será o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*. A utilização dos animais nesse trabalho foi possível a partir da aprovação do projeto 141/16 pela Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.2.2 Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀)

A determinação da DL₅₀ foi baseada no protocolo da OECD 423, com intuito de reduzir a quantidade de animais utilizados nesse teste o mesmo foi realizado em etapas. Na primeira etapa, 3 animais Balb/c fêmeas de 8-9 semanas de idade foram pesadas e, em seguida, tratadas com uma dose única do composto CBP-01 de 300 mg kg⁻¹ por via intraperitoneal. Os camundongos foram monitorados durante as primeiras 4 horas após a inoculação do composto, com propósito de avaliar sinais clínicos como piloereção, mobilidade, contração abdominal, postura, reflexo, respiração e força muscular. Em seguida, os animais foram mantidos em gaiolas com ração e água *ad libitum* e observados diariamente por um período de 14 dias para observação dos parâmetros comportamentais. Os camundongos foram pesados no dia 7 e no dia 14. De acordo com o protocolo da OECD 423, se na primeira etapa do experimento morrer de 0-1 animais você deve repetir a mesma, caso contrário se morrerem de 2-3 é necessário realizar a segunda etapa com um tratamento com uma dose inferior, sendo essa 50 mg Kg⁻¹. Desse modo, 3 camundongos balb/c fêmeas foram tratadas com o composto em estudo via intraperitoneal e os mesmos procedimentos realizados na primeira etapa foram executados na segunda fase.

A DL₅₀ foi calculada através do número de mortes de cada etapa de tratamento, como ilustrado na Figura 7.

Figura 7. Esquema experimental do ensaio de toxicidade do complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄ utilizado para calcular a dose letal (Adaptado do protocolo OECD 423).



- Em cada etapa se utilizou animais do mesmo sexo (fêmeas);
 - 0, 1, 2 e 3 são o número de camundongos severamente debilitados ou mortos em cada etapa;
 - GHS: Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (do inglês *Globally Harmonized System of Classification*);

3.2.3 Determinação da atividade antitumoral *in vivo*

Para avaliar a atividade antitumoral do complexo CBP-01 foi utilizado 24 camundongos balb/c machos com 8-9 semanas. Para a indução do tumor sólido foi utilizado a linhagem tumoral de Sarcoma (TG180), que foi mantida *in vivo*, onde foi inoculado 200 µL de PBS contendo 1 x 10⁷ células, no músculo gastrocnêmico direito de cada camundongo. Após 96h da implantação, os camundongos foram separados em 5 grupos: controle negativo (n=6) tratados com PBS totalizando 11 inoculações durante 14 dias; controle positivo (n=6) tratados com cisplatina 3 mg kg⁻¹ totalizando 8 inoculações durante 14 dias; CBP-01 3mg kg⁻¹ (n=6), CBP-01 6 mg kg⁻¹ (n=6) e CBP-01 9 mg kg⁻¹ (n=6), tratados 11 vezes durante 14 dias. A aplicação do composto foi realizada via intraperitoneal. Diariamente, os camundongos foram pesados e seus tumores foram medidos em comprimento e largura com auxílio de um paquímetro digital.

Usando a fórmula estabelecida [comprimento (mm) x largura² (mm) x π] / 6, os tamanhos do tumor foram convertidos no volume do tumor. Em seguida, calculou-se o volume relativo do tumor (VTR), como se segue (CARVALLO-CHAIGNEAU, 2007):

$$\text{VTR} = (\text{volume do tumor no dia 14} / \text{volume do tumor no dia 0}) \times 100$$

A inibição tumoral foi calculada seguindo a fórmula:

Taxa de inibição (%) = $[(A - B) / A] \times 100$. Onde 'A' é a média do volume tumoral do controle negativo e 'B' é o volume tumoral do grupo tratado (BEZERRA *et al.*, 2008).

A porcentagem da perda de peso dos camundongos foi calculada para cada animal, sendo utilizada como parâmetro de toxicidade, a partir da seguinte fórmula: $[(\text{peso no dia 14} / \text{peso no dia 0}) - 1] \times 100$ (CARVALLO-CHAIGNEAU, 2007).

O experimento foi finalizado 24 horas após o último tratamento e os animais foram anestesiados (xilazina e quetamina 1:1, via intraperitoneal) e sacrificados por deslocamento cervical.

3.3 Análises estatísticas

A IC₅₀ (concentração que inibe 50 % do crescimento celular em relação ao controle) será determinada utilizando o programa GraphPad Prism 6.0, a partir de uma regressão não linear, que relaciona o percentual de viabilidade celular em função do logaritmo das concentrações testadas, admitindo-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Por fim, foram plotados gráficos expressos como média \pm erro padrão da média. Os testes *in vitro* e *in vivo* foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism 6.0.

4. Resultados

4.1 Avaliação da citotoxicidade do complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄ *in vitro*

Para verificar o potencial efeito citotóxico do complexo CBP-01 diversas linhagens celulares foram tratadas por 24 h com o mesmo, e a redução da

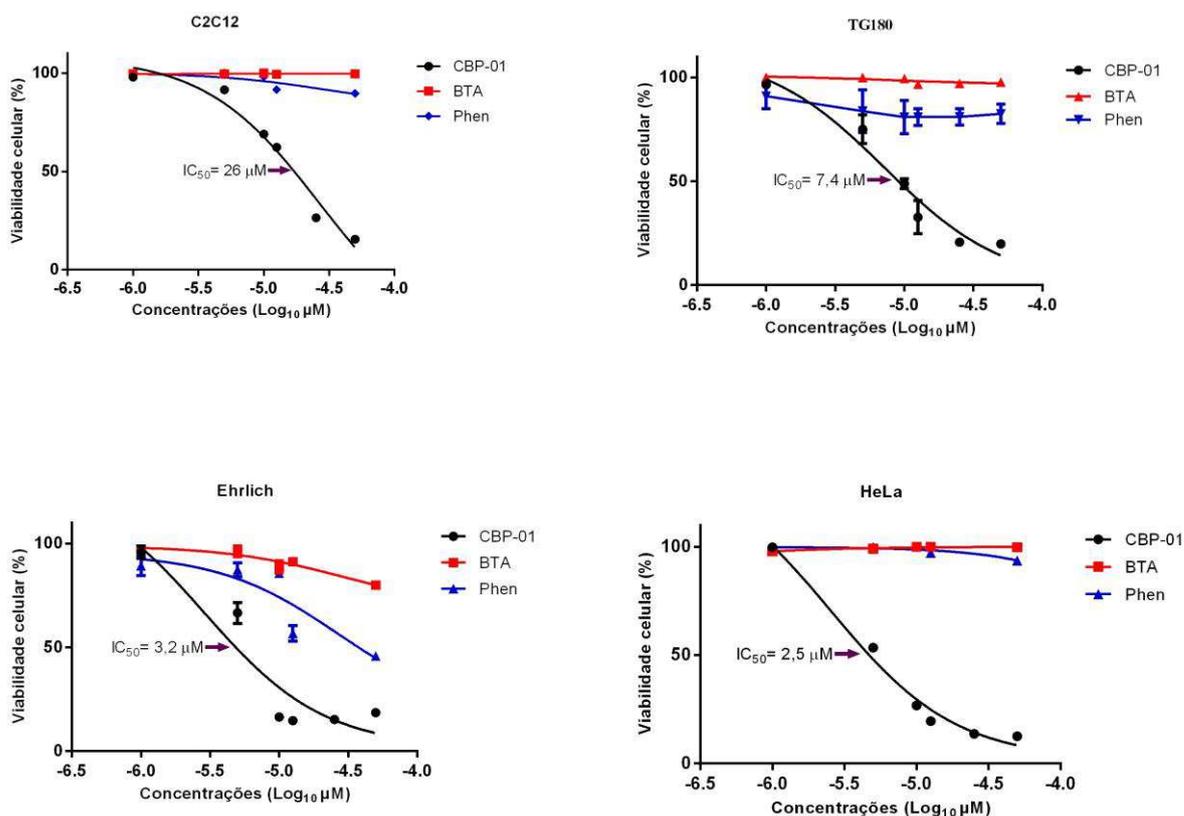
viabilidade celular foi analisada através do ensaio colorimétrico Alamar blue (resasurina). Foi possível analisar uma significativa redução da viabilidade celular das linhagens tumorais Sarcoma 180 (Figura 8, B), Ehrlich (Figura 8, C) e HeLa (Figura 8, D), sendo esta redução concentração-dependente quando comparado com controle (células não tratadas). A IC₅₀ do CBP-01 perante as linhagens tumorais Sarcoma 180, Ehrlich e HeLa foi de, respectivamente, 7,4 µM, 3,2 µM e 2,5 µM (Tabela 2). Além das linhagens tumorais foi testado a citotoxicidade do complexo em estudo na presença da linhagem não tumoral C2C12, com intuito de verificar a seletividade do mesmo. Foi possível observar uma diminuição da viabilidade celular da linhagem C2C12 concentração-dependente (Figura 8, A), porém em níveis menores quando comparado com as linhagens tumorais. A IC₅₀ obtida para a linhagem C2C12 foi de 26 µM, demonstrando assim uma seletividade do composto perante as células tumorais (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (µM) e índices de seletividade (IS) calculados para o complexo Cu(BTA)(Phen)ClO₄

| | C2C12 | Sarcoma 180 | Ehrlich | HeLa |
|--------------------|--------------|--------------------|----------------|-------------|
| Cu(BTA)phen | 26,0 | 7,4 | 3,2 | 2,5 |
| IS | – | 3,51 | 8,13 | - |

Os ligantes β-dicetona (BTA) e fenantrolina (Phen) associados ao cobre, também foram testados isoladamente perante as linhagens tumorais e não tumoral, com o intuito de verificar se a citotoxicidade deve-se realmente à complexação do cobre com estes componentes, ou se deve apenas a algum desses ligantes do complexo isolados. Não foi possível calcular a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) para os ligantes BTA e Phen isolados, pois estes apresentaram citotoxicidade estatisticamente insignificante em relação ao controle (Figura 8, A-D).

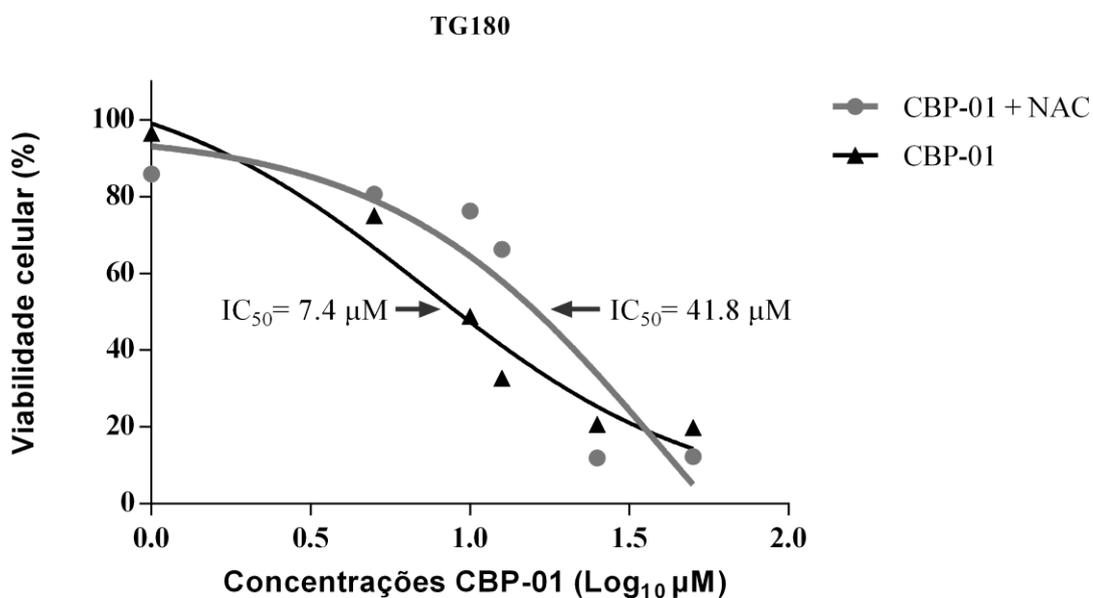
Figura 8. Curva concentração-dependente da viabilidade celular das linhagens A) C2C12, B) Sarcoma 180, C) Ehrlich e D) HeLa, tratadas com CBP-01 e os ligantes BTA e Phen. Cada ponto representa média \pm erro padrão de 2 experimentos independentes.



4.2 Avaliação da citotoxicidade do Cu(BTA)(phen)ClO₄ em associação com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) *in vitro*

A linhagem tumoral Sarcoma 180 foi co-tratada por 24 h com o complexo CBP-01 e NAC (antioxidante, remove espécies reativas de oxigênio (ROS)), com finalidade de avaliar se ROS desempenha uma função crucial para a citotoxicidade do metalocômplexo em estudo. Foi possível notar que o NAC efetivamente reduziu o efeito citotóxico do complexo CBP-01 em Sarcoma 180, visto que a IC₅₀ sem associação do NAC foi de 7,4 μM e com a associação do NAC, esse valor passou a ser de 41 μM, como ilustrado na Figura 9.

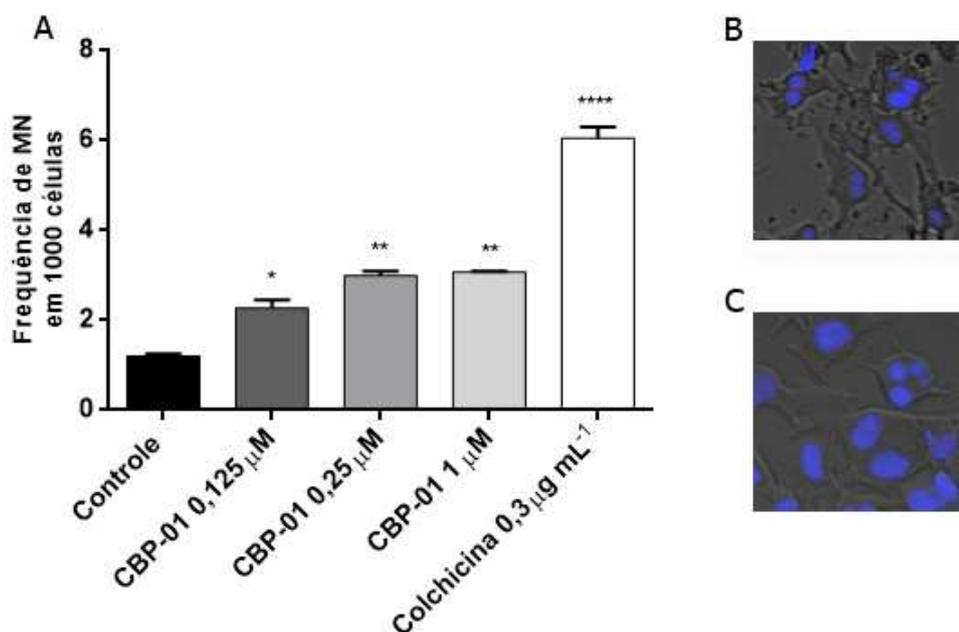
Figura 9. Curva concentração-dependente da viabilidade celular da linhagem Sarcoma 180, tratadas com Cu(BTA)(Phen)ClO₄ e em associação com N-acetilcisteína (NAC). Cada ponto representa média ± erro padrão de 2 experimentos independentes.



4.3 Avaliação da genotoxicidade do Cu(BTA)(phen)ClO₄ pelo teste de micronúcleo *in vitro*

O potencial genotóxico do complexo metálico CBP-01 foi analisado após o tratamento com o mesmo por 24 h, a partir da quantificação de 1000 células binucleadas que poderiam apresentar micronúcleo (Figura 10, B-C). O complexo CBP-01 demonstrou atividade genotóxica, uma vez que foi possível observar um aumento na frequência de micronúcleos contabilizados em células binucleadas tratadas com o composto quando comparado com o controle (células não tratadas), como demonstrado na Figura 10, A.

Figura 10. (A) Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrados nas células binucleadas após tratamento com Cu(BTA)(Phen)ClO₄. (B) e (C) Imagens representativas de micronúcleos encontrados em células binucleadas no tratamento CBP-01 1 μM e no controle positivo (Colchicina), respectivamente. Os dados representam a média ± erro padrão de 2 replicatas biológicas. *p < 0,05, **p < 0,01 e ****p < 0,0001 (comparado com o controle).

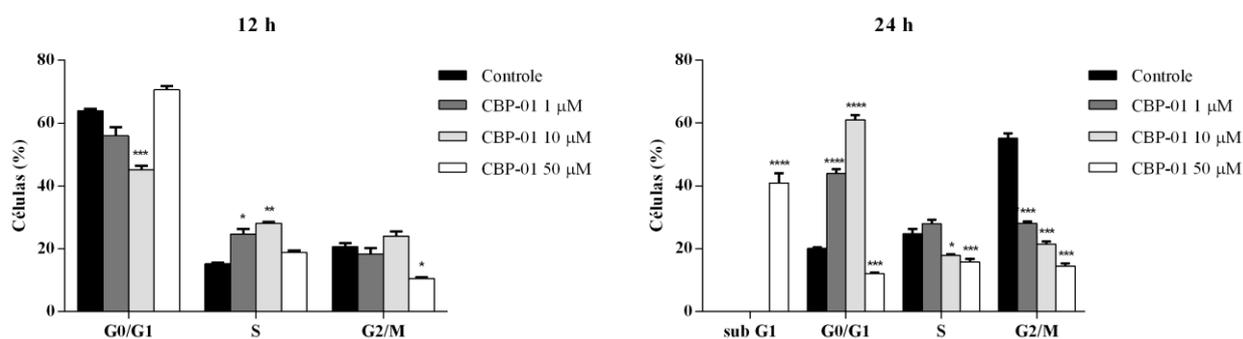


4.4 Avaliação da progressão do ciclo celular após exposição com Cu(BTA)(phen)ClO₄ *in vitro*

Para avaliar o efeito do complexo CBP-01 na proliferação celular, a linhagem tumoral Sarcoma 180 foi tratada com o composto por 12 h e 24 h, e a distribuição das células em cada fase do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo após marcação dos núcleos celulares com iodeto de propídeo. Pode ser observado um aumento de células na fase G₀/G₁ após 12 h de tratamento com CBP-01 de 64 % no controle para 70,6 % no tratamento de 50 μM. De modo similar, após 24 h de tratamento com o CBP-01 houve um acúmulo de células na fase G₀/G₁ passando de 20 % no controle para 43 % no tratamento de 1 μM e 54 % no tratamento de 10 μM. Já após 24 h de tratamento a concentração de 50 μM de CBP-01 apresentou uma população de células na fase sub-G₁ de 46,6%, o que justifica a redução de células na fase G₀/G₁ (12,6%). Desse modo, o

complexo CBP-01 apresentou inibição da proliferação celular, no qual ocorre um aprisionamento das células na fase G0/G1 (Figura 11).

Figura 11. Gráfico representativo da distribuição das células em cada fase do ciclo celular após tratamento de 12 h e 24 h com o complexo Cu(BTA)(Phen)ClO₄ na linhagem sarcoma 180. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 replicatas biológicas. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 (comparado com o controle).



4.5 Avaliação da indução de apoptose pelo complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄ *in vitro*

Para constatar qual via de morte celular é induzida ao ser tratada com o complexo CBP-01 foi utilizado um ensaio apoptótico, no qual a linhagem tumoral Sarcoma 180 foi marcada com anexina V (fluorescência verde) e 7-AAD (fluorescência vermelha). Como ilustrado na Figura 12 o complexo CBP-01 desencadeou o processo de apoptose por ser possível observar a presença de corpos apoptóticos na linhagem Sarcoma 180, na concentração de 50 μM (Figura 12, A). Além disso, houve um aumento na taxa de apoptose de 1,23 % no grupo controle (células não tratadas) para 96,47 % no tratamento com 50 μM. Desse modo, após 24 h de tratamento o complexo CBP-01 induziu apoptose tardia, ou seja, apresentou dupla marcação nas células (Figura 12, A).

Figura 12. Imagem representativa das células de sarcoma 180 (A) tratadas com 50 μM de $\text{Cu}(\text{BTA})(\text{Phen})\text{ClO}_4$ (célula com corpos apoptóticos apontada pela seta e evidenciada) e (B) do controle não tratado

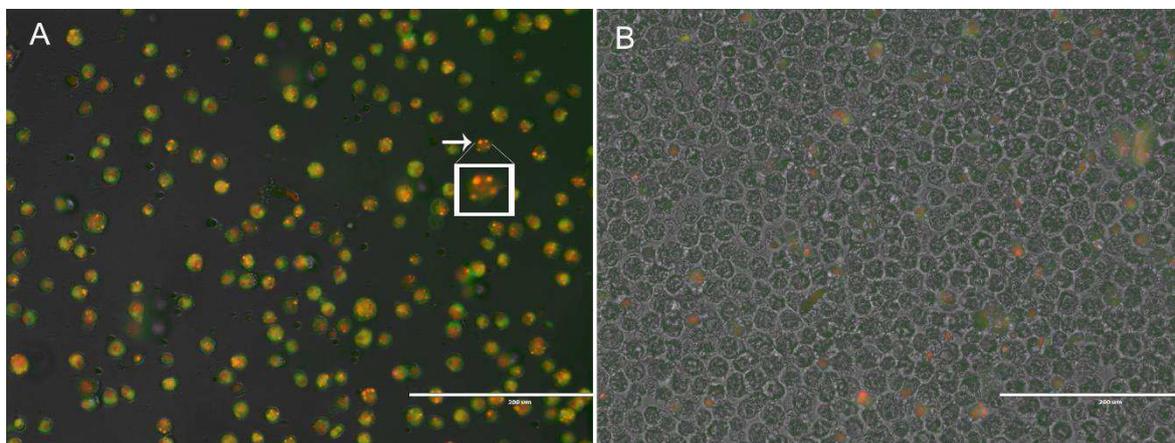
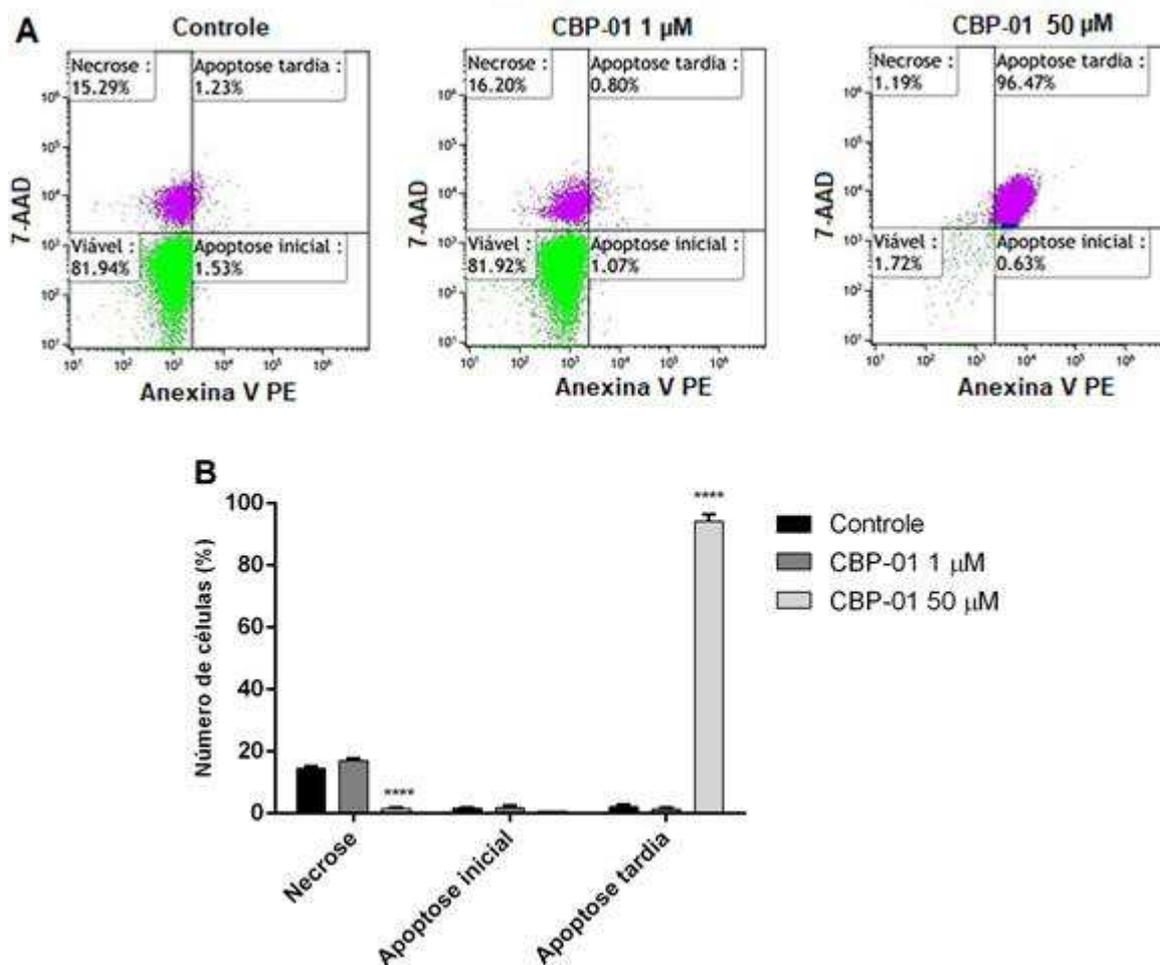


Figura 13. (A) Citogramas de anexina V PE e 7AAD de células sarcoma 180 após serem tratadas por 24 h com Cu(BTA)(Phen)ClO₄. (B) Gráfico representativo da porcentagem de células em necrose, apoptose inicial e apoptose tardia. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 replicatas biológicas. ****p < 0,0001 (comparado com o controle não tratado).

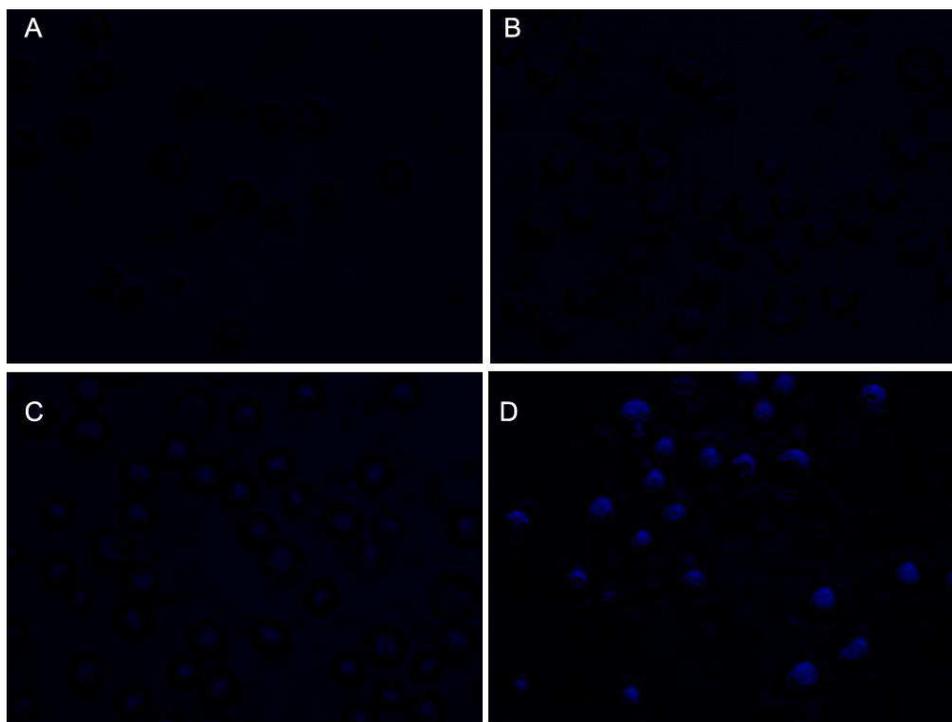


4.6 Avaliação de indução de autofagia pelo complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄ *in vitro*

O complexo CBP-01 estimulou o processo de autofagia de forma concentração-dependente na linhagem sarcoma 180, uma vez que foi possível evidenciar a presença de fluorescências pontuais de monodansilcadaverina (MDC) no citoplasma das células tratadas. Não foi possível observar a mesma fluorescência no citoplasma das células do controle (não tratadas), como ilustrado

na Figura 14. Esses resultados indicam que o complexo CBP-01 aumentou o recrutamento de MDC para os autofagossomos presentes no citoplasma das células tratadas.

Figura 14. Imagem representativa da ação autofágica do complexo $\text{Cu}(\text{BTA})(\text{Phen})\text{ClO}_4$ perante a linhagem tumoral sarcoma 180. (A) controle não tratado; (B) CBP-01 1 μM , (C) 10 μM e (D) 50 μM

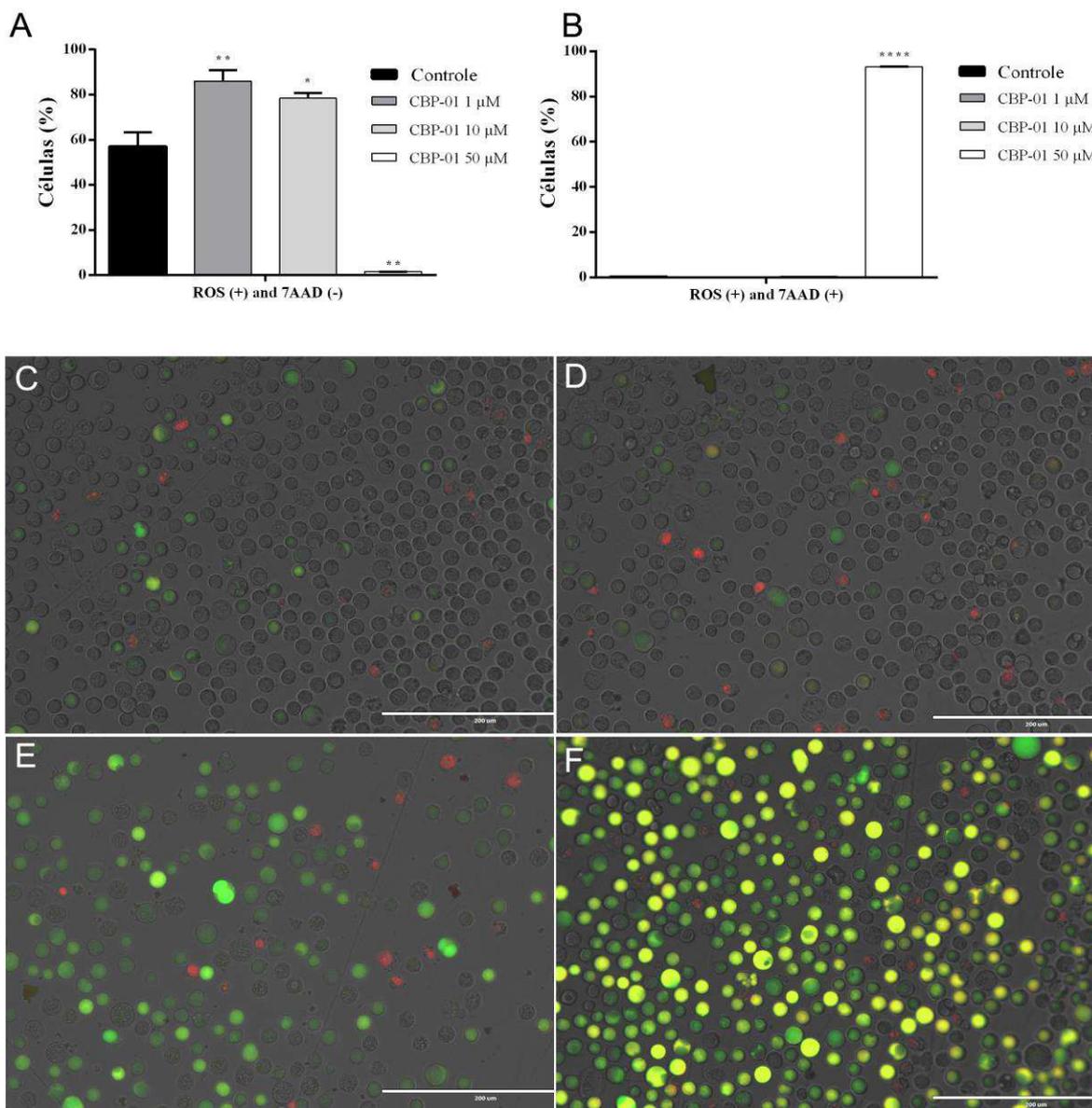


4.7 Avaliação da produção de ROS pelo composto $\text{Cu}(\text{BTA})(\text{phen})\text{ClO}_4$ *in vitro*

A capacidade de alguns agentes antineoplásicos de eliminar células tumorais está relacionada com a sua capacidade de gerar ROS (TREJO-SÓLIS *et al.*, 2005). Desse modo, foi investigado se o complexo CBP-01 tem a capacidade de gerar ROS e, conseqüentemente, causar citotoxicidade a linhagem tumoral Sarcoma 180 após 24 h de tratamento. Para isso, foi utilizado o teste de fluorescência para mensurar a produção intracelular de ROS a partir da produção de 2',7' diclorofluoresceína (DCF). Além disso, foi verificado se eram as células viáveis que estavam produzindo ROS pela marcação com 7-AAD. O resultado

obtido mostrou um aumento na produção de ROS, sendo que foi possível observar que CBP-01 nas concentrações de 1 e 10 μM induziu maior produção de ROS nas células tumorais viáveis (7AAD -)(Figura 15, A) e na concentração de 50 μM pode ser observado um aumento exacerbado na produção de ROS nas células inviáveis (7AAD +), como ilustrado na Figura 15, B. Houve um aumento de 56,87 % de células viáveis produzindo ROS no controle para 85,96 e 78,49 % nas concentrações de 1 μM e 10 μM , sendo possível observar uma redução significativa na produção de ROS nas células viáveis presentes na concentração de 50 μM ; porém foi possível observar um grande aumento na produção de ROS nas células mortas presentes na concentração de 50 μM , sendo esta correspondente a 93,25 %. O mesmo resultado foi confirmado a partir das imagens obtidas pela microscopia de fluorescência, no qual pode ser observado que as concentrações de 1 e 10 μM apresentaram fluorescência apenas para a produção de ROS, sendo assim 7AAD negativas, ou seja, houve um aumento na produção de ROS nas células viáveis. Já na concentração de 50 μM foi possível visualizar uma dupla marcação nas células, ou seja, as células que produzem ROS são 7AAD positivas (estão mortas), como demonstrado na Figura 15, C-F.

Figura 15. (A) Gráfico representativo da produção de ROS em células viáveis (7AAD -) e (B) mortas (7AAD +). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ (comparado com o controle). Imagens representativa da produção de ROS na linhagem sarcoma 180. (C) controle não tratado, células tratadas com Cu(BTA)(Phen)ClO₄ a (D) 1 μ M, (E) 10 μ M e (F) 50 μ M.



4.8 Avaliação da toxicidade do complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄ *in vivo*

A toxicidade do complexo CBP-01 *in vivo* foi avaliada em camundongos fêmeas com duas doses (300 mg kg⁻¹ e 50 mg kg⁻¹) do complexo, sendo estas administradas em etapas diferentes (de acordo com a OECD 423), via

intraperitoneal. Para verificar o potencial efeito tóxico do complexo CBP-01 foi inoculada uma única dose de 300 mg Kg⁻¹ em 3 camundongos fêmeas, na primeira etapa do teste. Logo na primeira hora após a inoculação foi possível observar contração abdominal intensa, postura encurvada dos três camundongos e resposta lenta ao toque. Ao completar duas horas os camundongos continuaram a apresentar os mesmos sintomas e mais outros como respiração ofegante, piloereção e prostração. Com 3 horas 1 dos camundongos morreu e os outros dois não se movimentavam mais e não tinham capacidade de voltar para a posição horizontal. Ao completar 4 horas após a inoculação, os dois animais que restaram foram sacrificados devido ao sofrimento apresentado pelos mesmos.

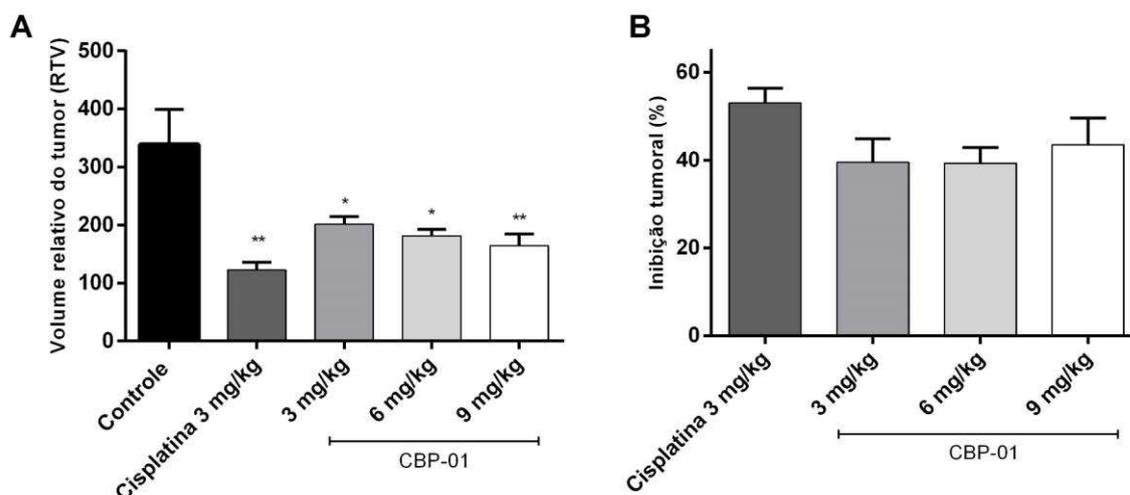
Sabendo disso, o próximo passo foi inocular uma dose inferior ao da primeira etapa do teste, sendo esta de 50 mg kg⁻¹. Já na primeira hora um dos camundongos apresentou contração abdominal intensa, prostração, com postura encurvada, baixa resposta ao toque e dificuldade para respirar. O mesmo camundongo foi encontrado morto ao completar 48 horas após a inoculação do composto. Os outros dois camundongos não apresentaram nenhum sintoma clínico durante os 14 dias de observação. De acordo com o protocolo OECD 423, se 0-1 animal morrer é necessário repetir a mesma dose, e assim fizemos. Foi possível observar após 4 horas da inoculação do complexo CBP-01 que dois dos três animais apresentavam contração abdominal intensa, postura encurvada e pouca piloereção. Os sintomas clínicos não foram mais observados após 24 horas da inoculação, nesse ensaio nenhum dos camundongos morreu.

De acordo com a OECD 423, que utiliza como base a classificação fornecida pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), o complexo a base de cobre(II) CBP-01 está enquadrado na categoria 3, ou seja, a dose letal (DL₅₀) está estimada entre 50 – 200 mg kg⁻¹ (acima de 89,5 µmol kg⁻¹), sendo esta categoria considerada de toxicidade moderada.

4.9 Avaliação da redução tumoral do complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄ *in vivo*

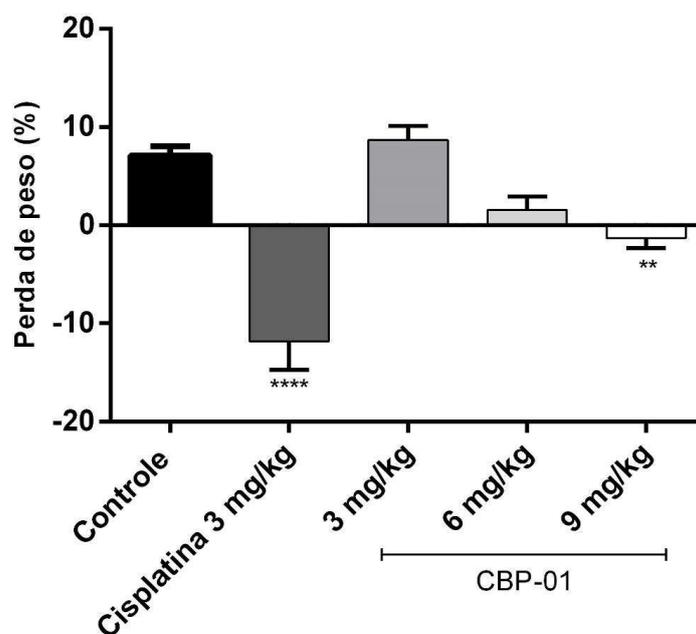
Com intuito de verificar se o complexo CBP-01 apresenta atividade antitumoral *in vivo* foi calculado o volume relativo do tumor (VTR) e partir do VTR foi possível obter os valores de redução do tumor sólido de sarcoma 180, comparando o mesmo com o controle não tratado (PBS) e com a cisplatina (controle positivo). Os resultados obtidos do VTR dos tumores demonstram que os camundongos tratados com CBP-01 (6 e 9 mg kg⁻¹) apresentaram uma desaceleração do crescimento do tumor sólido. Visto que no 14^o dia a média de VTR dos tumores do controle (PBS) foi de 310,8 ± 54,56 e dos tratados com 6 mg kg⁻¹ e 9 mg kg⁻¹ foram de 193,6 ± 11,18 (p < 0,02) e 186,9 ± 19,04 (p < 0,02), respectivamente (Figura 16, A). Além disso, foi possível observar que o complexo foi capaz de reduzir o tumor sólido em 35,24 ± 3,3 %, 39,3 ± 3,6 % e 43,51 ± 6,1 %, respectivamente, nas doses de 3 mg kg⁻¹, 6 mg kg⁻¹ e 9 mg kg⁻¹. Vale ressaltar que, não houve diferença significativa entre a redução apresentada com o tratamento da cisplatina e os tratamentos com CBP-01 6 mg kg⁻¹ e 9 mg kg⁻¹ (Figura 16, B).

Figura 16. Efeitos observados *in vivo* após o tratamento do tumor sólido sarcoma 180 com o complexo Cu(BTA)(phen)ClO₄. (A) Redução do VTR. *p < 0,02 e **p < 0,002 (comparado com PBS – controle não tratado). (B) Inibição do desenvolvimento do tumor sólido.



Com intuito de verificar a toxicidade produzida após o tratamento com o complexo CBP-01 *in vivo*, a porcentagem de perda de peso dos camundongos foi calculada. Ao comparar os valores da média da perda de peso dos grupos dos animais tratados com o grupo controle, foi possível observar uma redução de 11 % e 1,3 % nos animais tratados com cisplatina 3 mg kg⁻¹ e CBP-01 9 mg kg⁻¹, respectivamente. Outro dado observado foi o ganho de peso do controle (PBS) e dos tratados com 3 mg kg⁻¹ e 6 mg kg⁻¹, sendo respectivamente de 7,1 %, 8,7 % e 1,5 % (Figura 17).

Figura 17. Efeitos colaterais associados a porcentagem de perda de peso dos camundongos tratados com diferentes doses do complexo metálico Cu(BTA)(phen)ClO₄. **p < 0,004 e ****p < 0,0001 (comparado com o controle).



5. Discussão

O sucesso do uso da cisplatina como uma droga antineoplásica instigou o avanço de novas pesquisas na área farmacêutica para (GUO *et al.*, 2010) a identificação, caracterização e desenvolvimento de novos complexos a base de metais como agentes quimioterapêuticos (MA *et al.*, 2014). Dentre os complexos metálicos, os a base de cobre vêm demonstrando suas potencialidades como

agentes antitumorais por apresentarem a capacidade de se ligar e clivar o DNA e, conseqüente, induzir a morte das células tumorais (BORGES *et al.*, 2016). Além disso, diversos estudos envolvendo complexos de cobre indicam que estes apresentaram potencial atividade antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SERMENT-GUERRERO *et al.*, 2011). No presente trabalho foi investigado o potencial da atividade antitumoral do complexo de cobre Cu(BTA)(phen)ClO₄ (CBP-01) a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular que interfere na capacidade adaptativa das células, bem como na sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. Os resultados obtidos indicam que o complexo metálico CBP-01 é significativamente citotóxico, mostrando uma resposta concentração-dependente, em relação ao grupo controle não tratado. Os ligantes associados ao complexo metálico, BTA (4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona) e Phen (1,10-fenantrolina), também foram testados isoladamente e não apresentaram citotoxicidade significativa, desse modo, a atividade citotóxica é devida ao complexo visto que o mesmo foi mais ativo que os ligantes livres, não coordenados.

Santos e colaboradores (2016) testaram a citotoxicidade do sulfato de cobre (CuSO₄) nas linhagens de colon (Caco-2) e fígado (Hep-G2) humano, obtendo uma IC₅₀ de, respectivamente, 300 µM e 700 µM. Tal resultado deixa claro que a formação de complexos é crucial para aumentar sua atividade citotóxica, pois no presente trabalho foram obtidos IC₅₀ menores que 10 µM, justificando assim a complexação dos ligantes BTA e Phen ao complexo metálico a base de cobre testado. Além do mais, o cobre(II) é muito mais ativo na presença de ligantes heterocíclicos contendo nitrogênio como átomo doador, tal como, 1, 10-fenantrolina (SILVA *et al.*, 2011).

A citotoxicidade observada no complexo CBP-01 o torna um promissor agente quimioterápico, visto que foram necessárias baixas concentrações do complexo para inibir 50% da viabilidade das linhagens celulares estudadas. Alémon-Medina e colaboradores (2007) testaram diversos compostos, também a base de cobre, da família das Casiopeínas[®], dentre eles o subgrupo [Cu(N-N)(acac)]NO₃: Cas-III-E-a (Aqua(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)cobre(II)nitrato) e Cas-III-H-a (Aqua(4,7-difenil-1,10-

fenantrolina)(acetilacetato)cobre(II)nitrato), perante a linhagem HeLa demonstraram uma redução de viabilidade de 26,2 % \pm 8 e 89,1 % \pm 1,4 ao ser tratada com a concentração de 100 μ M desses compostos, respectivamente. No presente trabalho, a maior concentração do CBP-01 utilizada foi de 50 μ M que mostrou a capacidade de reduzir a viabilidade das linhagens tumorais HeLa, Sarcoma 180 e Ehrlich em, respectivamente, 87,4 \pm 1,9, 79,63 \pm 0,73 e 86,45 \pm 1. Sendo assim, as Casiopeínas do subgrupo III precisaram de uma concentração 2 vezes maior que a utilizada no nosso trabalho para reduzir 80% da viabilidade da linhagem HeLa, mostrando que o CBP-01 possui maior capacidade de redução da viabilidade celular da linhagem tumoral.

Lima e colaboradores (2014) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* da cisplatina utilizando a linhagem celular Sarcoma 180, o qual a IC₅₀ foi de 64,83 μ M. Porto e colaboradores (2015) também testaram a citotoxicidade da cisplatina, porém foi utilizado a linhagem Ehrlich e obtiveram a IC₅₀ de 62,42 μ M. Putral e colaboradores (2005) avaliaram a citotoxicidade da cisplatina perante a linhagem HeLa e obtiveram uma IC₅₀ de 9,4 μ M. As concentrações inibitórias de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) obtidas nos trabalhos citados anteriormente foram superiores às obtidas no presente trabalho, que na linhagem Sarcoma 180 foi de 7,4 μ M, no tumor de Ehrlich foi de 3,2 μ M e HeLa foi de 2,5 μ M. Assim, foi necessária respectivamente, uma concentração 6,5 vezes, 3,75 vezes e 19,5 vezes menor do complexo CBP-01 para reduzir 50% da viabilidade celular destas linhagens. Quando comparado com a cisplatina, uma droga amplamente utilizada para o tratamento de diversos tipos de tumores, podemos observar que CBP-01 foi mais efetivo para as linhagens utilizadas.

De acordo com dados obtidos na literatura podemos dizer que a citotoxicidade do complexo CBP-01 pode ser explicada, em partes, pela presença de níveis maiores de cobre nos cânceres humanos de sarcoma, mama, colo do útero (SAGHIRI *et al*, 2015), quando comparado com células saudáveis (FREZZA *et al.*, 2010). Ao tratar linhagens celulares desses mesmos tipos de cânceres com o CBP-01, comparando com uma linhagem não tumorigênica (mioblasto C2C12), obtivemos um índice de seletividade maior que 3, ou seja, o complexo CBP-01 é 3 vezes mais seletivo para célula tumoral do que em célula não tumoral. Índices de

seletividade maiores que 3 são considerados seletivo (MAHAVORASIRIKUL *et al.*, 2010).

Foi possível observar que além de citotóxico o complexo CBP-01 foi genotóxico. Um composto é considerado genotóxico quando o mesmo tem a capacidade de danificar o DNA, sendo este dano na forma de quebra da cadeia simples ou dupla do DNA, perda do reparo por excisão, formação de ligações cruzadas (“cross-linking”), alquilação, mutações pontuais ou cromossômicas (numéricas ou estruturais) (NAGARATHNA *et al.*, 2013). A genotoxicidade do complexo em estudo foi verificada a partir da análise de micronúcleos presentes em células interfásicas, nas quais são encontrados como pequenos corpos extranucleares, podendo representar fragmentos de DNA ou cromossomos que não foram incorporados aos núcleos principais (SHIBAI-OGATA *et al.*, 2011). Os micronúcleos foram quantificados em células que passaram por um ciclo de divisão nuclear completo, sendo assim, somente as células binucleadas foram analisadas. O reagente utilizado para garantir que as células passaram por uma divisão nuclear completa é a citocalasina-B (Cyt-B), um inibidor da polimerização da actina que impede a formação do anel de microfilamentos responsável em separar as células filhas, ou seja, a Cyt-B inibe a citocinese (FENECH, 2000). Desse modo, o aumento na quantidade de micronúcleos contabilizados após tratamento com o complexo CBP-01 indica que o mesmo tem ação sobre o DNA, podendo esta ser direta ou indireta. Outros estudos envolvendo complexos à base de cobre também obtiveram resultados que demonstram que os mesmos atuam sobre a molécula de DNA, como Serment-Guerrero e colaboradores (2011) com as Casiopeínas, Zhang e colaboradores (2004) com o complexo [Cu(phen)(L-Thr)(H₂O)](ClO₄) e Silva e colaboradores (2014) com quatro complexos a base de cobre(II) associados a hidrazida (Hyd) ou tiofeno 2-carbohidrazida (Shyd) e 2,2'-bipiridina (byp) ou fenantrolina (phen). Uma possível justificativa para a interação do nosso composto com o DNA seria a presença da 1,10-fenantrolina em sua estrutura, a qual é considerada um agente intercalante de DNA e uma nuclease artificial quando associada ao cobre. Além disso, estudo com bis(1,10-fenantrolina) mostrou sua capacidade de clivar a molécula de DNA na presença de tiol e peróxido de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2004).

O ciclo celular é composto por 4 fases, sendo elas G1, S, G2 e M. Em linhas gerais, a fase G1 é caracterizada pela preparação da célula para a síntese de DNA; na fase S ocorre a síntese do mesmo; durante a fase G2 a célula se prepara para a mitose e na fase M, a célula se divide dando origem a duas células filhas. A progressão do ciclo celular é controlada por pontos de checagens que são responsáveis pela verificação da integridade celular, desse modo, o sistema de controle bloqueia a progressão do ciclo celular caso detecte algum problema intra- ou extracelular (ALBERTS *et al.*, 2010). Células com dano no DNA são aprisionadas no gap1 (G1) ou no gap2 (G2), se ocorrer algum problema durante a replicação do DNA as células são acumuladas na fase S, e se existir algum dano com os fusos mitóticos as células são aprisionadas na fase M (CONCKLIN, 2004). No presente trabalho foi possível verificar a atividade antiproliferativa do composto CBP-01, dado que o mesmo causa aprisionamento das células na fase G0/G1 concentração-dependente. O aprisionamento de células nessa fase pode estar relacionado com possíveis danos no DNA, sendo este fato demonstrado anteriormente, pela capacidade do complexo em estudo de aumentar a quantidade de micronúcleos. Esse resultado corrobora com outros estudos envolvendo complexos de cobre que demonstraram que os mesmos interrompem o ciclo celular através do aprisionamento das células na fase G0/G1 (TREJO-SÓLIS *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2017; RAJALAKSHMI *et al.*, 2012). Além disso, o surgimento de uma população de células na fase sub-G1 após o tratamento com CBP-01 50 µM por 24 h está correlacionado com o resultado obtido dos índices de apoptose nessas mesmas condições (seção 4.5 – página 37), pois acúmulo de células na fase sub-G1 está relacionado com danos irreversíveis no DNA dos quais foram detectados e, sendo assim, a célula foi induzida a morte por apoptose (AHAMED *et al.*, 2016).

Quando ocorre a interrupção da progressão do ciclo celular e as células são aprisionadas em algum ponto de checagem, elas podem ter dois destinos: correção do dano detectado nas células (p.ex. por mecanismos de reparo do DNA) ou, se o dano for irreversível, as células são induzidas à apoptose (CONCKLIN, 2004). Sabendo que o complexo CBP-01 aprisiona as células na fase G0/G1, possivelmente por danos causados no DNA, o próximo passo foi

identificar qual via de morte celular foi induzida ao tratar as células com o nosso complexo.

A apoptose é um tipo de morte celular que não induz resposta inflamatória, sendo caracterizada por diversas alterações morfológicas e bioquímicas nas células, dentre elas podemos destacar a condensação nuclear, formação de corpos apoptóticos e externalização da fosfatidilserina (PS) presente na membrana plasmática (JAYAKIRAN, 2015). Esses eventos podem ser quantificados a partir de marcadores fluorescentes como a anexina V e o 7-AAD, que caracterizam o estágio de apoptose das células. A anexina V é membro de uma família de anexinas que possuem afinidade por fosfolipídeos que apresentam carga negativa, como a fosfatidilserina. Desse modo, ao ser externalizada pela célula que recebeu estímulos pró-apoptóticos, a PS se torna alvo de ligação da anexina V (HENRY et al., 2013), caracterizando assim o estágio inicial de apoptose. O 7-aminoactinomicina D (7-AAD), derivado da actinomicina D, se liga seletivamente em regiões ricas em guanina-citosina (GC) no DNA. Desta maneira, é utilizado para marcar células em apoptose tardia, visto que sua permeabilidade na membrana celular e intensidade de fluorescência é baixa em células em apoptose inicial e alta em células na apoptose tardia (ZEMBRUSKI *et al.*, 2012). Sabendo disso, a dupla marcação visualizada em todas as concentrações utilizadas do complexo CBP-01 indica apoptose tardia, que foi comprovada a partir de imagens de microscopia nas quais mostraram a presença de corpos apoptóticos nas células e, também, apresentaram marcação com anexina V e 7-aad. A indução de apoptose pelo CBP-01 foi concentração-dependente. Os mesmos resultados foram encontrados por outros autores como Haleel e colaboradores (2016) com seu complexo $[Cu(L^{1-3})(diimina)]ClO_4$ (cobre associado a três tetrazol e duas diiminas (bipiridina ou fenantrolina)), e Zhou e colaboradores (2016) com complexo de cobre(II) associado a bases de Schiff $[Cu(R/S-L^{1-2})_2]EtOAc$, visto que a apoptose é um dos mecanismos de morte mais comumente induzido pelos agentes quimioterápicos em diversas células tumorais (HALEEL *et al.*, 2016).

Para tentar entender o possível mecanismo de ação do complexo CBP-01 responsável pela indução da apoptose, foi analisado a produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) a partir do uso da sonda DCFH-DA. DCFH-DA é um

precursor não fluorescente do DCF que pode ser utilizado como sonda intracelular para estresse oxidativo, visto que ele é permeável as células. Uma vez no interior da célula o DCFH é clivado por esterases dando origem ao H₂DCF, um produto membrana-impermeável não fluorescente. O acúmulo intracelular e subsequente oxidação deste produto origina o DCF, altamente fluorescente. Desse modo, é possível quantificar as ROS a partir dos danos oxidativos causados pelas mesmas, o que proporciona a oxidação do H₂DCF e possibilita a detecção do estado redox das células a partir do aumento na fluorescência, devido ao acúmulo de DCF nas células (ERUSLANOV e KUSMARTSEV, 2010).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são pequenas moléculas que podem ser provenientes da redução do oxigênio como o anion superóxido (O₂⁻) e o radical hidroxil (HO[•]) ou não ser derivado do oxigênio, como no caso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em baixas concentrações, ROS são consideradas essenciais para a homeostasia das células, de modo a regular a progressão do ciclo celular, proliferação, diferenciação, migração e morte celular (REDZADUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016). Contudo, altos níveis de ROS podem gerar danos diretos ou indiretos em proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e diversas organelas (p.ex. mitocôndrias), ocasionados pelo estresse oxidativo (RAY *et al.*, 2012). Desse modo, em linhas gerais, ROS em baixas concentrações estão diretamente relacionados com a sobrevivência das células, mas em altos níveis elas são responsáveis por induzir a morte celular, como a apoptose (REDZADUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016).

Diversos estudos relatam o aumento da produção ROS causados por complexos metálicos a base de cobre (LOW *et al.*, 2017; QUIN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2017; TREJO-SÓLIS *et al.*, 2012). No presente estudo foi possível observar um aumento na concentração de ROS após o tratamento com 50 µM do complexo CBP-01, sendo esta produção de ROS presente nas células positivas para 7-AAD, ou seja, nas células mortas. Esse dado indica que, possivelmente, o complexo CBP-01 aumenta a produção de ROS gerando estresse oxidativo na linhagem tumoral Sarcoma 180 e, conseqüentemente, induz a parada do ciclo celular e apoptose. O possível estresse oxidativo causado pelo complexo em estudo pôde ser evidenciado pela presença de autofagia, após o tratamento com CBP-01 nas células de Sarcoma 180, assim como foi visualizado em outros

estudos com complexos de cobre (TREJO-SÓLIS *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2010) e nanopartículas de cobre (LAHA *et al.*, 2014).

A autofagia é um mecanismo fisiológico que contribui para a homeostasia celular através do sequestro de organelas e citosol no interior de uma vesícula de membrana dupla (autofagossomo). O autofagossomo é responsável por direcionar o conteúdo do seu interior para o lisossomo, que por sua vez, é encarregado de degradar e reciclar as macromoléculas dando origem a nutrientes que poderão ser utilizados pela célula durante algum estresse (p. ex. hipóxia, restrição de nutrientes, desbalanço hormonal, estresse oxidativo) (REDZADUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016). Além dessa função fisiológica, a autofagia também pode estar relacionada com a morte celular. Em condição de estresse oxidativo, a autofagia reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) para proteger as células de possíveis danos causados por ROS. Entretanto, quando o estresse oxidativo atinge níveis que prejudicam a ação dos mecanismos de proteção da célula, ocorre uma disfunção da autofagia causada pelo excesso de indução da mesma, desencadeando assim, a morte celular por apoptose ou morte por autofagia (LEE *et al.*, 2014). Sabendo disso, as fluorescências pontuais de monodansilcadacerina (MDC) presentes no citoplasma das células de Sarcoma 180, após tratamento com CBP-01, indicam a indução de autofagia, provavelmente, causada pelo aumento de ROS no interior das mesmas. Desse modo, a linhagem tumoral Sarcoma 180 utilizou da autofagia como mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, porém, devido aos níveis exacerbados de ROS, houve uma disfunção da autofagia que proporcionou a morte celular via apoptose, como apresentado nos dados anteriores.

Para reafirmar a nossa teoria que ROS está relacionado com a indução da morte celular, a linhagem sarcoma 180 foi co-tratada com CBP-01 e o antioxidante N-acetilcisteína (NAC). O NAC é composto pelo aminoácido cisteína (possuí grupo sulfidril) e o grupo acetil ligado ao grupamento amino (NH₂), que confere atividade antioxidante por ter capacidade de remover espécies reativas de oxigênio e por ser precursor na síntese de glutathiona intracelular. Desta forma, o NAC tem a capacidade de restaurar o equilíbrio redox por meio da redução do estresse oxidativo (DOROTA *et al.*, 2015). Os resultados mostraram que o NAC protegeu significativamente a redução da viabilidade da linhagem sarcoma 180

causada pelo composto CBP-01. Esses dados corroboram com a teoria que o ROS pode ser responsável pelo dano direto ou indireto do DNA, que ocasiona o aprisionamento celular na fase G0/G1 e, conseqüentemente, desencadeia a apoptose.

Com base nos resultados promissores *in vitro* os ensaios com o complexo CBP-01 foram extrapolados para *in vivo*. O primeiro teste realizado foi com intuito de estabelecer a dose letal 50% (DL₅₀), que representa a dose mínima necessária de um composto para causar a morte de um animal, indicando assim, a toxicidade aguda da substância. Vale ressaltar que, a variação da resposta individual do animal perante a DL₅₀ de uma determinada substância é pequena. Entretanto, existem diversos fatores que podem influenciar no resultado da toxicidade obtida, como por exemplo, o peso e a idade dos animais, as condições ambientais e o método de administração. Desse modo, a determinação da DL₅₀ não precisa ser exata sendo suficiente a obtenção da ordem da grandeza da mesma (p. ex. entre 5 e 50 mg/kg) (OROIAN *et al.*, 2015). O resultado obtido da DL₅₀ do CBP-01 foi de 50 a 200 mg/kg, sendo uma dose mais alta quando comparado com a cisplatina que apresenta uma DL₅₀ de 6,6 mg/kg em camundongos (POIRRIER *et al.*, 2010). Bravo-Gómez e colaboradores (2013) encontraram valores de DL₅₀ de 16,23 e 16,45 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ para as Casiopeínas [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato)]⁺ e [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-phenanthroline) (glicinato)]⁺. Desse modo, o complexo no presente estudo apresentou ser mais seguro e causar menos toxicidade nos animais quando comparado com a cisplatina e o subgrupo de Casiopeínas por apresentar uma DL₅₀ superior aos valores encontrados pelos autores citados anteriormente.

Segundo o dado de DL₅₀ obtido para o CBP-01 as doses para o ensaio de redução tumoral foram determinadas, sendo estas de 3, 6 e 9 mg/kg. A administração do complexo em estudo em camundongos portadores do tumor sólido murino (sarcoma 180) apresentou atividade antitumoral, sendo este resultado evidenciado pela diminuição do volume tumoral (RVT). Acompanhando esse resultado foi possível observar valores acima de 40 % de redução tumoral quando comparado com o controle (PBS). Sabe-se que a função antitumoral (ou redução tumoral) acima de 42 % indica que o composto é um potencial agente

antitumoral (BRAVO-GÓMEZ *et al.*, 2013), desse modo, podemos considerar que o CBP-01 pode ser considerado um potencial agente antitumoral.

Corroborando com os resultados *in vitro* de citotoxicidade, que mostra a capacidade do complexo CBP-01 de reduzir a proliferação das células tumorais, o mesmo foi possível observar *in vivo*. Visto que a administração do CBP-01 reduziu o número de células tumorais quando comparado com o controle, sendo esse efeito observado pela redução do volume tumoral. Apesar dos mecanismos de ação do complexo CBP-01 ainda não estarem completamente elucidados, evidências *in vitro* sugerem que reação redox do cobre induz a produção de ROS e/ou o complexo tende a interagir com o DNA, ocasionando aprisionamento proliferativo e morte celular. Podendo este mecanismo ser o responsável pela redução tumoral observada *in vivo*.

Todos esses resultados foram observados na ausência de toxicidade do complexo CBP-01, uma vez que não foi possível notar uma redução significativa do peso dos animais. Apenas na concentração mais alta administrada do complexo (9 mg/kg) que foi possível observar uma discreta redução de 1% do peso do grupo tratado. Quando comparado com o grupo tratado com a cisplatina (3 mg/kg), um quimioterápico amplamente utilizado, podemos dizer que o nosso composto foi menos tóxico para o organismo do que a cisplatina, visto que o tratamento com a mesma apresentou redução do peso dos animais de até 20%. Além disso, os animais tratados com cisplatina apresentaram sintomas clínicos drásticos como prostração e piloereção. Desse modo, o complexo CBP-01 apresentou redução tumoral similar à da cisplatina, porém causou menos toxicidades aos animais.

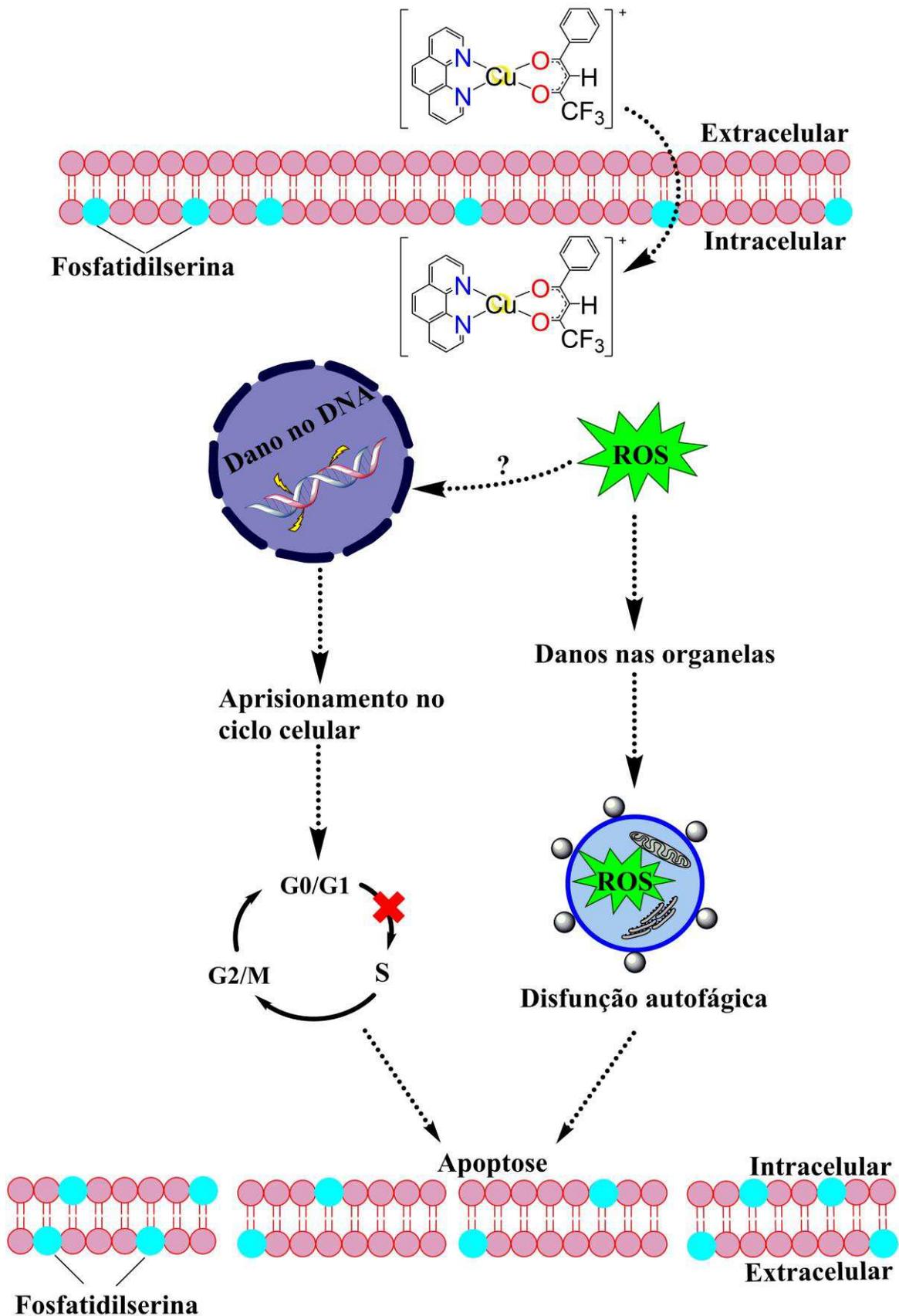
6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho concluímos que o complexo metálico a base de cobre(II) [Cu(BTA)phen]ClO₄ apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Sugerimos que seu mecanismo de ação (esquematizado na Figura 18) possa estar relacionado com a reação redox do composto que ocasiona a produção de espécies reativas de oxigênio, que pode participar da ação direta ou indireta do composto sobre o DNA, o que promove o aprisionamento das células tumorais na fase G₀/G₁ e, conseqüentemente,

indução da morte celular. A morte celular é iniciada pela disfunção da autofagia que culmina na indução da apoptose. Pode-se observar também, que o complexo em estudo apresentou seletividade perante as células tumorais testadas *in vitro*. Além disso, os ensaios *in vivo* mostraram que o complexo apresentou potencial atividade de agente antitumoral, visto que reduziu o volume do tumor sólido em proporções similares às da cisplatina. Vale ressaltar que, o complexo [Cu(BTA)phen]ClO₄ apresentou menor toxicidade durante o tratamento quando comparado com a cisplatina, sendo esse fato evidenciado pela perda de peso observada no grupo tratado com a cisplatina.

Portanto, o complexo em estudo é um forte candidato a agente antitumoral. Entretanto, é necessário realizar ensaios moleculares para melhor elucidar o mecanismo de ação do complexo e, também, verificar a seletividade do mesmo *in vivo*, a partir de ensaios toxicológicos.

Figura 18. Diagrama esquemático representando os danos celulares induzidos pelo $[\text{Cu}(\text{BTA})\text{phen}]\text{ClO}_4$



7. Referências

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

AHAMED, M.; AKHTAR, M. J.; ALHADLAQ, H. A.; ALSHAMSAN, A. Copper ferrite nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative stress in human breast cancer MCF-7 cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. P. 46-54, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.043>

AHMED, A. A.; MUSA, H. H.; SIFALDIN, A. Z.; MUSA, T. H. Epigenetic events in male common urogenital organs cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**. P. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2016.06.004>

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 1205-1256, 2010

ALÉMON-MEDINA, R.; BREÑA-VALLE, M.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J. L.; GRACIA-MORA, M. I.; RUIZ-AZUARA, L. Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas®). **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 60, p. 219-228. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0364-9>

ALMEIDA, J. C.; PAIXÃO, D. A.; MARZANO, I. M.; ELLENA, J.; PIVATTO, M.; LOPES, N. P.; FERREIRA, A. M. D. C.; PEREIRA-MAIA, E. C.; GUILARDI, S.; GUERRA, W. Copper(II) complexes with β -diketones and *N*-donor heterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron**, v. 89, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.12.026>

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A., DONICCI, C. L., LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR). Cancer Progress Report. **Clinical Cancer Research**. v. 20, 112 p., 2014

AMERICAN CANCER SOCIETY. **A guide to cancer surgery** – Learning about surgery, 2014

AMERICAN CANCER SOCIETY. **A guide to chemotherapy**, 2015a

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Chemotherapy Drugs: How They Work**, 2015b

ASSEF, M. L. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; MORETÃO, M. P.; AZAMBUJA, A. P.; IACOMINI, M.; BUCHI, D. F. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an α -D-glucan from the lichen *Ramalina celestri*. **Brazilian Journal of Morphological sciences**, v. 19, n. 2, p. 49-54, 2002

BABA, Y.; ISHIMOTO T.; KURASHIGE, J.; IWATSUKI, M.; SAKAMOTO, Y.; YOSHIDA, N.; WATANABE, M.; BABA, H. Epigenetic field cancerization in gastrointestinal cancers. **Cancer Letters**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.009>

BADISHA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO L. M.; GOODMAN, C. B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993,2996, 2009. PMID: 19661306

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interação entre complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análise: um enfoque nos metalintercaladores. **Revista Virtual Química**, v.20, n.20, p.1-19, 2015

BÉNÉRÉ, E.; da LUZ, R. A., I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n.2, p.101-106, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.07.014>

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.15-27. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)

BEZERRA, D. P. et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine , an alkaloid amide from the Piper species. **Journal of applied toxicology**, v. 28, p. 599–607, 2008. <https://doi.org/10.1002/jat.1311>

BORGES, L. J. H.; BULL, E. S.; FERNANDES, C.; JUNIOR, A. H.; AZEREDO, N. F.; RESENDE, J. A. L. C.; FREITAS, W. R.; CARVALHO, E. C. Q.; LEMOS, L. S.; JERDY, H.; KANASHIRO, M. M. *In vitro* and *in vivo* studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 128-140, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.018>

BOYLE, P., LEVIN, B. **World cancer report 2008**. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, Lyon: França, 2008.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Free Radical and Antioxidant Protocols**, p. 347-352, 1998.

<https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>

BURATTINI, S.; FERRI, P.; BATTISTELLI, M.; CURCI, R.; LUCHETTI, F.; FALCIERI, E. C₂C₁₂ murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. **European Journal of Histochemistry**, v. 48, n. 2, p. 223-234, 2004. PMID:15596414

BURREL, R. A.; MCGRANAHAN, N.; BARTEK, J.; SWANTON, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 338-345, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12625>

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997. PMID:9145860

CONCKLIN, K. A. Chemotherapy-Associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, n. 4, p. 294-300, 2004. <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>

DING, X.; XIE, H.; KANG, Y. J. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 301-310, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.06.010>

DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Vichows Archiv**, v. 446, n. 5, p. 475-482, 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews: Genetics**, v. 7, p. 21-33, 2006.

<https://doi.org/10.1038/nrg1748>

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p.81-95, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

FERNANDES, C.G.; BORGES, C.G; SEMINOTTI, B.; AMARAL, A.U.; KNEBEL, L.A.; EICHLER, P.; DE OLIVEIRA, A.B.; LEIPNITZ, G.; WAJNER, M. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.31, p.775-785, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s10571-011-9675-4>

FLOREA, A-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v.3, n.1, p.1351-1371, 2011.

<https://doi.org/10.3390/cancers3011351>

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T. e BERALDO, H. A Química inorgânica na terapia do câncer. **Química nova**, v. 6, p.2-7, 2005.

FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; DOU, Q. P. Novel metal and metal complexes as platforms for cancer therapy.

Current Pharmaceutical Design, v.16, n.16, p.1813-1825, 2010.

<https://doi.org/10.2174/138161210791209009>

GADELHA, M. I. P., WERNECK, M. A. S., LIMA, D. P., TOMASSINI, E., PANITZ, L. M., FAILLACE, T. F. L. **Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS – Sistema de informações ambulatoriais**. 17^a ed., Brasília: Ministério da Saúde, 120 p., 2014

GALINDO-MURILLO, R.; GRACÍA-RAMOS, J. C.; RUIZ-AZUARA, L.; CHEATHAM, T. E.; CORTÉS-GUZMÁN, F. Intercalation processes of copper complexes in DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 11, p. 5364-5376, 2015.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkv467>

GATTI, L.; CASSINELLI, G.; ZAFFARONI, N.; LANZI, C.; PAREGO, P. New mechanisms for old drugs: Insights into DNA-unrelated effects of platinum compounds and drug resistance determinants. **Drug Resistance Updates**, v. 20, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.04.001>

GILAD, Y.; SENDEROWITZ, H. Docking studies on DNA intercalators. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 1, p. 96-107, 2013.

<https://doi.org/10.1021/ci400352t>

GRABOWSKA, I.; SZELIGA, A.; MORACZEWSKI, J.; CZAPLICKA, I.; BRZÓSKA, E. Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. **Cell Biology International**, v. 35, n. 2, p. 125-133, 2011.

<https://doi.org/10.1042/CBI20090335>

GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., LEWONTIN, R. C., CARROL, S. B. **Introdução à Genética**. 10^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 220-240, 2013

GUO, Q. J.; YE, S.S; CAO, N.; HUANG, J.; GAO, J.; CHEN, Q. Y. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 577-582, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.08.001>

HALEEL, A.; MAHENDIRAN, D.; VEENA, V.; SAKTHIVEL, N.; KALILUR-RAHIMAN, A. Antioxidant, DNA interaction, VEGFR2 kinase, topoisomerase I and in vitro cytotoxic activities of heteroleptic copper (II) complexes of tetrazolo [1, 5-a] pyrimidines and diimines. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 366-382, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.120>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. v.100, p. 57-70, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v.144, p. 646-674, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HARTINGER, C. G.; NAZAROV, A. A.; ASHRAF, S. M.; DYSON, P. J.; KEPPLER, B. K. Carbohydrate-metal complexes and their potential as anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2574-2591, 2008. <https://doi.org/10.2174/092986708785908978>

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, p. 90-97, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.01.008>

HU, J.; LIAO, C.; GUO, Y.; YANG, F.; SANG, W.; ZHAO, J. Copper(II) complexes inducing apoptosis in cancer cells, and demonstrating DNA and HSA interactions. **Polyhedron**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.04.018>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Quimioterapia**: Orientações aos pacientes. Rio de Janeiro: INCA, 2ª ed., 11p., 2010

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 124 p., 2014

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 122 p., 2015

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WORLD HEALTH ORGANIZATION (IARC/WHO). **Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. França, 2012.

JAYAKIRAN, M. Apoptosis-Biochemistry: A mini review. **Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1000205, 2015. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000205>

KLJUN, J; TUREL, I. β -diketones as scaffolds for anticancer drug design – From organic building blocks to natural products and metallodrug componets. **European**

Journal of Inorganic Chemistry, v. 2017, n. 12, p. 1655-1666, 2017.

<https://doi.org/10.1002/ejic.201601314>

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The journal of cell biology**, v. 66, p. 188-193, 1975.

<https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.188>

LAHA, D. et al. Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 1, p. 1-9, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.011>

LANDRY, J. J. M.; PYL, P. T.; RAUSCH, T.; ZICHNER, T.; TEKKEDIL, M. M.; STÜTZ, A. M.; AIYAR, A. J. R. S.; PAU, G.; DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J. O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L. M. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 3, n. 8, p. 1213-1224, 2013. <https://doi.org/10.1534/g3.113.005777>

LEE, Y. H.; CHENG, F. Y.; CHIU, H. W.; TSAI, J. C. FANG, C. Y.; CHEN, C. W. WANG, Y. J. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4706-4715, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.021>

LEUNG, C. H.; LIU, L. J.; LEUNG, K. H.; MA, D. L. Epigenetic modulation by inorganic metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v.319, p. 25-34, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.03.014>

LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metamellomics**, v. 1, n. 6, p. 458-470, 2009. <https://doi.org/10.1039/b904071d>

LI, F.; SETHI, G. Targeting transcription factor NF- κ B to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1805, n. 2, p. 167-180, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.002>

LIMA, A. P. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105865>

LORENCETTI, A., SIMONETTI, A. P. As estratégias de enfrentamento de pacientes durante o tratamento de radioterapia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 13, n. 6, p. 944-950, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692005000600005>

LOW, M. L. et al. Ternary and binary copper (II) complexes: synthesis, characterization, ROS-inductive, proteasome inhibitory, and anticancer properties. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 223-241, 2017. <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1260711>

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of drug resistance in drug chemotherapy. **Medical principles and practice**, v.14, n.1, p. 35-48, 2005. <https://doi.org/10.1159/000086183>

MA, T.; XU, J.; WANG, Y.; YU, H.; YANG, Y.; LIU, Y.; DING, W.; ZHU, W.; CHEN, R.; GE, Z.; TAN, Y.; JIA, L.; ZHU, T. Ternary copper (II) complexes with amino acid chains and heterocyclic bases: DNA binding, cytotoxic and cell apoptosis

induction properties. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 144, p. 38-46, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.12.011>

MAHAVORASIRIKUL, W.; VIYANANT, V.; CHAIJAROENKUL, W.; ITHARAT, A.; NA-BANGCHANG, K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 55, 2010.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-55>

NARDONE, R. M. Toxicity testing in vitro. **Growth, nutrition, and metabolism of cells culture**, v.3, p. 417-495, 1977. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-598303-7.50017-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-598303-7.50017-5)

[5](#)

NASULEWICZ, A.; MAZUR, A.; OPOLSKI, A. Role of copper in tumour angiogenesis – clinical implications. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, p. 1-8, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2004.02.004>

NATIONAL INSTITUTE OF CANCER. Chemotherapy and You: Support for people with cancer. Versão 29, 2007. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/chemotherapy-and-you/>>. Acessado em: fevereiro 2017, 2007b

NATIONAL INSTITUTE OF CANCER. Radiation Therapy and You: Support for people with cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/publication/patient-education/radiationtherapy.pdf>>. Acesso em: fevereiro de 2017, 2007a

NISHIDA, N.; YANO, H.; NISHIDA, T.; KAMURA, T.; KOJIRO, M. Angiogenesis in cancer. **Vascular health and risk management**. v. 2, n. 3, 213 p., 2006. PMID: 17326328

OECD. **Guideline for testing of chemicals 423** – Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method. 2001

OECD. **Guideline for the testing of chemicals 487** - *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. 2012

OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J., GOULART FILHO, L. R., BASTOS, L. M., ALVES, D. D., SANTOS E SILVA, S. V. MORELLI, S. Contributions of cytogenetics to cancer research. **Bioscience Journal**. v. 30, n. 1, p. 245-259, 2014

OROIAN, C. E. et al. Toxicological Tests of Tumolit and Artemisinin Products on Laboratory Mice and Rats. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies**, v. 72, n. 2, 2015. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:11427>

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I. D.; KILIC, I. H.; GULDUR, M. E. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011. <http://doi.org/10.5897/AJBx10.017>

POIRRIER, A. L. et al. Ototoxic drugs: difference in sensitivity between mice and guinea pigs. **Toxicology letters**, v. 193, n. 1, p. 41-49, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.003>

PORTO, H. K. P. et al. Synthesis of a ruthenium(II) tryptophan-associated complex and biological evaluation against Ehrlich murine breast carcinoma. **Transition Metal Chemistry**, v. 40, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11243-014-9882-1>

PUTRAL, L. N.; BYWATER, M. J.; GU, W.; SAUNDERS, N. A.; GABRIELLI, B. G.; LEGGATT, G. R.; MCMILLAN, N. A. J. RNA Interface against human Papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. **Molecular Pharmacology**, v. 68, p. 1311-1319, 2005. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014191>

QIN, Q. P. et al. Synthesis and antitumor mechanisms of a copper (II) complex of anthracene-9-imidazoline hydrazone (9-AIH). **Metallomics**, v. 7, n. 7, p. 1124-1136, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5MT00027K>

RAJALAKSHMI, S.; KIRAN, M. S.; NAIR, B. U. DNA condensation by copper (II) complexes and their anti-proliferative effect on cancerous and normal fibroblast cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 80, p. 393-406, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.064>

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

REDDY, L.; COUVREUR, P. H. **Macromolecular anticancer therapeutics**. New York: Springer, 1^a ed., 500 p., 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0507-9>

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. 2016. PMID: 23805433

ROCHA, C. A. M. As pernas do caranguejo. 1ª ed. Belém: **Carlos Alberto Machado da Rocha**, 114 p., 2013

RODRIGUES, M. A.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Compostos inorgânicos como fármacos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 115, p. 25-30, 2009

RUIZ-AZUARA, L.; BRAVO-GÓMEZ, M. E. Copper compounds in cancer chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3606-3615, 2010. <https://doi.org/10.2174/092986710793213751>

SAGHIRI, M. A.; ASATOURIAN, A.; ORANGI, J.; SORENSON, C. M.; SHEIBANI, N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis – Part II: Cr, Si, Zn, Cu, and S. **Critical Reviews in Oncology Hematology**. p. 143-155, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.011>

SANTINI, C.; PELLEI, M.; GANDIN, V.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; MARZANO, C. Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical reviews**, v. 114, n. 1, p. 815-862, 2013. <https://doi.org/10.1021/cr400135x>

SANTOS, S.; SILVA, A. M.; MATOS, M.; MONTEIRO, S. M.; ÁLVARO, A. R. Copper induced apoptosis in Caco-2 and Hep-G2 cells: Expression of caspases 3, 8 and 9, AIF and p53. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 185, p. 138-146, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.010>

SERMENT-GUERRERO, J.; CANO-SANCHEZ, P.; REYES-PEREZ, E.; VELAZQUEZ-GARCIA, F.; BRAVO-GOMEZ, M. E.; RUIZ-AZUARA, L. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas®. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1376-1384, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>

SHARMA, S.V.; LEE, D. Y.; LI, B.;QUINLAN, M.P.; TAKAHASHI, F.; MAHESWARAN, S.; MCDERMOTT, U.; AZIZIAN, N.; LEE, Z.; FISCHBACH, M. A.; WONG, K. K.; BRANDSTETTER, K.; WITTER, B.; RAMASWAMY, S.; CLASSON, M.; SETTLEMAN, J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. **Cell**, v. 141, p. 69-80, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027>

SHEIKH, J.; JUNEJA, H.; INGLE, V.; ALI, P.; HADDA, T. B. Synthesis and *in vitro* biology of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zinc(II) complexes of functionalized beta-diketone bearing energy buried potential antibacterial and antiviral O,O pharmacophore sites. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 269-276, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.04.004>

SHIBAI-OGATA, A.; KAKINUMA, C.; HIOKI, T.; KASAHARA, T. Evaluation of high-throughput screening for *in vitro* micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. **Mutagenesis**, p. ger037, 2011. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger037>

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SANTOS, G. C.; FERNANDES, N. G.; SILVEIRA, J. N.; FERREIRA, A. M. C.; BORTOLOTTI, T.; TERENCE, H.; BORTOLUZZI, A. J.; NEVES, A.; PEREIRA-MAIA, E. C. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper (II) with N-donor

heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, p. 67-76, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.014>

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SILVEIRA, J. N.; FERREIRA, A. M. C.; BORTOLOTTI, T.; FISCHER, F. L.; TEREZI, H.; NEVES, A.; PEREIRA-MAIA, E. C. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414–24, 2011.

<https://doi.org/10.1021/ic101791r>

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 716-736, 2010

THULLER, L. C. S. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 128 p., 2012

TISATO, F.; MARZANO, C.; PORCHIA, M.; PELLEI, M.; SANTINI, C. Copper in diseases and treatment, and copper-based anticancer strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 708-749, 2009. <https://doi.org/10.1002/med.20174>

TREJO-SOLÍS, C. et al. Cas IIγ Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. **Neoplasia**, v. 7, n. 6, p. 563-574, 2005. <https://doi.org/10.1593/neo.04607>

TREJO-SOLÍS, C.; JIMENEZ-FARFAN, D.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; FERNANDEZ-VALVERDE, F.; CRUZSALGADO, A., RUIZ-AZUARA, A., SOTELO, J. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive

oxygen species and jnk activation. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 156, 2012.

<https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-156>

VOLPATO, L. E. R.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, T. M.; SAKAI, V. T.; MACHADO, M. A. A. M. Mucosite bucal rádio e quimioinduzida. **Revista Brasileira de**

Otorrinolaringologia, v. 73, n. 4, p. 562-568, 2007. [https://doi.org/10.1590/S0034-](https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000400017)

[72992007000400017](https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000400017)

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n.

35, p. 8097-8340, 2010. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>

WIJDEVEN, R. H.; PANG, B.; ASSARAF, Y. G.; NEEFJES, J. Old drugs, novel ways out: Drug resistance toward cytotoxic chemotherapeutics. **Drug Resistance**

Updates, v. 28, p. 65-81, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.001>

WOLKING, S.; SCHAEFFELER, E.; LERCHE, H.; SCHWAB, M.; NIES, A. T. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1. **Clinical pharmacokinetics**, v. 54, n.

7, p. 709-735, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0267-1>

XIAO, Y.; CHEN, D.; ZHANG, X.; CUI, Q.; FAN, Y.; BI, C.; PING-DOU, Q. Molecular Study on Copper-Mediated Tumor Proteasome Inhibition and Cell Death. **International Journal of Oncology**, v. 37, p. 81-87, 2010. PMID:20514399

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma.

Methods in Molecular Biology, v. 108, p.101-106, 1998. [https://doi.org/10.1385/0-](https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:101)

[89603-472-0:101](https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:101)

ZEMBRUSKI, N. C. L.; STACHE, V.; HAEFELI, W. E.; WEISS, J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 429, p. 79-81, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>

ZHANG, S.; ZHU, Y.; TU, C.; WEI, H.; YANG, Z.; LIN, L.; DING, J.; ZHANG, J.; GUO, Z. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and L-threonine with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 2099-2106, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.09.014>

ZHOU, X. Q. et al. Copper complexes based on chiral Schiff-base ligands: DNA/BSA binding ability, DNA cleavage activity, cytotoxicity and mechanism of apoptosis. **European journal of medicinal chemistry**, v. 114, p. 244-256, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.055>

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v. 33, p. 2278-2282, 1973. PMID:4741930