

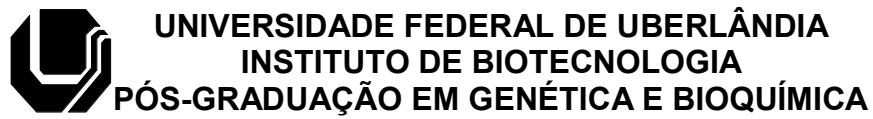
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTITUMORAL, MUTAGÊNICA,
RECOMBINOGÊNICA E GENOTÓXICA DO [Cu(Dox)(Phen)]²⁺**

Aluno: Jeyson Césary Lopes

Orientador: Sandra Morelli

Co-Orientador: Robson José Oliveira Júnior

**UBERLÂNDIA - MG
2019**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTITUMORAL, MUTAGÊNICA,
RECOMBINOGÊNICA E GENOTÓXICA DO $[\text{Cu}(\text{Dox})(\text{Phen})]^{2+}$**

Aluno: Jeyson Césary Lopes

Orientador: Sandra Morelli

Co-Orientador: Robson José Oliveira Júnior

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

**UBERLÂNDIA - MG
2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L864 Lopes, Jeysor Césary, 1987-

2019 Avaliação da atividade citotóxica, antitumoral, mutagênica,
recombinogênica e genotóxica do [Cu(dox)(phen)]₂⁺ [recurso
eletrônico] / Jeysor Césary Lopes. - 2019.

Orientadora: Sandra Morelli.

Coorientador: Robson Oliveira-Júnior.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2239>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Morelli, Sandra, 1953-, (Orient.). II. Oliveira-
Júnior, Robson, 1984-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica - PPGGB				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - nº 17/2019 - PPGGB				
Data:	Treze de dezembro de dois mil e dezenove.	Hora de início:	09:30h	Hora de encerramento:	12:50
Matrícula do Discente:	11523GBI011				
Nome do Discente:	Jeyson Césary Lopes				
Título do Trabalho:	Avaliação da atividade citotóxica, antitumoral, mutagênica, recombinogênica e genotóxica do [Cu(dox)(phen)]2+.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Genética, Biologia e Melhoramento de Plantas e Animais.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da atividade citotóxica, antitumoral e genotóxica do [Cu(dox)(phen)]2+.				

Aos treze dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, às 09:30 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior, Profª. Drª. Priscila Capelari Orsolin, Profª. Drª. Rute Magalhães Brito, Profª. Drª. Thaíse Gonçalves de Araújo e Profª. Drª. Sandra Morelli, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Profª. Drª. Sandra Morelli, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO .

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Membro de Comissão**, em 13/12/2019, às 12:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rute Magalhães Brito, Membro de Comissão**, em 13/12/2019, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



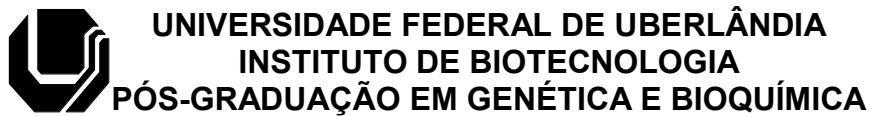
Documento assinado eletronicamente por **Edimar Olegário de Campos Júnior, Usuário Externo**, em 13/12/2019, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Capelari Orsolin, Usuário Externo**, em 13/12/2019, às 12:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1588142** e o código CRC **3C1BAFC9**.



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTITUMORAL, MUTAGÊNICA,
RECOMBINOGÊNICA E GENOTÓXICA DO $[Cu(Dox)(Phen)]^{2+}$**

ALUNO: Jeyson Césary Lopes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli (Orientador)

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Priscila Capelari Orsolin

Prof^a. Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo

Prof^a. Dr^a. Rute Magalhães Brito

Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior

Data da Defesa: 13/12/2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof^a Dr^a Sandra Morelli

Dedico este trabalho aos meus pais
Paulo Celso Lopes e Rosângela
Aparecida Lopes e a minha esposa
Lorena Gonçalves Queiroz por todo o
carinho, apoio, confiança e estímulo. A
vocês meu eterno amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus orientadores, **Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli e Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior**, pela orientação, atenção, sabedoria e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno** (*in memoriam*), que tão precocemente nos deixou, esta tese é a minha contribuição para a continuação do seu legado científico. Se cheguei até aqui foi por um dia ter sido inspirado por você.

As professoras **Priscila Pereira Silva Caldeira e Elene Cristina Pereira Maia**, por tão gentilmente terem cedido o composto aqui estudado, sem sua valiosa contribuição nada disso seria possível. A vocês meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Priscila Capelari Orsolin, Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior e Profa. Dra. Rute Magalhães Brito**, pela disponibilidade para a leitura deste trabalho, bem como pelas relevantes sugestões.

Aos **professores** do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, pelos valiosos ensinamentos e pela significativa contribuição em minha formação científica.

A **Todos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese** do Centro Universitário de Patos de Minas, por fazerem com que o trabalho se realizasse em clima de companheirismo e amizade. Em especial, à **Luísa Mariana Melo Guimarães**, por seu grande auxílio na condução da parte experimental deste trabalho e à **Prof^a. Dr^a. Priscila Capelari Orsolin**, pelo auxílio, incentivo e amizade de sempre. Tenho em você um grande exemplo.

A **Todos do Laboratório de Citogenética** da Universidade Federal de Uberlândia, por suas contribuições na condução deste trabalho, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus pais, **Paulo e Rosângela** e irmãos, **Marcos Paulo, Laíse e Thaíse**, pelo seu incentivo, exemplo de determinação e dedicação. Obrigado por fazerem de meus sonhos os sonhos de vocês, por acreditarem tanto em mim e me incentivarem a caminhar sempre, pelo carinho e amor... Sem vocês eu nada seria.

À minha esposa e amiga, **Lorena**, agradeço pelo apoio, companheirismo, compreensão pelos momentos de ausência e, sobretudo, pelo amor incondicional que me conforta e me dá forças para seguir em busca de meus sonhos. A sua alegria, presença e entusiasmo contribuíram muito para que eu chegasse até aqui.

Enfim, agradeço a **todos** que contribuíram para mais esta conquista.

Lista de Abreviaturas

Antib: antibiótico.

BH: heterozigoto balanceado.

Casiopeína: grupo de complexos baseados em cobre.

CBEA: Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

CEUA/UFU: Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

CBMN: Ensaio do Micronúcleo por Bloqueio da Citocinese

CO₂: gás carbônico

Cu(dox)(phen)²⁺: complexo ternário de cobre associado a doxiciclina e fenantrolina.

CDP: Cu(dox)(phen)²⁺

Cu(Hpr-norf)(Phen)Cl₂: complexo de cobre (II) associado a cloro, fenantrolina e N-propil-norfloxacinato.

Cu(II): Cobre II.

Cu(N9-ABS)(phen)₂·3.6·H₂O: Complexo de cobre associado a N-(9H-purina-6-yl) benzenosulfonamida.

Cu(phen)²⁺: complexo de cobre associado a fenantrolina.

Cu₂{bcmp(-H)}{μ-OH}·(NO₃)₂·H₂O: complexo de cobre com ligante dinuclear 2,6- bis(1,4,7-triazaciclona-1-ilmetil)-4-metilfenol.

CuII-(O₂-): superóxido de cobre.

CuII-OOH: hidroperóxido de cobre.

CYP450: Citocromo P 450.

DL₅₀: Dose Letal 50%.

DNA: Desoxirribonucleic acid.

Dox: Doxiciclina.

DXR: Cloridrato de Doxorrubicina

ERO: Espécie reativa de oxigênio.

Flr³: flare 3.

HB: High bioactivation cross (cruzamento de alta bioativação).

IC₅₀: Concentração Inibitória 50%

IS: Índice de Seletividade.

LogP: Coeficiente de Partição.

MH: trans-heterozigoto marcado.

MN: Micronúcleos.

Mwh: multiple wing hairs.

NAC: n-acetilcisteína.

OECD: Organizaçāo de Cooperaçāo e Desenvolvimento Econômico.

ORR: Oregon Red.

PBS: *phosphate buffered saline*.

Phen: 1-10 fenantrolina.

RNAt: RNA transportador.

SMART: *Somatic Mutation And Recombination Test*.

SOS: SOS cromoteste.

ST: Standard Cross (cruzamento padrāo).

Tc: tetraciclina.

Lista de Figuras

Figura 1:	“Hallmarks of Cancer” ou características do câncer.....	2
Figura 2:	Representação da estrutura química proposta para o complexo metálico $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$	12
Figura 3:	Esquema do bloqueio da citocinese com citocalasina B, induzindo a formação de células binucleadas; e sem citocalasina B, formando células mononucleadas.....	14
Figura 4:	Fotomicrografia, em microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de tricomas múltiplos (<i>mwh</i>), seta larga, e apresentação de tricomas <i>flare</i> (<i>flr³</i>), seta menor	16
Figura 5:	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> , obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de descendentes marcador trans-heterozigoto (MH: <i>mwh</i> $+/+$ <i>flr³</i>) letra a e balanceador heterozigoto (BH: <i>mwh</i> $+/+$ <i>TM3, Bd^d</i>) letra b	17
Figura 6:	Curvas sigmoidais dose resposta após o tratamento com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ fenantrolina e doxiciclina	27
Figura 7:	Curvas sigmoidais dose resposta do tratamento com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$, isolado (pontos pretos) e $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$, associado com n-acetilcisteína (pontos vermelhos) em duas linhagens celulares	29
Figura 8:	Atividade de inibição de crescimento do tumor in vivo do tratamento $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ com tumor sólido sarcoma S180.....	30
Figura 9:	Sobrevida de camundongos portadores de tumor de Ehrlich e curva de peso corporal após tratamento com o complexo $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$	31
Figura 10:	A) Indução de micronúcleos em células B16F10 após 24 horas de exposição a $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ isolado e em associação com N- acetilcisteína (NAC). B) fotomicrografia representativa evidenciando em quadro amarelo um micronúcleo em uma célula binucleada corada com o Hoechst 33258.....	32

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Lipofilicidade dos ligantes livres e de alguns complexos metálicos.....	26
Tabela 2:	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) do $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ em quatro linhagens celulares.....	27
Tabela 3:	Taxas de sobrevivência dos descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), após exposição a diferentes concentrações (6,92; 13,84; 27,67; 55,34 e 110,68 mM) de $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$, bem como os controles positivo (Doxorrubicina 0,4mM) e negativo (água osmose reversa), no teste SMART em <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Tabela 4:	Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , derivados do cruzamento padrão (ST) e tratados com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ (6,92, 13,84 ou 27,67 mM), controle positivo (0,4 mM DXR) e controle negativo (água de osmose reversa).....	37
Tabela 5:	Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , derivados do cruzamento de alta bioativação (HB) e tratados com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ (6,92, 13,84 ou 27,67 mM), controle positivo (0,4 mM DXR) e controle negativo (água de osmose reversa).....	38

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Genética e Câncer.....	1
1.2 Mutações e reparo do DNA.....	3
1.3 Quimioterapia e complexos metálicos como agentes quimioterápicos	5
1.4 Complexos cúpricos como agentes quimioterápicos	8
1.5 Testes para <i>screening</i> de novas drogas quimioterápicas	12
1.5.1 Ensaio citotóxico utilizando Resazurina	12
1.5.2 Teste para detecção de micronúcleos.....	13
1.5.3 Teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART).....	15
1.5.4 Testes para avaliação antitumoral <i>in vivo</i>	17
2 Objetivo geral.....	19
2.1 Objetivos específicos	19
3 Material e Métodos	19
3.1 Obtenção do $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$	19
3.2 Medição do coeficiente de partição	19
3.3 Animais, linhagens celulares e condições de cultivo <i>in vitro</i>	20
3.4 Avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio com resazurina	20
3.5 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> com sarcoma 180	21
3.6 Determinação de tempo de sobrevivência e alterações no peso	22
3.7 Avaliação da atividade genotóxica por meio de Teste do Micronúcleo <i>in vitro</i>	22
3.8 Teste para detecção de mutação e recombinação somática em <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3.8.1 Compostos químicos, linhagens estoque, cruzamentos e tratamentos.....	23
3.8.2 Preparação e análise microscópica das asas.....	24
3.9 Análise estatística	24
4 Resultados e Discussão	25
4.1 Avaliação de lipofilicidade do $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$	25
4.2 $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ é citotóxico e seletivo contra linhagens celulares específicas	26
4.3 $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ inibe o crescimento tumoral <i>in vivo</i> e aumenta a sobrevivência geral dos camundongos	29
4.4 $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ induz dano ao DNA	31
4.5 $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ é indutor de recombinação somática	33
5 Conclusão.....	39
Referências	40

Resumo

O complexo ternário de Cobre(II), 1,10-fenantrolina e doxiciclina $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, desenvolvido como um candidato a droga antitumoral, mostrou alta citotoxicidade e atividade de clivagem do DNA por mecanismo oxidativo e intercalação à molécula, sugerindo estudos que auxiliem na melhor compreensão de seu mecanismo de ação. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar sua atividade citotóxica e potencial genotóxico em células tumorais e não-tumorais cultivadas *in vitro* e sua atividade antitumoral *in vivo* utilizando camundongos BALB/C inoculados com as linhagens celulares de sarcoma 180 e tumor de Ehrlich, bem como avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. O coeficiente de partição de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ foi determinado em sistema água octanol em pH 7,4. A avaliação da citotoxicidade foi realizada usando o ensaio de resazurina em três linhagens de células tumorigênicas (sarcoma TG180, sarcoma S180 e melanoma B16F10) e uma linhagem não tumorigênica (macrófagos RAW 264.7) em diferentes concentrações. A atividade genotóxica foi avaliada pelo Teste de Micronúcleo *in vitro* nas concentrações de 1; 0,25; 0,1; e $0,05\mu\text{M}$. O teste de atividade antitumoral *in vivo* foi realizado utilizando sarcoma S180 nas concentrações de 5, 10 e 15 mg/Kg de animal e foi determinado o tempo de sobrevivência e alterações no peso de camundongos usando um modelo de tumor ascítico de Ehrlich nas concentrações de 1 e 8mg/Kg de animal. O teste SMART foi realizado com larvas de 72h nos cruzamentos padrão e de alta bioativação em três concentrações de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (6,92; 13,84 ou 27,6mM). Foram analisados indivíduos trans-heterozigotos marcados e heterozigotos balanceados para determinar os eventos mutacionais e recombinogênicos ocorridos nas células. Os resultados obtidos em linhagens celulares mantidas *in vitro* indicaram que o composto apresenta moderado potencial citotóxico, com inibição de crescimento celular seletiva para células tumorais, especialmente B16F10. Seu mecanismo de ação principal parece ser por meio da geração de EROS. $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ reduziu significativamente o tamanho do tumor implantado no modelo animal, sugerindo grande potencial antitumoral. $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ é seletivamente citotóxico para B16F10 e mostrou elevado potencial quimioterápico *in vivo* contra sarcoma S180 e tumor ascítico de Ehrlich. Em relação aos efeitos mutagênicos e recombinogênicos foi verificado que $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ aumentou significativamente as frequências de células mutantes em ambos os cruzamentos de *D. melanogaster*, principalmente por recombinação. Esses dados mostram que $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ é um agente recombinogênico direto, independente da bioativação. Os resultados obtidos indicam que $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ é um candidato promissor para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas, uma vez que apresentou comportamento seletivo para células tumorais e possui seletividade satisfatória para atravessar a membrana e chegar ao DNA, seu principal alvo de ação.

Palavras chave: Complexo ternário de Cobre(II); recombinação, mutação, *Drosophila melanogaster*, atividade antitumoral; citotoxicidade; genotoxicidade; melanoma; sarcoma.

Abstract

The ternary complex of Copper(II), 1,10-phenanthroline and doxycycline $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, developed as a candidate for the antitumoral drug, showed high cytotoxicity and DNA cleavage activity by oxidative mechanism and interleaving to the molecule, suggesting studies that help to better understand its mechanism of action. In this context, the aim of the present study was to investigate its cytotoxic activity and genotoxic potential in tumor and non-tumor cells cultured in vitro and its antitumoral activity in vivo using BALB/C mice inoculated with the cell lines of sarcoma 180 and Ehrlich's tumour, as well as evaluating the mutagenic and recombinogenic effects of $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ using the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila melanogaster*. The partition coefficient of $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ was determined in octanol water at pH 7.4. Cytotoxicity was assessed using the resazurin test on three lines of tumorigenic cells (sarcoma TG180, sarcoma S180 and melanoma B16F10) and a non-tumorigenic lineage (macrophages RAW 264.7) in different concentrations. Genotoxic activity was evaluated by in vitro Micronucleus Test at concentrations of 1; 0.25; 0.1; and 0.05 μM . The in vivo antitumoral activity test was performed using sarcoma S180 at concentrations of 5, 10 and 15 mg/Kg of animal and the survival time and changes in weight of mice were determined using an Ehrlich ascitic tumor model at concentrations of 1 and 8 mg/Kg of animal. The SMART test was performed with 72h larvae at standard and high bioactivation crossings at three concentrations of $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (6.92; 13.84 or 27.6mM). Marked trans-heterozygous and balanced heterozygous individuals were analyzed to determine the mutational and recombinogenic events that occurred in the cells. The results obtained from cell lines maintained in vitro indicated that the compound presents moderate cytotoxic potential, with selective cell growth inhibition for tumor cells, especially B16F10. Its main mechanism of action seems to be through the generation of EROs. $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ significantly reduced the size of the tumor implanted in the animal model, suggesting great antitumor potential. $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ is selectively cytotoxic to B16F10 and showed high in vivo chemotherapy potential against S180 sarcoma and Ehrlich's ascitic tumor. Regarding the mutagenic and recombinogenic effects it was verified that $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ significantly increased the frequencies of mutant cells in both crossings of *D. melanogaster*, mainly by recombination. These data show that $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ is a direct recombinogenic agent, independent of bioactivation. The results obtained indicate that $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ is a promising candidate for the development of new chemotherapeutic drugs, once it has shown selective behavior for tumor cells and has satisfactory selectivity to cross the membrane and reach the DNA, its main target of action.

Key words: Copper(II) ternary complex; recombination, mutation, *Drosophila melanogaster*, antitumor activity; cytotoxicity; genotoxicity; melanoma; sarcoma.

1. Introdução

1.1 Genética e Câncer

Mundialmente, na última década, ocorreram cerca de 14,1 milhões de casos novos de câncer e cerca de 8,2 milhões de óbitos. Sendo observadas maiores taxas de incidência em países desenvolvidos, predominando os cânceres associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimento, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado), sendo que taxas intermediárias foram observadas nas Américas do Sul e Central, Leste da Europa e Sudeste Asiático e menores taxas em grande parte da África do Sul e Oeste da Ásia, além disso, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (FERLAY et al., 2015).

Os cânceres que apresentaram maior incidência foram os de pulmão, mama, colorretal, próstata e de estômago, sendo que globalmente, cerca de uma em cada seis mortes estão relacionadas à doença (WHO, 2018). No Brasil, em 2017, houve aproximadamente 222 mil mortes em decorrências das neoplasias, tornando o câncer a segunda causa de morte ficando atrás apenas dos óbitos causados por doenças do aparelho circulatório (INCA, 2018).

O câncer designa uma síndrome com mais de uma centena de diferentes doenças que, segundo Hanahan e Weinberg (2015), têm seu surgimento ocasionado por alterações fundamentais na fisiologia celular, que contribuem, em conjunto, para a tumorigênese. O termo câncer, deriva da palavra grega carcinoma (*karkinos*: crustáceo, caranguejo), foi usado pela primeira vez por Galeno (138 a 201 d.C.) para indicar uma neoplasia maligna da mama no qual as veias superficiais do órgão eram túrgidas e ramificadas, lembrando as patas de um caranguejo (BRASILEIRO FILHO., 2013).

De acordo com o comportamento biológico, as células tumorais podem ser classificadas em: (i) Neoplasias benignas, que apresentam limites quanto à expansão, velocidade e crescimento, e os efeitos são menos agressivos ao homem; e (ii) Neoplasias malignas, que podem ser excessivamente agressivas, invadindo rapidamente órgãos e tecidos vizinhos, e formando metástases (INCA., 2012).

Uma forma de classificação dos cânceres se refere aos tipos teciduais e celulares que descendem. Desta forma, os tumores malignos derivados de células e tecidos mesenquimais são chamados de sarcomas (D'ANGELO et al., 2014), aqueles derivados de células epiteliais são os carcinomas (CARVALHO., 2010), e aqueles que surgem a partir de leucócitos ou células hematopoiéticas são chamados de leucemias e linfomas (ALBERTS

et al., 2017). Quanto aos tumores benignos, os adenomas surgem em glândulas, lipomas têm sua origem no tecido adiposo e os miomas que surgem no tecido muscular liso (INCA, 2018).

Hanahan e Weinberg (2015) citam que durante a oncogênese as células adquirem dez capacidades biológicas, conhecidas como “Hallmarks of Cancer”. A figura 1 mostra tais capacidades: (1) sinalização proliferativa constante nas células cancerosas, (2) evasão de supressores de crescimento, (3) resistência à morte celular, (4) escape do sistema imunológico, (5) imortalidade replicativa, (6) indução da angiogênese, (7) ativação de invasão e metástase, (8) reprogramação do metabolismo energético, (9) indução de inflamação e (10) instabilidade genômica (HANAHAN; WEINBERG, 2015).

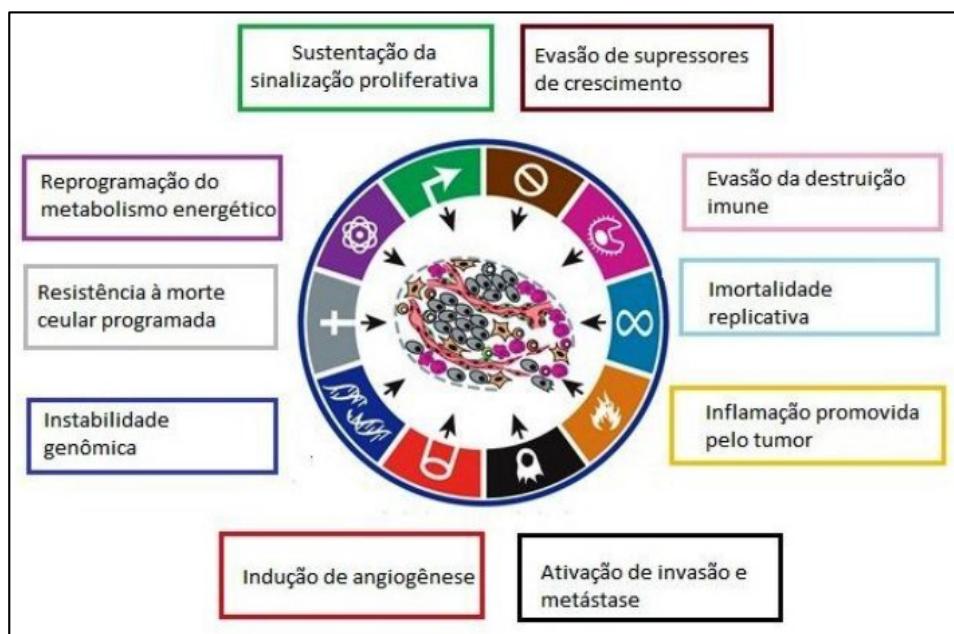


Figura 1 – “Hallmarks of Cancer” ou características do câncer (Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2015).

De acordo com a GLOBOCAN 2012, existe uma transição demográfica e epidemiológica em relação ao câncer, uma vez que 56,8% dos casos e 64,9% das mortes ocorreram em países de média e baixa renda (FERLAY *et al.*, 2015). Na população brasileira, o câncer mais incidente é o de pele, com 182 mil novos casos, seguido pelos cânceres de próstata (61 mil), mama feminina (58 mil), colorretal (34 mil), pulmão (28 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (16 mil) (INCA, 2016).

O melanoma é resultante de uma desordem nos melanócitos e acomete predominantemente adultos de pele branca. Este é o tipo de câncer mais frequente no Brasil correspondendo a 30% da totalidade dos tumores malignos diagnosticados e possuindo elevada possibilidade de metástase (INCA., 2018).

Geralmente, melanomas desenvolvem-se como proliferações intraepidérmicas de melanócitos neoplásicos que podem se isolar na epiderme ou derme (SIEGEL *et al.*, 2017).

Neste estágio, o melanoma apresenta alta taxa de cura por meio de cirurgia adequada. As características do desenvolvimento biológico do melanoma surgem de maneira lenta, mas com elevada proliferação celular na epiderme neoplásica, podendo migrar para as papilas dérmicas (OCANHA-XAVIER et al., 2018). Nódulos podem ser formados nos estágios avançados e infiltrar-se na derme reticular atingindo a hipoderme (CHEROBIN et al., 2018). Dessa forma, as lesões podem gerar metástase e seu prognóstico está diretamente relacionado com a profundidade da invasão (SANTOS e SOUZA., 2019).

1.2 Mutações e reparo do DNA

Uma mutação ocorre quando os genes sofrem alterações e mudam do alelo normal para um com funcionamento inadequado, sendo que, quando surge sem causa conhecida, recebe o nome de mutação espontânea, mas quando as células são expostas a agentes mutagênicos químicos, físicos ou biológicos recebe o nome de mutação induzida (SNUSTAD-SIMMONS., 2017).

Os agentes mutagênicos têm potencial para induzir câncer e são normalmente encontrados no meio ambiente nas formas de radiações ionizantes, luz solar, agentes biológicos, agentes químicos de naturezas diversas, dentre outros (ARAÚJO., 2008). Tais alterações genéticas, podem ser ocasionadas por metabólitos reativos endógenos, drogas terapêuticas e/ou mutágenos que interagem com o DNA ou com algumas proteínas envolvidas na divisão celular, alterando seu funcionamento normal (RESENDE., 2007).

Uma forma muito comum de lesão do DNA, além das mutações, é a quebra de fita dupla, onde ocorre ruptura das ligações fosfodiéster em ambas as fitas, culminando na separação da mesma, a principal causa patológica das quebras de fita duplas inclui a replicação através de um corte, o que ocasiona quebras nas cromátides durante o processo de divisão celular, as demais causas são Espécies Reativas de Oxigênio, radiações ionizantes no meio ambiente e falhas nas enzimas da maquinaria replicativa do DNA (LIEBER., 2010).

Três famílias de genes são essenciais no controle dos eventos relacionados ao ciclo celular, os proto-oncogenes, que estimulam a divisão celular e os supressores tumorais que a inibem e os genes de reparo, responsáveis por reconhecer alterações no DNA e ativar seu reparo. Quando mutados, estes genes figuram a indução e proliferação celular descontrolada, que são características das neoplasias malignas (ALBERTS, 2017).

Proto-oncogenes mutantes passam a ser denominados oncogenes e possuem ação carcinogênica por induzirem constantemente a divisão celular. Esta estimulação excessiva se deve ao fato dos oncogenes expressarem excessivamente suas proteínas estimuladoras de crescimento ou por expressarem-nas em uma forma mais ativa. Os supressores de tumor, ao

contrário, estimulam o desenvolvimento do câncer quando as mutações os desligam, perdendo sua ação e impedindo a ativação dos controles intrínsecos de crescimento celular (RIVOIRE *et al.*, 2006).

Durante o processo replicativo do DNA, erros na inserção das bases podem ocorrer, gerando novas mutações; para que tais mutações não se perpetuem, as células desenvolveram mecanismos de reparo do DNA, responsáveis por corrigir tais erros. O reparo do DNA é essencial para a integridade do material genético ser conservada sem a interferência de mutações prejudiciais. Porém, diante de alterações frequentes e um sistema de reparo ineficaz no reparo de tais danos, essas mutações se acumulam e, por consequência, levam a um processo carcinogênico (ALBERTS, 2017).

Vários são os mecanismos de reparo do DNA em eucariotos, dentre eles podemos citar os sistemas de reparo por excisão de base, onde bases anormais ou quimicamente modificadas são removidas do DNA e as vias de reparo por excisão de nucleotídeos que removem defeitos maiores como dímeros de timina. Este processo ocorre em pelo menos três etapas, (i) uma endonuclease de reparo do DNA ou um complexo enzimático que contém endonuclease reconhece e liga-se a(s) base(s) lesada(s) no DNA, fazendo sua excisão, (ii) uma DNA polimerase preenche o espaço usando como molde o filamento complementar de DNA não lesado e (iii) a enzima DNA ligase solda a quebra deixada pela DNA polimerase e completa o processo de reparo (SNUSTAD-SIMMONS., 2017).

Outro mecanismo de reparo de DNA extremamente importante aos eucariotos é o mecanismo de reparo por recombinação homóloga que envolve um cromossomo danificado e uma molécula de DNA íntegra que é utilizada como molde para o reparo. O reparo por esta via requer proximidade física entre as sequências homólogas para permitir o emparelhamento de base de uma cadeia de DNA de uma extremidade do cromossomo quebrado com DNA complementar de uma sequência homóloga de doadores homólogos não danificados. (RENKAWITZ, LADEMANN e JENTSCH, 2014).

As primeiras etapas do reparo por recombinação homóloga são a ligação das extremidades quebradas por proteínas e enzimas especializadas, o aparato das extremidades 5' por uma endonuclease e o revestimento dessas regiões com proteínas Rad51. Em seguida o filamento de DNA-Rad51 busca a cromátide-irmã não danificada para a sequência complementar que será utilizada como molde para a síntese de DNA. A extremidade 3' do filamento danificado desloca uma das cromátides-irmãs não danificada, que forma uma alça D e inicia a síntese de DNA a partir de sua extremidade 3' livre.

Diversos testes com diferentes substâncias têm sido realizados objetivando identificar uma possível interação entre compostos químicos e proteicos que desencadeiem

a diminuição ou o reparo dos danos que culminam ou aceleram a transformação celular (PINTO e CRUM, 2002). Muitos medicamentos anticâncer usados atualmente são produtos naturais, derivados de produtos naturais, ou sintéticos. Dentro o grupo dos sintéticos, os complexos metálicos têm alcançado notoriedade no meio científico como fortes candidatos a se tornarem novas drogas quimioterápicas (PATEL; TANNOCK, 2009).

1.3 Quimioterapia e complexos metálicos como agentes quimioterápicos

Na última década, os principais tipos de tratamentos para o câncer têm sido a radioterapia, a cirurgia, a bioterapia e a quimioterapia. Sendo que, na maioria das vezes, é necessária a combinação de duas ou mais técnicas, com a finalidade de curar, prevenir ou melhorar a qualidade de vida do paciente.

A radioterapia é um tipo de tratamento que pode possuir funções curativas, paliativas ou adjuvantes, este tratamento irradia áreas específicas do organismo e seus métodos variam de acordo o tipo, localização, estágio do câncer e a saúde do paciente (INCA, 2012). A cirurgia é um tratamento local-específico para remoção de tumores sólidos sendo indicada para diagnóstico, profilaxia, reconstrução, inserção de dispositivos terapêuticos ou de suporte, entre outros. A bioterapia visa a redução dos efeitos colaterais provocados por outras terapias antineoplásicas ou combater o câncer a partir de uma modificação da resposta imunológica (BAXEVANIS; PEREZ; PAPAMICHAIL, 2009).

Dentre os diferentes tratamentos antineoplásicos, a quimioterapia se revela como a principal opção utilizada e, apesar da grande evolução dos conhecimentos sobre substâncias, protocolos e associações, as drogas quimioterápicas ainda são as mais tóxicas ao organismo dos pacientes. Tais medicamentos são potentes indutores de lesões estruturais e alterações bioquímicas e podem ser um fator limitante ao tratamento (LACERDA, 2001).

O tratamento quimioterápico é chamado de sistêmico quando aplicado endovenosamente, ou regional, quando instalada dentro de fluidos orgânicos específicos. Os quimioterápicos atuam, em geral, por meio de mecanismos citotóxicos, induzindo a morte celular por apoptose ou diminuindo o índice mitótico das células (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

A quimioterapia deve ser capaz de levar cura ou mesmo controlar o câncer, para se proporcionar aumento na expectativa de vida do paciente, representando assim, um significativo avanço na ciência oncológica. Um dos motivos a ser creditado este avanço está no grande e ainda crescente número de estudos a respeito de substâncias químicas com potencial atividade antineoplásica (FONTES, et al., 2005).

As classes de agentes antineoplásicos podem ser classificados também de acordo com seu mecanismo de ação e as mais utilizadas são: agentes alquilantes, antimetabólicos, os antibióticos e os inibidores mitóticos (REDDY E COUVREUR, 2010).

Os agentes alquilantes apresentam efeito citotóxico relacionado à indução de ligação covalente ao DNA por alquilação. Quando se ligam, os agentes alquilantes impedem que os filamentos do DNA se separem e, consequentemente, impedem a replicação. Algumas das drogas existentes nessa classe são as mostardas nitrogenadas e as nitrossuréias (HARDMAN E LIMBIRD, 2005).

Os antimetabólicos são desenvolvidos de maneira que seu mecanismo de atuação seja voltado para as diferenças metabólicas quantitativas de células tumorais, em comparação com as células normais. Eles são restritos à fase S do ciclo celular e atuam inibindo bioquimicamente a síntese do DNA. Dentre outros componentes da síntese do DNA, a inibição pode ser direcionada às purinas, no caso da 6-mercaptopurina; e à produção de ácido timidílico, com o 5-fluoruracil e o metotrexato (OLIVEIRA E ALVES, 2002).

Para se alcançar os resultados desejados, drogas de diferentes classes são usadas em combinação, para que as neoplasias sejam atacadas por diferentes mecanismos de ação. Assim, além de induzir resposta celular mais satisfatória, a combinação de dois agentes pode gerar menos efeitos colaterais (BONASSA e SANTANA, 2005).

O tipo de quimioterapia antineoplásica é definido levando-se em conta o objetivo do tratamento quimioterápico, sendo dita “adjuvante” quando ministrada após a retirada tumoral completa ou após radioterapia curativa e na ausência de metástases detectáveis. A quimioterapia “neoadjuvante” é indicada antes da cirurgia ou radioterapia, objetiva a redução do risco de metástases ou promoção da redução de tumores possíveis de tratamento locorregional (REDDY e COUVREUR., 2010).

“Curativa” é a quimioterapia indicada com finalidade de cura; “paliativa” é dita quando visa o controle de sintomas não repercutindo na sobrevida dos pacientes. Pode ser empregada para "controle temporário da doença", indicada em casos específicos, como são o câncer de ovário, o melanoma múltiplo e as leucemias crônicas, que se mantêm sob controle durante até anos, quando tratados, mesmo que haja recaída posteriormente (BAXEVANIS; PEREZ; PAPAMICHAIL., 2009).

De acordo com Silva et al (2017), a cura do câncer somente é alcançada quando toda a população de células neoplásicas foi eliminada, aplicando-se o conceito de “morte celular total”. Assim, uma estratégia visando aumentar a sua eficácia, a poliquimioterapia, vem sendo adotada como forma de tratamento objetivando a total erradicação da neoplasia.

A poliquimioterapia tem sido amplamente empregada e apresenta alta atividade citotóxica nas células cancerosas dentro da faixa de toxicidade que é tolerada pelo paciente na dosagem recomendada. Além disso, tem proporcionado maior interação com células alvo dos tratamentos e podem adicionalmente diminuir ou retardar a resistência celular aos fármacos (KATZUNG et al., 2014).

Os quimioterápicos antineoplásicos podem ser orgânicos, como o taxol e a vimblastina ou inorgânicos, como a cisplatina, que é um dos fármacos mais utilizados na terapia antineoplásica desde 1978 quando foi aprovada para uso clínico pela Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (FDA). A cisplatina é utilizada em cerca de 50% dos tratamentos quimioterápicos, incluindo câncer de bexiga, cabeça, pescoço, pulmão, ovário e testículo. É eficaz contra vários tipos de câncer, como carcinomas, linfomas e sarcomas (WEAVER, 2014; CHEFF, HALL, 2017).

Dentre os quimioterápicos inorgânicos encontram-se os complexos metálicos, que quando comparados aos compostos orgânicos, possuem vantagens para se desenvolver novos fármacos, dentre estas destacam-se as características intrínsecas aos centros metálicos, como o estado de oxidação; e as inúmeras possibilidades de síntese de compostos com diferentes propriedades cinéticas, termodinâmicas e eletromagnéticas, dependendo da polaridade e reatividade dos ligantes. O estudo dessas propriedades possibilita a obtenção de quimioterápicos de menor toxicidade e com espectro de atuação antitumoral mais amplo (FREZZA et al., 2010).

Complexos metálicos podem interagir com o DNA por meio de fatores reversíveis ou irreversíveis, como: substituição nucleofílica, interferência nos processos de replicação e transcrição, alterações estruturais (geradas pela formação de adutos no DNA), cooperatividade negativa (como na intercalação dos complexos entre dois pares de bases adjacentes causando um desenrolamento local da hélice dupla e sua distorção), ou mesmo a clivagem da molécula (ZHANG e LIPPARD, 2003; NAKAMOTO et al., 2008).

Complexos metálicos não interagem apenas com o DNA, mas também podem se ligar a outras moléculas alvo como o RNA e as proteínas. As interações com proteínas podem ocorrer por meio de vários mecanismos, por exemplo, inibindo topoisomerase II, prejudicando, assim, a replicação do DNA (LARSEN et al., 2003). Seus centros metálicos são carregados positivamente, e geralmente, compostos de coordenação podem promover ligação com biomoléculas negativamente carregadas, como o DNA, permitindo que os ácidos nucleicos sejam alvos potenciais (TUREL e KLJUN, 2011).

A estrutura do DNA permite que tais interações ocorram de forma covalente, por meio da ligação direta do complexo ao DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato. A

ligação não covalente também pode ocorrer por meio de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor da molécula, ou mesmo por meio da intercalação (KEENE, et al., 2009).

A descoberta da ação antitumoral da cisplatina ($\text{cis}-[\text{Pt}(\text{II})(\text{NH}_3)_2 \text{Cl}_2]([\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2])$) foi pioneira na ampliação dos estudos sobre as aplicações dos complexos metálicos. O potencial terapêutico mostrado por tais complexos possibilitou desenvolver novas linhas de pesquisa, que elucidaram o seu comportamento no interior do organismo e mecanismos de ação. Muitos compostos baseados em platina e em outros metais encontram-se na fase de estudos clínicos, para serem utilizados na quimioterapia (FONTES, et al., 2005). Em virtude do sucesso obtido pela Cisplatina ao tratar pacientes com diferentes tipos de câncer, outros compostos anticancerígenos eficazes baseados em metais foram desenvolvidos (FLOREA e BÜSSELBERG, 2011).

O mecanismo de atuação da cisplatina envolve etapas consecutivas de hidrólise, onde há a substituição dos ligantes cloretos e interação com ácidos nucleicos ou proteínas devido à afinidade de seus metabolitos por nitrogênio e enxofre. Atualmente, sabe-se que o alvo principal é o DNA e a conclusão da reação antitumoral se dá pela formação de adutos que inibem a transcrição e replicação dessa molécula, levando a morte celular. (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005).

A Cisplatina demonstrou grande eficácia no tratamento anticâncer, entretanto, os metalofármacos possuem limitações e efeitos colaterais semelhantes aos de outros fármacos, incluindo, a resistência celular, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, náuseas e vômitos. Apesar disso, são mais vantajosos que os compostos orgânicos conhecidos, devido a seu estado de oxidação, número e geometrias de coordenação, aos próprios ligantes, polaridade e reatividade que permitem projetar e sintetizar uma gama de compostos com variações de carga, das propriedades cinéticas e termodinâmicas (FREZZA et al., 2010; RONCONI e SADLER, 2007).

Dentre as drogas baseadas em metais não platina, os complexos de cobre(II) tem recebido atenção significativa pelo fato de ser um metal essencial e portanto, menos tóxico (WEHBE et al, 2017; CROSS et al, 2018). Segundo a literatura, alguns complexos de Cu(II) estão entre as mais potentes substâncias para clivar o DNA, além de possuírem grande potencial inibitório do crescimento celular (SILVA et al., 2011).

1.4 Complexos cúpricos como agentes quimioterápicos

O cobre é um micronutriente metálico importante para a fisiologia celular, participando

em vários processos biológicos, incluindo a composição estrutural de proteínas e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), por meio de reações de oxi-redução (TISATO et al., 2010). Além disso, é capaz de se ligar e clivar a dupla fita do DNA sob condições fisiológicas por duas vias diferentes: oxidativa (POGOZELSKI e TULLIUS, 1998) e hidrolítica (ROSSI et al., 2005; REY et al., 2009).

Estudos têm mostrado a relação entre a ativação e ligação dos reguladores-chave da angiogênese e o excesso de cobre, de modo que em certos tipos de tumores é detectado altos níveis deste metal (GOODMAN et al., 2004; HASSOUNEH et al., 2007). Contudo, também apresenta atividade antitumoral à inibição do proteassoma, indução da apoptose e ao seu mecanismo oxidativo, por meio da geração de EROS (XIAO et al., 2011).

Com base em estudos realizados com cobre, foi constatado que seus derivados não interagem covalentemente com o DNA, promovendo apenas interações do tipo eletrostática, intercalação e ligação ao sulco maior ou menor do DNA, na maioria dos casos, o metal apresentou ação de modificador inorgânico da estrutura orgânica da molécula bioativa e os ligantes conferiram afinidade e especificidade ao DNA. Diante disso, foi conferida especial atenção aos complexos de cobre(II) com a inclusão de ligantes doadores de Nitrogênio, por apresentarem elevada capacidade de interação com o DNA e eficácia antitumoral *in vitro* (SANTINI, 2014).

Compostos cúpricos, em particular, complexos de Cu(II), apresentam importante interesse farmacológico, pois apresentam efeitos anti-inflamatório, anti-ulceroso, anti-convulsivante e até mesmo atividade anti-tumoral (CERCHIARO e COSTA-FERREIRA, 2006). Algumas das causas da deficiência deste elemento são baixo armazenamento no nascimento, dieta inadequada, baixa absorção ou patológica, como a Doença de Menke, que é hereditária e afeta os níveis de cobre no organismo (de BIE et al., 2007). Sua falta pode provocar anomalias ósseas, por inibição da produção de enzimas envolvidas na estrutura de colágeno, afeta a estabilidade e quantidade de colágeno, comprometendo crescimento e qualidade dos pelos, além de neutropenia (SANTINI, 2014).

O excesso do metal também é prejudicial, se mostrando extremamente tóxico para o organismo (BREWER, 2010). A chamada Doença de Wilson, uma doença hereditária autossômica recessiva, promove acúmulo de cobre nos tecidos, principalmente no cérebro e fígado acarretando sintomas neuropsiquiátricos e desordens hepáticas. Doenças como encefalia espongiforme e mal de Alzheimer também estão diretamente ligadas a proteínas que possuem sítios de Cu(II) em sua estrutura (VILES, et al., 1999; LEGNAME, et al., 2002).

As configurações distorcidas (tetraédrica, quadrado piramidal e quadrado planar) em torno do centro metálico representam a configuração estrutural mais comum em complexos de Cu(II). Estas geometrias facilitam, por exemplo, a rápida transferência de elétrons, já que não requerem mudanças estruturais significativas, ao se variar o estado de oxidação do metal durante a realização de processos observados em proteínas azuis (HATHAWAY; TOMLINSON, 1970).

Por ter capacidade de interagir com o DNA e ser intrinsecamente importante para as células, o cobre tem sido alvo de estudos buscando explorar e caracterizar suas propriedades físicas, químicas e biológicas, (SILVA et al., 2011). Estratégias têm sido testadas para desenvolver compostos metálicos eficazes contra células tumorais de forma que, por serem capazes de gerar radicais livres, os complexos de cobre com diferentes ligantes são considerados drogas pró-apoptóticas. As moléculas associadas ao cobre podem ser naturais, sintéticas ou semi-sintéticas e, frequentemente, melhoram sua atividade antitumoral (FILOMENI et al., 2007; PRAVIN et al., 2017).

A possível aplicação de complexos de cobre como quimioterápicos tem despertado grande interesse, principalmente os complexos de cobre que contém ligantes *N,N*-doadores, por serem reconhecidos como nucleases sintéticas facilitadoras do processo de intercalação ao DNA (CHEN, SIGMAN, 1986; GALLAGHER et al., 1996). Um exemplo é o complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ que é capaz de clivar o DNA, a partir da ligação de sua espécie reduzida à porção do sulco menor do DNA e, quando combinado com o oxigênio molecular, induz a cisão da cadeia por oxidação do esqueleto pentose, inibindo o crescimento tumoral (SILVA et al, 2011; ZHANG et al., 2012).

Zhang et al., (2012) demonstraram que a presença do ligante 1,10-fenantrolina nos complexos metálicos, pode aumentar sua taxa de entrada nas células tumorais e induzir o processo de apoptose por meio da inibição da atividade do proteassoma. Assim os complexos contendo 1,10-fenantrolina podem ser bons agentes antitumorais, além de atuarem no sistema de clivagem do DNA.

Outra classe promissora são as Casiopeínas®, que são uma mistura de complexos ternários de cobre(II) contendo ligantes *N,N*-doadores (1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina e seus derivados) e ligantes do tipo *N,O*- ou *O,O*-doadores, tais como aminoácidos, peptídeos, acetilacetona ou salicilaldeidato (BRAVO-GÓMEZ et al., 2013). Estes complexos possuem atividade citostática, citotóxica e anti-neoplásica com resultados promissores como drogas antitumorais (RUIZ-AZUARA, BRAVO-GÓMEZ., 2010; KACHADOURIAN et al., 2010). Estudos realizados com Casiopeínas® confirmaram que estas clivam o DNA por meio de radicais livres, além de também induzirem fortes mudanças estruturais na tubulina,

integrina e fibronectina (BECCO, 2012).

Compostos ternários com estrutura de Cu(II)-(antib)-(phen), onde "antib" significa antibiótico e "phen" é o ligante 1,10-fenantrolina, são também estudados por suas atividades antineoplásicas (BORTOLOTTO et al., 2011). Vários complexos de cobre contendo ligantes N,N-doadores, como a 1,10-fenantrolina e seus derivados, já mostraram expressiva atividade nucleásica (FANTONI et al., 2018). Há evidências que suportam a ligação não-covalente de complexos de cobre associados à 1,10-fenantrolina ao sulco menor do DNA. Esses complexos têm atividade nucleásica contra o DNA de cadeia dupla, inibindo, assim, o crescimento celular (MARZANO et al., 2009; TISATO et al., 2010).

O complexo metálico $[Cu\ (1,10\text{-fenantrolina})_2]^{2+}$ foi considerado um agente de interação com o sulco menor do DNA, após redução *in situ* a $[Cu\ (1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$. A complexação da fenantrolina com o cobre possibilitou a ocorrência de uma eficiente atividade nucleofílica. Ao interagir com o sulco menor, esse composto pode se ligar ao oxigênio molecular resultando em um mecanismo de clivagem oxidativa (POLICARPI, 2011).

Para reforçar a importância de complexos de cobre (II), as tetraciclinas provocam quebras na fita simples e de fita dupla do DNA em concentrações micromolares em combinação com o cobre (II) (BUSCHFORT e WITTE, 1994). O composto do tipo tetraciclina mais utilizado é a doxiciclina (DOX). As tetraciclinas inibem a síntese proteica, impedindo a ligação do RNA transportador (RNAt) ao sítio aminoacil do ribossomo (SAIKALI e SINGH, 2003). Por isso, a DOX foi avaliada no tratamento quimioterápico e demonstrou induzir apoptose, sozinha ou combinada com um agente antitumoral conhecido (FOROEDI e DUVENVOORDEN, 2009).

Os quimioterápicos da atualidade têm apresentado o uso de antibióticos que interagem com o DNA. Nesse contexto, a doxiciclina possui vantagens como espectro de atuação mais amplo, baixo custo e baixa toxicidade. Seu principal mecanismo antimicrobiano é a inibição da síntese de proteínas. Ainda, a doxicilina possui diversos sítios de ligação a metais, o que amplia suas atividades farmacológicas conforme o composto de coordenação resultante dessa ligação (SILVA et al., 2010).

Bortolotto e colaboradores (2011) exploraram o potencial antitumoral baseado na atividade de clivagem do DNA de dois complexos ternários de cobre(II) com doxiciclina e tetraciclina: o $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ (CDP) e $[Cu(tc)(phen)]^{2+}$ (dox= doxiciclina, tc= tetraciclina, e phen= 1,10-fenantrolina). Em um estudo prévio conduzido por este grupo, ambos os complexos, especialmente o CDP, exibiram alta citotoxicidade contra a linhagem de células tumorais K562 e expressiva clivagem de DNA plasmidial, mesmo na ausência de

agentes adicionais. A partir destes estudos, foi relatado um dos maiores potenciais de fragmentação do DNA e ensaios de espectroscopia de dicroísmo circular mostraram que o composto altera a estrutura secundária do DNA, principalmente em relação ao empilhamento de bases nitrogenadas.

Sintetizado por Silva et al. (2011), o complexo metálico $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, possui geometria tetragonal distorcida ao redor do cobre. Por sua vez, o cobre está rodeado por dois ligantes bidentados (1,10-fenantrolina e doxiciclina), uma molécula de água e um íon perclorato (Figura 2). A ligação desse novo complexo ao DNA acontece principalmente pelo sulco maior. Mediante essa ligação, a clivagem da molécula de DNA pode ocorrer através de um mecanismo oxidativo que gera EROs.

Neste contexto, o presente trabalho se propôs a avaliar a atividade citotóxica e antitumoral do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, bem como sua seletividade para células tumorais, além de avaliar o potencial genotóxico, mutagênico e recombinogênico do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, utilizando o ensaio de micronúcleo *in vitro* e o ensaio *in vivo* SMART (teste de detecção de mutação e recombinação somática) em *Drosophila melanogaster*.

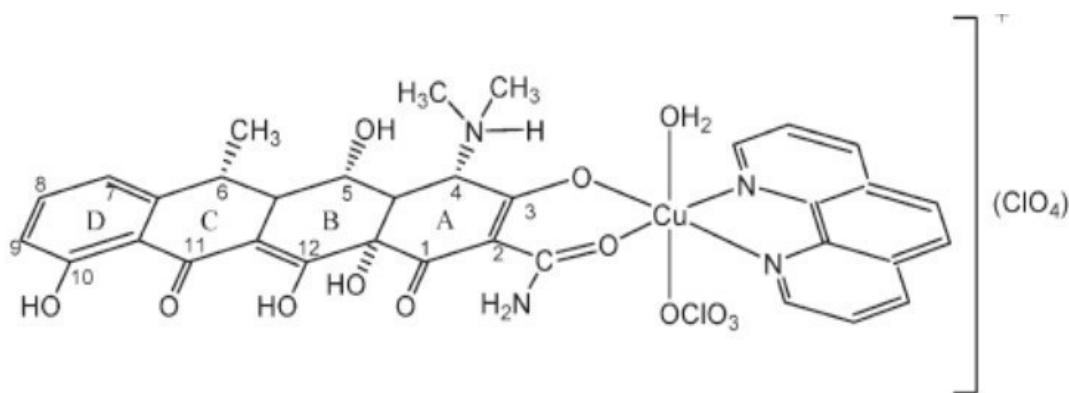


Figura 2 – Representação da estrutura química proposta para o complexo metálico $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (Adaptado de SILVA et al., 2011).

1.5 Testes para screening de novas drogas quimioterápicas

1.5.1 Ensaio citotóxico utilizando Resazurina

O teste que utiliza o corante resazurina é um teste estável que utiliza um corante solúvel em água para quantificar a viabilidade das células sem apresentar toxicidade às mesmas. A resazurina dissolvida em tampões fisiológicos forma uma solução de cor azul escuro que entra no citosol, onde é transformado por enzimas mitocondriais. A mudança de coloração do meio se dá de azul índigo (resazurina) a rosa fluorescente (resofurina), dependendo da viabilidade e metabolismo celular. A leitura da absorbância também é realizada em um leitor de ELISA (BOGO, 2009).

Células viáveis e com metabolismo ativo reduzem a resazurina a uma outra substância, a resorufina, que apresenta cor rosa e emite fluorescência. A grande vantagem deste teste de viabilidade celular é que a resazurina não causa morte celular, possibilitando o uso das mesmas células em experimentos posteriores (RISS et al., 2016).

A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, o que pode ser quantificado por meio de fluorescência ou por meio de absorbância. A quantificação de células por meio da fluorescência é mais utilizada pois apresenta maior sensibilidade do que a quantificação por meio da detecção de absorbância (RISS et al., 2016).

1.5.2 Teste para detecção de micronúcleos

Os ensaios genotóxicos também são requisitos iniciais de segurança para o desenvolvimento de possíveis fármacos. Entre os diversos ensaios de genotoxicidade está o teste de micronúcleo, sendo este um dos mais difundidos em genética toxicológica (BONASSI *et al.*, 2007). Este teste apresenta vantagens perante aos demais, pois além de não necessitar de células em metáfase, é considerado um procedimento rápido, sensível, preciso e barato (CARVALHO *et al.*, 2002).

O micronúcleo é uma pequena massa de material genético, circundada por membrana e separada do núcleo principal, formada durante a telofase através de um cromossomo inteiro ou fragmentado, resultante da ação do agente testado, que não foi incorporado ao núcleo principal ao final da divisão celular. Podem ser oriundos de lesões ao nível do DNA ou dos cromossomos, ou mesmo de disfunções no aparato mitótico (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo detecta agentes clastogênicos, que promovem quebra cromossômica, e aneugênicos, responsáveis por aneuploidia ou segregação cromossômica anormal. Este teste pode ser realizado *in vivo* ou *in vitro*. O ensaio *in vitro* pode ser realizado em diversos tipos celulares e proporciona simplicidade na quantificação dos micronúcleos (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Agentes aneugênicos são químicos que impedem a formação do fuso mitótico. Estes agentes provocam a formação de células multinucleadas, em que cada núcleo contém um número diferente de cromossomos, bem como a exclusão de cromátides inteiras do núcleo da célula, formando MNs. (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA; 2001; SPEIT *et al.*, 2007).

MNs são, portanto, biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica. Esses eventos, que levam a danos no genoma, podem ser avaliados *in vitro* por meio do Ensaio do Micronúcleo por Bloqueio da Citocinese (CBMN), que bloqueia o

ciclo celular utilizando o bloqueio de citocinese com a citocalasina B. Desta forma são produzidas células binucleadas, permitindo um escore de MNs mais preciso, excluindo as células que se dividem das células que não se dividem. Isto é feito para melhorar a confiabilidade, reduzindo a incidência de dados falso-positivos (DEEPA- PARVATHI; RAJAGOPAL, 2014).

A citocalasina B é um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação de anel de microfilamentos, que induz a contração do citoplasma e divisão da célula em duas células filhas (citocinese) (FENECH; CROTT, 2002; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). A análise dos MNs, após o bloqueio da citocinese pela citocalasina, fica restrita a células com aparência binucleada e evita subestimativas da frequência de MNs resultantes da contagem de células que não passaram por um ciclo de divisão e, consequentemente, não poderiam expressar estas estruturas (Figura 3). Assim, a metodologia possibilita a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir quanto a sua cinética de divisão e confere à técnica boa reproduzibilidade e confiabilidade, o que tem contribuído para a adoção do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese como um importante teste citogenético (FENECH, 2007).

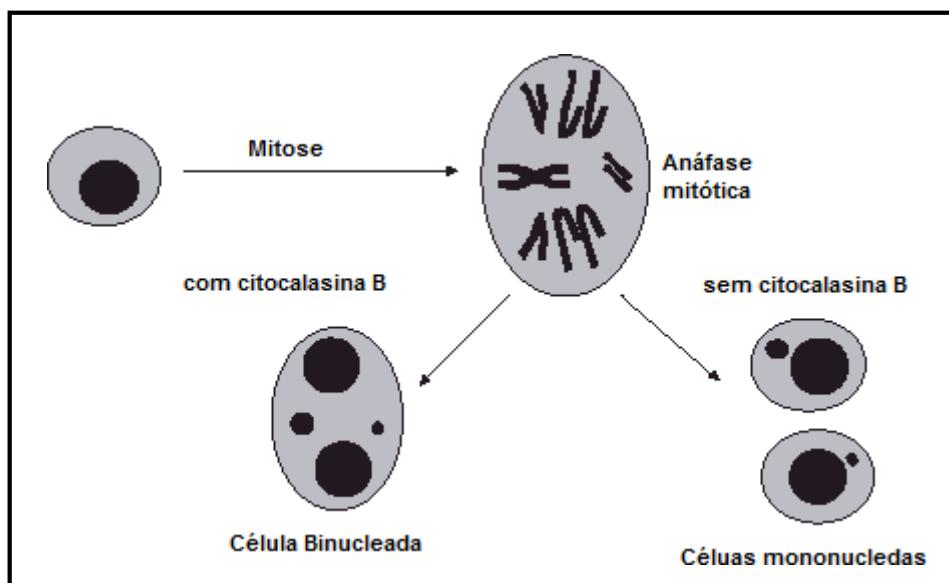


Figura 3 – Esquema do bloqueio da citocinese com citocalasina B, induzindo a formação de células binucleadas; e sem citocalasina B, formando células mononucleadas (Fonte: ZALACAIN et al., 2005).

Para quantificação da frequência de MNs são analisadas apenas células binucleadas com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático, com membrana nuclear intacta, e células claramente

distinguíveis do limite citoplasmático de células adjacentes. As células analisadas são classificadas de acordo com a quantidade de MNs: 0,1, 2 ou mais (FENECH, 2000). O teste do micronúcleo tem sido amplamente usado para avaliar os efeitos clastogênicos e aneugênicos de diferentes agentes químicos *in vitro* (CANO et al., 2017; SILVA et al., 2017).

1.5.3 Teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART).

A *Drosophila melanogaster* foi um dos primeiros organismos modelos a serem usados em genética, no laboratório do Dr. T.H. Morgan. Foi escolhida por possuir um ciclo vital curto do tipo diplóide, e é simples de cultivar em frascos contendo meio de cultura. (STRACHAN, 2013). A importância da *D. melanogaster* como modelo para a genética humana é demonstrada pelo fato de que 60% dos genes causadores de doenças em humanos, bem como 70% dos genes do câncer estão presentes neste organismo teste (GRIFFITHS, et al., 2016).

Testes bem definidos, para verificação da mutagenicidade de agentes físicos e químicos, têm sido desenvolvidos em *D. melanogaster*. Estes testes são capazes de mensurar um amplo espectro de danos genéticos induzidos em células germinativas, assim como em células somáticas (WÜRGLER et al., 1984). Além disso, já está muito bem documentado o fato de a *D. melanogaster* possuir um eficiente sistema para o metabolismo de agentes xenobióticos (BAARS, 1980; HÄLLSTRÖM et al., 1984; VOGEL, 1980).

De acordo com GRAF et al. (1984), a análise dos possíveis efeitos de substâncias mutagênicas e recombinogênicas pode ser realizada por meio do teste da mancha da asa, denominado SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*), que detecta diferentes tipos de manchas mutantes que podem ser resultantes tanto de mutação, recombinação, deleção ou não disjunção cromossômica, ocorridas no cromossomo nº 3 da *D. melanogaster*.

O SMART foi desenvolvido para detectar a perda da heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos nas asas de *Drosophila melanogaster*. Este teste é rápido, fácil e de baixo custo (Graf et al., 1984). São utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *mwh/mwh* (*mwh*, *multiple wing hairs*), *flr³/ln(3LR)TM3* (*flr³*, *flare-3*) e *ORR; flr³/ln(3LR)TM3* (*Oregon R*, *flare-3*) com expressões fenotípicas bem definidas (Figura 4).

A linhagem *mwh* é mantida como um alelo viável em homozigose recessiva. A mutação *mwh* está localizada na extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 (3 – 0,3) e em condições de homozigose produz múltiplos tricomas por célula ao invés de apenas um único

tricoma, como normalmente acontece (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A linhagem *flr³* possui um alelo recessivo que, afeta o fenótipo do pêlo da asa. Ele também está localizada no braço esquerdo do cromossomo 3, mas em posição mais proximal (3 – 38,8). Ela produz pêlos mal formados que têm a forma de uma chama. Todos os três alelos mutantes conhecidos são letais em homozigose recessiva nos zigotos (os zigotos, homozigotos para o *flr³*, não são capazes de desenvolver moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas do disco imaginal são viáveis e levam à formação de células mutantes nas asas. Devido à letalidade no zigoto, o alelo *flr³* é mantido na linhagem estoque com a presença de um “balanceador cromossômico” com múltiplas inversões cromossômicas (do inglês: *TM3, Bd^s - Third multiple 3, Beaded-Serrate*) (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A linhagem *Oregon R, flare-3* (ORR) foi construída por Frölich e Würgler (1989) e apesar de apresentar o marcador *flr³* se difere da linhagem *flare-3* por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT, além de possuir alta atividade de enzimas citocromo P 450 (HALLSTRÖM, 1986). Pelo alto nível de citocromo P 450 constitutivo na linhagem ORR, o teste SMART torna-se mais sensível a ativação de promutágenos dependentes de ativação de CYP 450.

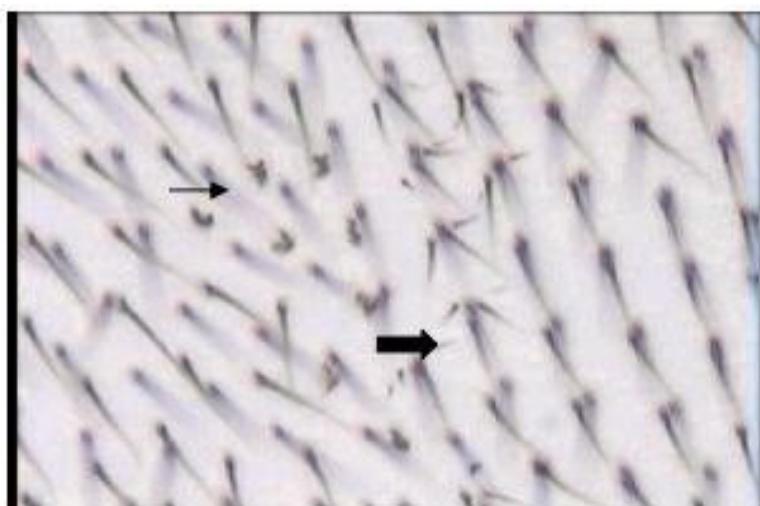


Figura 4 – Fotomicrografia, em microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de pêlos múltiplos (*mwh*), seta larga, e apresentação de pêlos *flare* (*flr³*), seta menor.

Caso ocorra uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, tal alteração poderá estar presente em todas as células descendentes, e formará um clone de células mutantes. A alteração gênica é responsável por uma mudança visível no fenótipo. Assim sendo, as células mutantes serão detectadas como uma mancha de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

No SMART, são realizados dois tipos de cruzamentos: Padrão (ST) e Alta Bioativação

Metabólica (HB). No cruzamento ST fêmeas virgens da linhagem $flr^3/\ln(3LR)TM3$ são cruzadas com machos mwh/mwh e no cruzamento HB são cruzadas fêmeas virgens da linhagem $ORR; flr^3/\ln(3LR)TM3$ com machos mwh/mwh . Destes cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcado (MH: $mwh +/+ flr^3$) que possuem asas borda lisa; e heterozigoto balanceado (BH: $mwh +/+ TM3, Bd^s$) com asas fenotipicamente serrilhadas (Fig 5).

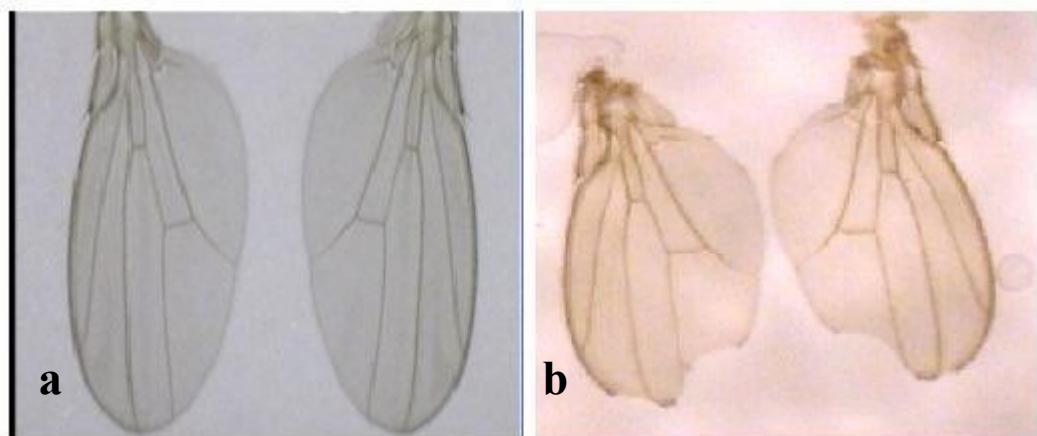


Figura 5 – Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, das asas de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de descendentes marcador trans-heterozigoto (MH: $mwh +/+ flr^3$) letra **a** e balanceador heterozigoto (BH: $mwh +/+ TM3, Bd^s$) letra **b**.

Durante a metamorfose, grupos específicos de células chamados discos imaginais se proliferam mitoticamente. Em contato com o mutágeno. Caso aconteça uma mutação em uma dessas células, esta mutação estará presente em todas as células filhas, expressando-se nos tricomas das asas (GRAF *et al.*, 1984).

As manchas também podem ser classificadas como pequenas e grandes, uma mancha pequena possui uma ou duas células, caracterizados por se formarem durante os últimos estágios de divisão mitótica durante a formação das asas; as manchas grandes possuem três ou mais células alteradas e se originam nos primeiros estágios de desenvolvimento larval. (GRAF *et al.*, 1998).

1.5.4 Testes para avaliação antitumoral *in vivo*

Trabalhos experimentais envolvendo a indução de tumor em animais foram iniciados no final do século XIX, sendo que a simples observação dos pacientes com câncer era até então a metodologia mais utilizada no estudo desta doença. Foi nesse período, também, que houve o aperfeiçoamento da microscopia e o descobrimento de raios X, possibilitando pesquisas mais avançadas na investigação de neoplasias (PONCE *et al.*, 1996).

Modelos de câncer em animais são sistemas que mimetizam a natureza do tumor

encontrado em humanos. Assim, a escolha do modelo tumoral *in vivo* é fundamental durante a investigação de uma nova droga anticancerígena, tumores transplantáveis trouxeram melhoria na pesquisa de novas técnicas e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, especialmente para tumores experimentais em animais, que são a base de recentes melhorias na terapia do câncer (KERBEL, 2003).

O tumor de Ehrlich foi descrito como um adenocarcinoma de mama murino espontâneo, originário de células epiteliais de carcinoma mamário, e foi utilizado como tumor experimental pelo transplante subcutâneo entre camundongos. Posteriormente, foi descrita a forma ascítica do tumor, desenvolvida no peritônio dos camundongos, e nomearam-o como carcinoma ascítico de Ehrlich pela presença de líquido ascítico junto com as células de carcinoma. O carcinoma ascítico de Ehrlich foi disseminado rapidamente nos institutos de pesquisa pela vantagem de conter células tumorais homogêneas e livres, com a possibilidade de padronização do número de células ser transplantáveis, quantificação do crescimento e estudo da biologia da célula tumoral (OZASLAN et al., 2011).

Após a inoculação na cavidade peritoneal o carcinoma ascítico de Ehrlich cresce em suspensão no peritônio, em duas fases: a fase proliferativa na qual o número de células tumorais aumenta exponencialmente, seguido da fase estacionária (plateau) no qual o número de células permanece quase constante (TANNOK, 1969). Durante a transição da fase proliferativa e a fase estacionária acontece modificações morfológicas e metabólicas como deterioração estrutural, diminuição do número de mitocôndrias, declínio da concentração do ATP, diminuição da biosíntese de DNA e RNA, diminuição da síntese de proteína, perda de nucleotídeos, nucleósidos e bases, entre outros (OZASLAN, 2011).

O Sarcoma 180 foi inicialmente identificado no Croker Laboratory em 1914, é um tumor de natureza sólida que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongo (SCHABEL, 1977). Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa e mantém-se sem alterações até os dias atuais. A forma sólida caracteriza-se por ter um rápido crescimento atingindo uma média de 18x14x10 mm por volta de sete dias do transplante. Pode causar metástase para os pulmões o que pode ocorrer quando os tumores estão com mais de quatro semanas de evolução (SCHABEL, 1977).

Em 1951, após a inoculação intraperitoneal do fluido leitoso do Sarcoma 180 (sólido) em camundongos swiss, Charlotte Friend desenvolveu a forma ascítica do tumor nos animais, sendo observado que muitos tumores a partir da terceira semana de implante desenvolvem necrose, sendo a morte dos animais ocasionada por desnutrição, toxemia e septicemia (PESSOA, 2000).

2 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e seletividade em células tumorais do composto metálico derivado do cobre(II): $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, bem como avaliar sua ação genotóxica, mutagênica e recombinogênica utilizando tanto ensaios *in vitro* quanto *in vivo*.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar o coeficiente de partição dos complexos de cobre por meio de um sistema de água *n*-octanol;
- Testar a atividade antitumoral *in vitro* do complexo metálico utilizando as linhagens celulares malignas de sarcoma (S180 e TG180) e melanoma (B16F10);
- Testar a atividade citotóxica em linhagens celulares imortalizadas de macrófagos (RAW 264.7) por meio do ensaio de redução da resazurina;
- Determinar a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) do complexo nas diferentes linhagens celulares;
- Determinar o índice de seletividade do complexo;
- Avaliar a capacidade do complexo metálico em reduzir o desenvolvimento tumoral do sarcoma S180 e tumor Erhlich *in vivo*;
- Avaliar o potencial do complexo em causar quebras na molécula de DNA utilizando o teste de micronúcleo *in vitro*;
- Avaliar o potencial do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ em causar mutações e recombinações cromossômicas *in vivo* utilizando o teste SMART em *Drosophila melanogaster*.

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$

O $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ foi sintetizado e gentilmente cedido por Dr^a. Elene Cristina Pereira Maia e Dr^a. Priscilla Pereira Silva Caldeira do Departamento de Química e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2 Medição do coeficiente de partição

O coeficiente de partição para os complexos de cobre(II) foram determinados em duplicita em um sistema água *n*-octanol em pH 7.4. Foi preparada uma emulsão de volumes

iguais ($1500\mu\text{L}$) de solução aquosa de complexo de cobre (6.7×10^{-4} mol L $^{-1}$) e *n*- octanol. O sistema contendo a mistura foi selado hermeticamente, protegido da luz e mantido sob vigorosa e constante agitação por 24 horas. A mistura foi centrifugada (13000 rpm, 10 min) e alíquotas de ambas as fases foram cuidadosamente retiradas da camada *n*- octanol superior e aquosa inferior. A concentração de cobre das camadas aquosa e *n*- octanol foram determinadas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (EAAFG) em um espectrofotômetro Zeeman 220 modelo Varian equipado com um atomizador de tubo de grafite e um amostrador automático. O coeficiente de partição foi expresso como log P, em que $P = [\text{Cu}]_{n\text{-octanol}} / [\text{Cu}]_{\text{aquoso}}$.

3.3 Animais, linhagens celulares e condições de cultivo *in vitro*

Para este estudo foram utilizadas três linhagens celulares murinas tumorigênicas (sarcoma TG180, sarcoma S180, melanoma B16F10) e uma linhagem celular murina não tumorigenica (macrófago RAW 264.7). As linhagens foram mantidas *in vitro* em meio RPMI-1640, com 10% de soro fetal bovino, 25 mM HEPES, 10.000UI/mL penicilina-estreptomicina, e 2 mM L-glutamina. A manutenção *in vivo* das células tumorais foi realizada pela inoculação de $300\mu\text{L}$ de células (1.0×10^7 células) no peritônio dos camundongos BALB-C, pesando ± 20 gramas. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia em condições controladas. Os animais foram colocados em um sistema micro-isolador em condições padronizadas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, humidade $60 \pm 5\%$, ciclo de 12h luz/12h escuro) com água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos de manuseio, uso e eutanásia destes animais seguiram as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil (CEUA/UFU protocolo N. 001/13 e 016/14).

3.4 Avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio com resazurina

As linhagens de células foram ressuspensas em RPMI-1640 suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram então distribuídas (1×10^5 células/poço suspensas em $100\mu\text{L}$ de meio RPMI-1640) em placa estéril de 96 poços e incubada com diferentes concentrações de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, de acordo com a concentração necessária adequada para cada tipo celular, em presença e ausência do removedor de espécies reativas de oxigênio

(ERO) n-acetilcisteina (NAC) por 24h (37 °C e 5% CO₂).

- Sarcoma S180: 100µM; 50µM; 10µM; 5µM; e 1µM.
- Sarcoma TG180: 100µM; 50µM; 25µM; 12,5µM; 10µM; 5µM; 2,5µM; 1,25µM; 1µM; 0,5µM; 0,1µM; 0,05µM; e 0,025µM;
- Melanoma B16F10: 50µM; 10µM; 5µM; 2,5µM; 1µM; 0,25µM; 0,1µM; e 0,05µM;
- Macrófago RAW 264.7: 25µM; 10µM; 5µM; 1µM; 0,5µM; 0,25µM; 0,1µM; 0,05µM; 0,025µM; 0,01µM; 0,005µM; 0,001µM; 0,0005µM; e 0,0001µM.

Em seguida, 20 µL de PBS contendo resazurina (0.1 mg/mL) foi adicionado em cada poço. Após 4h de incubação, as absorbâncias a 570 nm e 600 nm foram lidas por meio de um leitor múltiplo. De acordo com Bénéré et al., (2007), a porcentagem de viabilidade celular obtida pelo teste de Alamar Blue é dada pela seguinte fórmula:

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

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(dox)(phen)]²⁺ à 570nm;

A2 = absorbância das células tratadas com [Cu(dox)(phen)]²⁺ à 600nm;

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

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

O índice de seletividade (IS) foi obtido usando a fórmula IS= IC₅₀ das células não tumorais/IC₅₀ das células tumorais. Índice de seletividade ≥2 foi considerado significante (PEREIRA et al., 2015).

3.5 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* com sarcoma 180

Para analisar o efeito antitumoral *in vivo* do [Cu(dox)(phen)]²⁺, um tumor sólido foi induzido com a inoculação de células de sarcoma 180 (1×10^6 células), que foram implantadas subcutaneamente na região submaxilar esquerda de camundongos BALB/C (5 animais por grupo). 24h depois da inoculação das células, uma única dose de [Cu(dox)(phen)]²⁺ (5, 10 e 15 mg/kg) e PBS (controle negativo) foi administrada intraperitonealmente em camundongos portadores de tumores e o controle negativo foi

administrado com PBS. No 9º dia, sob anestesia, os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical. Os tumores foram excisados e pesados. A taxa de *inibição* do crescimento tumoral (%) foi calculada pela seguinte fórmula: Inibição = [(A - B)/A - 1] × 100, onde A é a média do peso do tumor do controle negativo e B é aquela do grupo tratado.

3.6 Determinação de tempo de sobrevivência e alterações no peso

Para os experimentos com modelos animais de tumor ascítico de Ehrlich, foram utilizados camundongos BALB/C de 5 semanas de idade (n=5). Os experimentos consistiram em injeção intraperitoneal de 1×10^5 células de tumor nos camundongos. No dia seguinte ao inóculo, foram iniciados os tratamentos com PBS (controle negativo) e com o complexo $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ a 8 mg/kg de peso corporal e 1 mg/kg de peso corporal. O tratamento foi realizado a cada dois dias até o 11º dia. A massa dos animais também foi monitorada a cada 2 dias até o 16º de experimento. No 9º dia, crescimento tumoral foi observado (cavidade abdominal aumentada). O tempo total de experimento foi de 29 dias.

3.7 Avaliação da atividade genotóxica por meio de Teste do Micronúcleo *in vitro*

Avaliação da genotoxicidade foi realizada de acordo com o Guia OECD 487 para o Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro* usando citocalasina B com adaptações. Células B16F10 foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM, L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram então distribuídas (2×10^4 células/poço suspendidas em 100 µL de meio) em placa estéril de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (1; 0,25; 0,1; e 0,05µM) por 24 h (37°C e 5% CO₂), quando o tratamento foi substituído por 100 µL de meio contendo citocalasina B a 30µM. Mitomicina C (50µg/mL) foi usada como controle positivo, como controle negativo foi utilizado PBS. Após a incubação por 24 h, as células foram fixadas com solução de PBS/Formaldeído a 10% e coradas com Hoechst 33258. Usando um microscópio de fluorescência invertido digital EVOS® fl, 2000 células na placa foram contadas e o percentual de micronúcleos em células binucleadas foi determinado.

3.8 Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*

3.8.1 Compostos químicos, linhagens estoque, cruzamentos e tratamentos

Para a realização do experimento, o CDP foi preparado em três concentrações distintas (6,92; 13,84 e 27,67 mM), tais concentrações foram determinadas a partir de um ensaio prévio de toxicidade do CDP. O cloridrato de doxorrubicina (DXR, CAS: 23214-92-8, número de lote 4PL0103), produzido pelos Laboratórios Eurofarma e distribuído por Zodiac Pharmaceuticals S.A., São Paulo, Brasil foi usado como controle positivo a uma concentração de 0,4 mM (SILVA et al., 2017). Para o controle negativo, foi utilizada água de osmose reversa.

Foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, multiple wing hairs (*mwh*, 3-0, 3), flare-3 (*flr3*, 3-38.8), e ORR; flare-3 (*flr3*, 3-38.8), As linhagens foram mantidas em uma incubadora (411D NEW ETHIC) a aproximadamente 25 °C (± 1 °C), 60% de humidade, em frascos contendo meio preparado com água (820 mL), ágar (11 g), banana (156 g) nipagim (1 g) de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, 25 g).

Dois cruzamentos, sob as mesmas condições, foram conduzidos. ST (cruzamento padrão) em que fêmeas virgens de genótipo *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* são cruzadas com machos de genótipo *mwh/mwh*; e HB (cruzamento de alta bioativação metabólica), onde fêmeas virgens de genótipo *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* foram cruzadas com machos de genótipo *mwh/mwh*.

De cada cruzamento foram obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcado (MH), com genótipo *mwh +/+ flr³* e heterozigoto balanceado (BH), com genótipo *mwh +/+ TM3,Bd^s*. A coleta de ovos foi realizada após 8 h de postura em frascos contendo uma base sólida de ágar (4%) e uma camada de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com sacarose.

Após 72 \pm 4 h, larvas de terceiro instar foram lavadas em água de osmose reversa e coletadas usando uma peneira de aço de malha fina. As larvas coletadas, resultantes de ambos os cruzamentos foram transferidas para frascos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de purê de batatas instantâneo mais 5,0 mL de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, nas concentrações de 6,92; 13,84 ou 27,67 mM dissolvido em água de osmose reversa. Posteriormente, foram colocados na incubadora, onde a metamorfose pode ser completada. As moscas adultas emergentes de cada tratamento foram coletadas e preservadas em etanol a 70%.

Foi realizado um teste de toxicidade com cinco diferentes concentrações de CDP (6,92; 13,84; 27,67; 55,34 e 110,68 mM), bem como os controles negativo e positivo, em tubos com 100 larvas cada. A toxicidade foi determinada com base no número de larvas que não atingiram a idade adulta. O número de moscas sobreviventes foi indicativo da toxicidade dos compostos.

3.8.2 Preparação e análise microscópica das asas

As asas das moscas adultas, preservadas em etanol a 70%, foram retiradas com o auxílio de pinças entomológicas e lupa estereoscópica, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral, e 50 mL de água destilada) e distendidas sobre uma lâmina seca e codificada. As lâminas foram secas por 2h em uma chapa quente (40 °C), cobertas com lamínula e deixadas para secar. As asas foram analizadas usando um microscópio óptico, em aumento de 400x (objetiva de 40x). Foram registrados o número, tipo das manchas (simples, quando apresentam células expressando os marcadores *mwh* ou *flr³*; ou gêmeas, quando expressam, simultaneamente, os marcadores *mwh* e *flr³*) e tamanho das manchas, que podem ser pequenas quando 1 ou 2 células expressam os marcadores ou grandes, quando 3 ou mais células expressam. Aproximadamente 48.000 células foram analisadas por mosca.

3.9 Análise estatística

Nos testes de Citotoxicidade, o IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular sobre o controle) foi determinada usando o GraphPad Prism 6.0, por regressão não linear, onde a porcentagem de viabilidade celular foi determinada como uma função do logaritmo das concentrações testadas, assumindo o intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$). Gráficos expressos como média ± erro padrão da média foram plotados. Os testes de Micronúcleo *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo* foram estatisticamente avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni's também usando o software GraphPad Prism 6.0. As diferenças para afreuencia de micronúcleos foram consideradas como significativas quando $p <0,05$ e para a atividade antitumoral quando $p <0,0001$.

Na avaliação pelo SMART, as frequências de manchas por mosca, para cada tratamento, foram comparadas em pares utilizando o teste binomial condicional de

Kastenbaum e Bowman (1970), como proposto por Frei e Wurgler (1988), que resulta em quatro diagnósticos possíveis: positivo, negativo, inconclusivo ou fracamente positivo, ao nível de significância $p < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

4.1 Avaliação de lipofilicidade do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$

A lipofilicidade é um dos principais parâmetros que afetam a incorporação de drogas pelas células, sendo que a fraca biodisponibilidade é uma barreira importante a ultrapassar durante o tratamento do câncer e, neste contexto, a fraca solubilidade em água é uma característica desfavorável (ZAMBONI et al, 2012). O coeficiente de partição água *n*-octanol ($\log P$) é uma medida amplamente aceita de lipofilia, onde *n*-octanol é um modelo da camada de lipídios de uma membrana celular e a água é o fluido dentro e fora das células. (PLATTS et al, 2006).

O CDP apresenta valor de balanço hidrofílico-lipofílico apropriado para ser absorvido, permear através da membrana e então permanecer solúvel no citoplasma para a ação desejada. Além disso, esse composto é carregado positivamente, o que aumenta sua afinidade com a espinha dorsal do DNA carregado negativamente, o alvo intracelular mais importante para drogas antitumorais (SILVA et al, 2014).

Os valores negativos de LogP indicam preferência para a fase aquosa e os valores positivos de LogP indicam preferência para a fase hidrofóbica. A lipofilicidade dos ligantes livres, complexos CDP e Cisplatina (um complexo metálico já utilizado na quimioterapia) são mostrados na Tabela 1.

Os valores de lipofilicidade do CDP indicam que o composto é bem distribuído nas fases aquosa e orgânica, mesmo como um complexo carregado. De fato, $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ é ligeiramente mais solúvel em meio aquoso do que em solvente hidrofóbico, sendo mais lipofílico do que cisplatina, bem como seus ligantes livres doxiciclina e fenantrolina. Este resultado tem características importantes para a atividade citotóxica, uma vez que possui lipofilicidade satisfatória para atravessar a membrana celular e permite a interação com o DNA, o alvo intracelular mais importante dos agentes antitumorais.

Tabela 1 – Lipofilicidade dos ligantes livres e de alguns complexos metálicos

Nome	Valores de lipofilicidade
1,10-fenantrolina	2.19*
doxiciclina	0.60**
$[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$	-0.09 ± 0.01
cisplatina	-2.27***

* os valores de log P foram estimados pelo software ALOGPS 2.1;

** Hlavka e Boothe, (1985)

*** Platts et al, (2006)

4.2 $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ é citotóxico e seletivo contra linhagens celulares específicas

A atividade citotóxica foi avaliada pela capacidade biorredutora de metabolização da resazurina pelas células. Foram utilizadas duas linhagens celulares de sarcoma, TG180 (Figura 6A) e S180 (Figura 6B), uma linhagem celular de melanoma B16F10 (Figura 6C) e uma linhagem celular não tumorigenica derivada de macrófagos RAW 264.7 (Figura 6D). Os resultados indicaram que CDP induziu citotoxicidade dose dependente em todas a linhagens celulares (Figura 6). Os ligantes doxiciclina e fenantrolina não apresentaram citotoxicidade nas mesmas concentrações do complexo metálico, de modo que não foi possível determinar um valor de IC₅₀ para os ligantes livres (Figura 6 E e F).

Os valores da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foram obtidos a partir de uma regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 6.0 (Tabela 2). A linhagem celular de melanoma B16F10 é mais suscetível a efeitos citotóxicos do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (IC₅₀=1,4μM) quando comparada com TG180 (IC₅₀=6,2μM) e S180 (IC₅₀=13,3μM).

A comparação da citotoxicidade de células não tumorais com células tumorais (IC₅₀ de células não tumorais/IC₅₀ de células tumorais) definiu o Indice de Seletividade (IS), sendo 8,7 para B16F10; 2,0 para TG 180 e 0,9 para S180 (Tabela 2). Baseado nas análises dos resultados da tabela 2 podemos observar que CDP é mais citotóxico para a linhagem tumoral de melanoma murino B16F10.

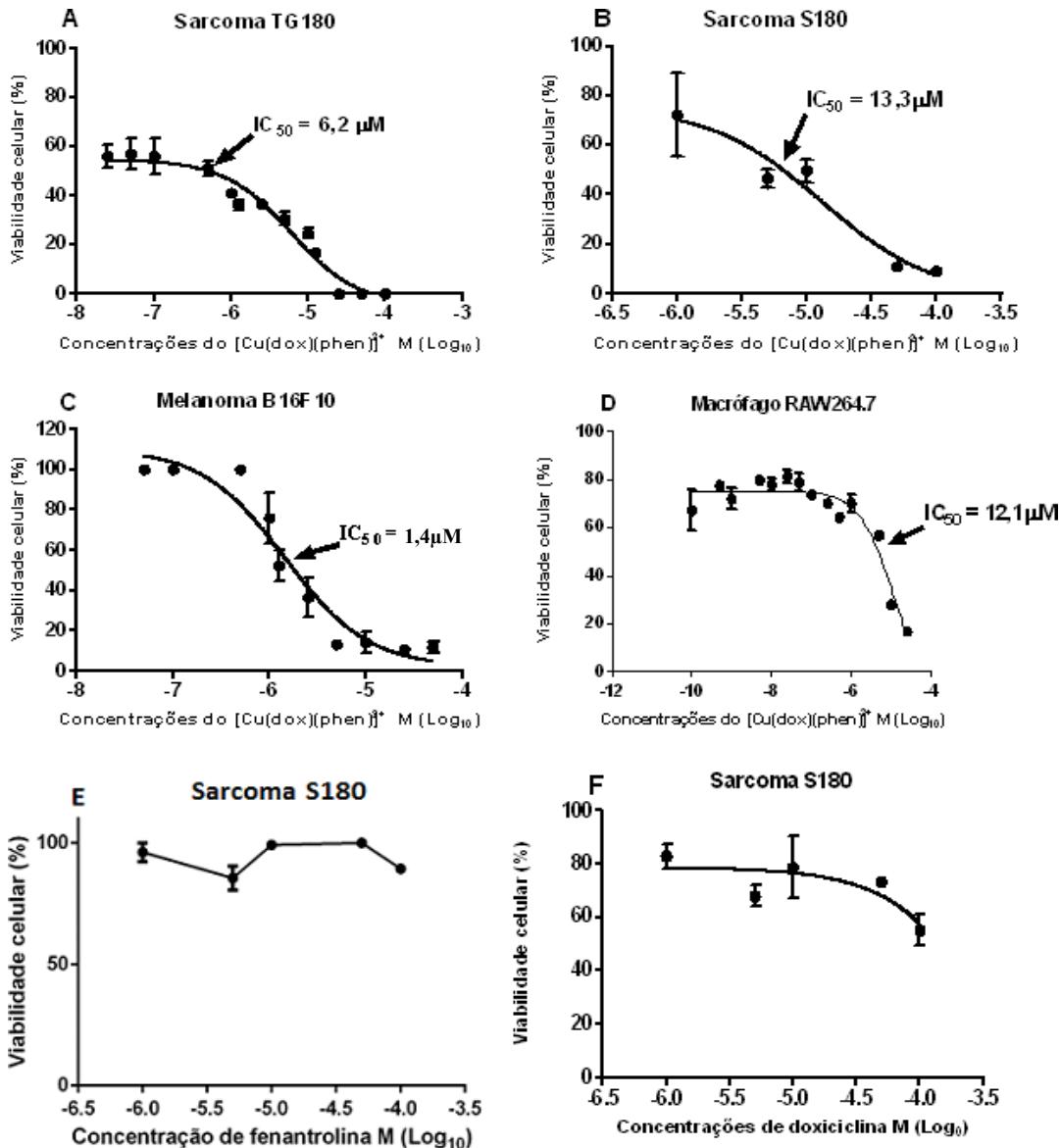


Figura 6 – Curvas sigmoidais dose resposta após o tratamento com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$, fenantrolina e doxiciclina. $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ incubado em diferentes concentrações durante 24 horas com (A) – sarcoma TG180, (B) – sarcoma S180, (C) – melanoma B16F10 e (D) – Macrófago RAW 264.7; Fenantrolina (E) e Doxiciclina (F) incubada em diferentes concentrações durante 24 horas com S180 sarcoma. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão para $n =$ triplicatas ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) do $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ em quatro linhagens celulares

Linhagens celulares	IC_{50} (μM)	Índice de Seletividade (SI)
S180	13.3	0.9
TG180	6.2	2.0
B16F10	1.4	8.7
RAW 264.7	12.1	

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que o $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ altera a atividade metabólica das células tumorais, o que pode resultar em sua atividade citotóxica. Corroborando com estes resultados, atividade citotóxica dose dependente foi obtida por Nunes et al (2015) na linhagem celular de melanoma B16F10 após 24 horas de exposição a quatro complexos de cobre diferentes. De acordo com Tisato et al, (2010) e Zhang et al, (2012), muitos complexos de cobre causam inibição do proteasoma através da entrega de íons de cobre em células tumorais levando à morte celular. Além disso, ligantes 1,10-fenantrolina no complexo de cobre aumentam a eficiência na entrega de íons de cobre em células-alvo.

Adicionalmente, os complexos do tipo $[Cu(phen)]^{2+}$ se ligam ao DNA via intercalação, o que aumenta sua atividade nuclease oxidativa. O complexo de cobre $[Cu_2\{bcmp(-H)\}(\mu-OH)](NO_3)_2 \cdot H_2O$ também mostrou atividade citotóxica e foi seletivo para linhagens celulares de câncer pancreático sobre as células não-cancerosas, induzindo apoptose de forma dependente de p53 e ataque nucleofílico, promovendo hidrólise do DNA (MONTAGNER et al., 2015).

Os complexos de cobre testados por kalinowska-Lis et al., (2017) mostraram comportamento seletivo à linhagem celular de melanoma sobre células não cancerígenas. Resultados semelhantes foram obtidos por Mroueh et al., (2015) que testaram a atividade antitumoral do complexo de cobre bis[$(\mu^2\text{-cloro})\text{cloro}(1,10\text{-fenantrolina})\text{cobre(II)}$] em diferentes linhagens de células (B16, MDA-MB-231, A549, HT-29 e SF), obtendo uma potente atividade antitumoral em todas as linhagens.

Complexos de cobre associados a tetraciclinas induzem quebras de cadeia simples e dupla na molécula de DNA por um mecanismo quelatado envolvendo os grupos amida e os Carbonos 3, 10 e 11 da tetraciclina (BUSCHFORT e WITTE., 1994). Resultados semelhantes foram previamente descritos por Silva et al, (2011) em que foram detectadas quebras simples e duplas induzidas por EROS permitindo uma elevada atividade citotóxica induzida pela intercalação de $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ no sulco maior da molécula de DNA.

A DOX tem atividade citotóxica em culturas celulares de linfócitos do sangue periférico humano, diminuindo os índices de divisão mitogênica e nuclear. Curiosamente, no trabalho de Şekeroğlu et al, (2012) DOX não exibiu ação genotóxica na análise cromossômica e testes de micronúcleo. O efeito genotóxico induzido por DOX foi detectado através do ensaio Cometa em vários órgãos de ratos, com os efeitos genotóxicos mais significativos detectados ao utilizar as doses mais elevadas do composto (160 mg/kg) (ARSHAD et al, 2005).

Observa-se amplamente na literatura que um dos possíveis mecanismos de ação dos

complexos de cobre é a geração de EROs, as quais interagem com componentes celulares induzindo a morte. Neste contexto, foi realizado um co-tratamento das células B16F10 e RAW 264.7 com $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ em associação com o agente antioxidante N-acetilcisteína (NAC), um capturador de EROs. Foi verificado um aumento na IC_{50} da linhagem de melanoma murino B16F10 de aproximadamente 3 vezes, onde a concentração inibitória mudou de $1,4 \mu\text{M}$ para $4,7 \mu\text{M}$ (Figura 7A) e promoveu aumento de cerca de 2 vezes para a linhagem celular RAW 264.7, indo de $12,1 \mu\text{M}$ para $22,1 \mu\text{M}$ em RAW 264.7 (Figura 7B).

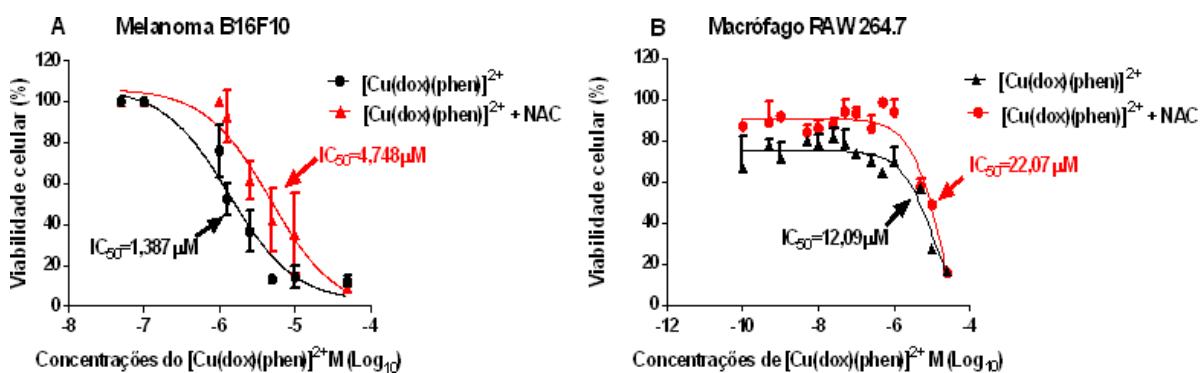


Figura 7 – Curvas sigmoidais dose resposta do tratamento com $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, isolado (pontos pretos) e $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, associado com n-acetilcisteína (pontos vermelhos) em duas linhagens celulares. A– Melanoma S180 e B– Macrófago RAW 264.7. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão para $n =$ triplicatas ($p < 0,05$).

A associação de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ e NAC reduziu sua citotoxicidade, sugerindo uma dependência de formação de EROs para que ocorra danos ao DNA. Silva et al, (2011) descreveram a capacidade do complexo CDP induzir clivagem de DNA plasmidial e propôs que esta seja promovida de forma dependente de EROs, sugerindo que o dano ao DNA induzido pelo complexo metálico ocorra por mecanismo oxidativo.

De acordo com Molphy et al (2014), Os complexos cúpricos associados à fenantrolina induzem danos oxidativos por intercalação com a molécula de DNA, gerando principalmente radicais livres de hidroxila, e a extensão desses danos pode ser reduzida por agentes antioxidantes exógenos ou endógenos.

4.3 $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ inibe o crescimento tumoral *in vivo* e aumenta a sobrevivência geral dos camundongos

Estudos *in vivo* mostraram inibição significativa do crescimento do tumor ($p < 0,0001$) e variação no peso do tumor quando comparado com o controle (Figura 8). Na figura 8A pode-se observar que o peso tumoral dos três tratamentos divergiu significativamente do

grupo controle não tratado. Na figura 8B observamos que os tratamentos inibiram mais de 40% do crescimento tumoral, porém as doses utilizadas nos tratamentos não divergiram significantemente entre si, demonstrando que mesmo na menor dose utilizada já observamos eficácia na redução do tumor.

Além disso, foi obtida uma diferença significativa ($p < 0,0001$) na sobrevida entre os diferentes grupos (Figura 9). O complexo $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ aumentou a taxa de sobrevivência dos animais com tumores ascíticos de Ehrlich (Figura 9A), reduzindo o crescimento do tumor, mesmo na concentração de 1 mg/kg de peso corporal. A curva de peso corporal (Figura 9B) mostra uma redução no peso dos camundongos tratados com CDP a 8 mg/Kg, indicando que o crescimento do tumor ascítico foi inibido pelo complexo.

Como existem poucos relatos na literatura sobre a atividade antitumoral *in vivo* dos complexos de cobre(II) e como os ensaios *in vitro* demonstraram que CDP apresenta alto potencial quimioterápico em algumas linhagens de células tumorais, também foi investigada a sua eficácia *in vivo* contra sarcoma S180 implantado e tumor de Ehrlich. Os resultados obtidos mostraram que CDP causa uma redução considerável ($p < 0,001$), de maneira dose-dependente, do volume do tumor sólido em camundongos BALB-C e melhorou as taxas de sobrevida de camundongos portadores de tumor ascítico Ehrlich mesmo na dose de 1 mg/kg de peso corporal.

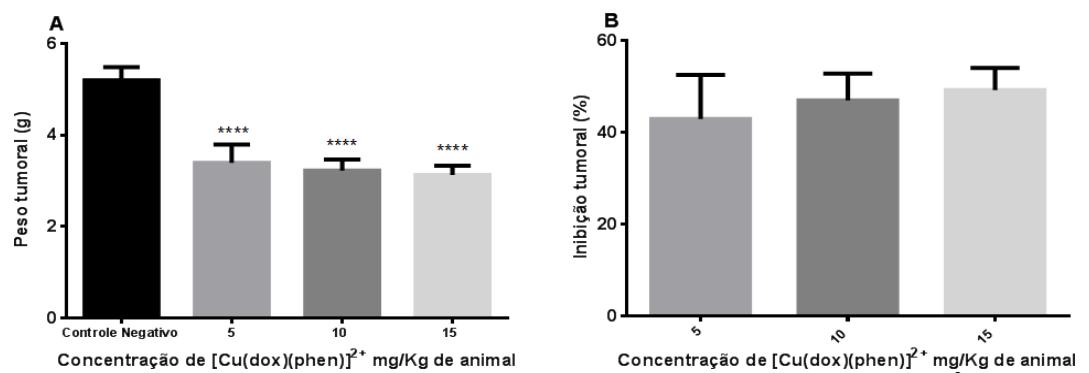


Figura 8 – Atividade de inibição de crescimento do tumor *in vivo* do tratamento $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ com tumor sólido sarcoma S180. A) Diferenças significativas foram determinadas pelo teste ANOVA unidirecional e pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. $****p < 0,0001$. B) Não foi observada diferença significativa entre as doses utilizadas no tratamento.

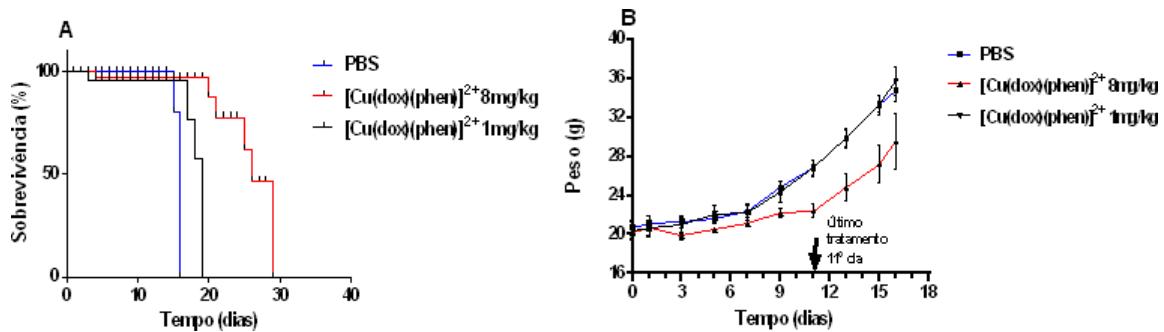


Figura 9 – Sobrevida de camundongos portadores de tumor de Ehrlich e curva de peso corporal após tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (A) curva de sobrevida e (B) alterações de peso corporal em BALB/C portadores de tumor durante o tratamento com $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ a 8 e 1 mg/kg. Estatisticamente significante ($p < 0,0001$) na sobrevida entre os diferentes grupos.

Palanimuthu et al., (2013) testaram dois novos complexos baseados em Cu-bis(tiosemicarbazona), obtendo redução de maneira significativa do crescimento tumoral de uma linhagem de câncer colorretal (HCT-116) inoculado em camundongos, demonstrando que complexos cúpricos possuem grande potencial quimioterápico.

Gou et al., (2016), ao tratar camundongos inoculados com uma linhagem de câncer de mama (MCF-7) com o complexo cúprico $[\text{Cu}(\text{L})(\text{Ind})\text{NO}_3]$, obtiveram inibição do desenvolvimento do tumor, além de redução do peso dos animais.

Surpreendentemente, apesar de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ apresentar moderada capacidade de inibir o crescimento de células de sarcoma S180 *in vitro*, o composto mostrou relevante potencial quimioterápico *in vivo* contra o sarcoma S180 implantado. Alguns complexos de cobre (II), alguns deles contendo ligantes N,N-doadores, foram testados quanto à sua atividade antitumoral *in vivo*, mostrando respostas promissoras (DENOYER et al., 2015; RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ., 2010; SAFI et al., 2014; TARDITO e MARCHIÓ., 2009 e TREJO-SOLIS., 2005).

4.4 $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ induz dano ao DNA

Com o intuito de se analisar o potencial genotóxico do $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, foi avaliado o aumento da incidência de micronúcleos usando o Teste do Micronúcleo (MN) *in vitro* com bloqueio de citocinese, foram escolhidas as concentrações que não promoveram, de maneira elevada, a inibição da viabilidade das linhagens celulares utilizadas. Isso permitiu a contagem de um valor mínimo de 2000 células, estipulado previamente pela OECD (TG 487).

As células B16F10 foram expostas ao CDP associado ou não com NAC por 24 horas (Figura 10A). Foi observado aumento dose dependente na ocorrência de MN nas células

tratadas com o complexo. Na concentração mais alta ($1\mu\text{M}$) o CDP induziu o mesmo número de MN observado no controle positivo (Mitomicina C). Quando usado em associação com NAC, CDP não mostrou aumento significativo na quantidade de MN quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$), indicando que o NAC foi capaz de reduzir a genotoxicidade do CDP.

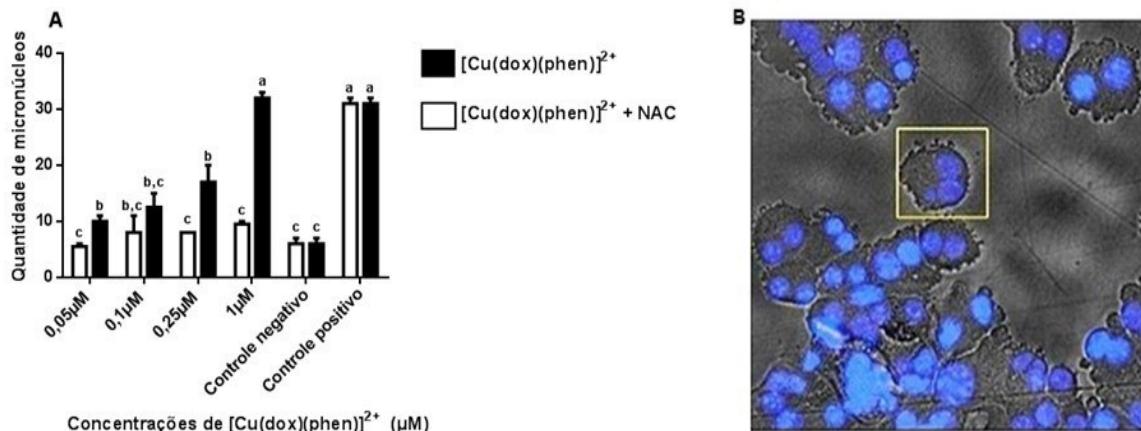


Figura 10 – A) Indução de micronúcleos em células B16F10 após 24 horas de exposição a $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ isolado e em associação com N-acetilcisteína (NAC), bem como os controles negativo (PBS) e positivo (Mitomicina-C 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **B)** fotomicrografia representativa evidenciando em quadro amarelo um micronúcleo em uma célula binucleada corada com o Hoechst 33258, magnitude 400x. Diferenças significativas foram determinadas usando ANOVA unidirecional e o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($p < 0,05$). Colunas com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

Cadavid-Vargas et al., (2018) obteve aumento na frequência de MN ao tratar uma linhagem celular de osteosarcoma (MG-63) com um complexo cúprico denominado Cu(sulfametazina)₂(bipiridina)H₂O, com frequências tão altas quanto as obtidas no seu controle positivo (bleomicina 0,7 μM), atribuindo esta genotoxicidade à capacidade do composto testado de gerar EROs. O dano ao DNA causado por esta classe de composto é resultado de sua combinação com oxigênio molecular, gerando EROs que quebram as cadeias de DNA via clivagem oxidativa. (BORTOLOTTO et al, 2011; GARCIA-GIMENEZ et al, 2009 e SANTINI et al, 2014).

Resultados negativos para indução de mutações em cepas bacterianas tratadas com casiopeínas pelo teste de Ames e SOS foram previamente descritos, porém, ao analisar a genotoxicidade pelo ensaio Cometa, foi descrita atividade de clivagem do DNA pelos complexos cúpricos testados, caracterizado por um grande número de quebras de dupla fita induzidas por intercalação ou ligação direta aos sulcos do DNA (SERMENT-GUERRERO et al 2017).

O complexo de cobre contendo fenantrolina, $[\text{Cu}(\text{N9-ABS})(\text{phen})_2] \cdot 3.6\text{H}_2\text{O}$, tem sido relatado como tendo forte atividade nuclease, onde a clivagem de DNA é atribuída às interações entre as formas iônicas de cobre(II) [superóxido de cobre (CuII-(O₂⁻)) e

hidroperóxido de cobre ($\text{CuII}-\text{OOH}$)] e espécies reativas Cu(I), radical hidroxila, oxigênio singlet, superóxido e peróxido de hidrogênio (GARCIA-GIMENEZ et al., 2009).

A redução na frequência de micronúcleos por NAC tem sido relatada em vários estudos (CORONA-RIVERA et al., 2007; KURASHIGE et al., 2016 e XU et al., 2014). Hamid et al., (2018) relatam significativa redução de citotoxicidade e genotoxicidade em células hematopoiéticas de ratos, demonstrando que NAC tem capacidade de proteger o DNA das células contra as lesões induzidas por EROs, corroborando com os dados apresentados neste estudo.

Foi observado que a administração de NAC resultou em redução significativa da frequência de micronúcleos induzida por $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ provavelmente, devido à capacidade desse agente de eliminar as EROs geradas pelo complexo, o que por sua vez minimiza seu potencial genotóxico.

4.5 $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ é indutor de recombinação somática

Para determinar as concentrações usadas no teste SMART, um ensaio preliminar para avaliação de sobrevivência foi conduzido com $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, no qual a toxicidade foi determinada com base no número de larvas que não atingiram a idade adulta (Tabela 3) e as concentrações de CDP que induziram uma taxa de mortalidade inferior ou igual a 30% foram escolhidos para o estudo, este valor foi escolhido com base na noção de que o número de adultos emergentes deve ser suficientemente elevado para a implementação dos tratamentos (Carmona et al., 2011; Demir et al., 2013). Para o cruzamento ST, foram obtidas taxas de sobrevida de mais de 80% para os controles e nas concentrações de 6,92 e 13,84 mM de $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$; na concentração mais alta de CDP (27,67 mM), os descendentes ST apresentaram uma taxa de sobrevida de 78%. Para os descendentes do cruzamento HB, todos os compostos testados produziram taxas de sobrevivência superiores a 70%. O controle positivo (DXR 0,4 mM) teve uma taxa de sobrevivência de 83% para o cruzamento ST e 80% para o cruzamento HB.

A Tabela 4 mostra os resultados das frequências de manchas dos descendentes MH e BH do cruzamento ST após tratamento com $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ nas concentrações de 6,92; 13,84 e 27,67 mM, controle positivo DXR (0,4 mM) e negativo (água de osmose reversa). Ao compararmos o total de manchas dos descendentes MH, do cruzamento ST, com o total de manchas do controle negativo, foi encontrada diferença significativa na concentração de 6,92 mM, mas nenhuma diferença significativa nas concentrações de 13,84 mM e 27,67 mM. Diante do diagnóstico significativo na concentração de 6,92 mM, procedeu-se a análise dos

descendentes BH oriundos do cruzamento ST, ao se comparar a frequência de manchas nos descendentes BH com a frequência em MH foi observado 84,04% de recombinação, para os indivíduos tratados com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ na concentração de 6,92mM e 93,87% de recombinação para o controle positivo (DXR 0,4mM).

Tabela 3 – Taxas de sobrevivência dos descendentes dos crozamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), após exposição a diferentes concentrações (6,92; 13,84; 27,67; 55,34 e 110,68 mM) de $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$, bem como os controles positivo (Doxorrubicina 0,4mM) e negativo (água osmose reversa), no teste SMART em *Drosophila melanogaster*.

Compostos químicos e concentrações	ST	HB
$[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ 6,92mM	81%	80%
$[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ 13,84mM	81%	77%
$[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ 27,67mM	78%	75%
$[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ 55,34mM	75%	75%
$[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ 110,68mM	62%	73%
Doxorrubicina 0,4mM (C+)	83%	80%
Água Osmose reversa (C-)	97%	92%

Acreditamos que a menor concentração de CDP apresentou maior atividade recombinogênica devido à sua menor toxicidade. Nas maiores concentrações (13,84 mM e 27,67 mM), acreditamos que os efeitos recombinogênicos foram suficientemente altos para induzir apoptose, impedindo assim a detecção dessas células mutantes nas asas de *D. melanogaster*.

A Tabela 5 mostra os resultados do tratamento nos descendentes MH e BH do cruzamento HB com CDP e as mesmas concentrações mostradas anteriormente, bem como seus respectivos controles positivo e negativo, onde apenas a concentração de 27,67 mM foi significativamente diferente do controle negativo, portanto, foram analisados os descendentes BH. Quando comparados os descendentes de MH e BH, as mutações representaram apenas 18,87% das diferenças, sendo os restantes 81,13% causados por recombinação, o que sugere uma atividade recombinogênica para o complexo metálico testado. Esse efeito recombinogênico é provavelmente devido a quebras na molécula de DNA induzidas por $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$.

Ao se comparar os descendentes MH e BH, do cruzamento ST, na concentração de 6,92 mM, as taxas de eventos mutagênicos e recombinogênicos foram de 15,96% e 84,04%

respectivamente. Esses resultados sugerem que $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ é um agente recombinante direto, pois desencadeia um aumento significativo no número de manchas no cruzamento ST. A indução de danos ao DNA e apoptose foi observada em outro complexo de cobre(II) que também contém fenantrolina, $[Cu(Hpr-norf)(Phen)Cl_2]$, que mostrava esta atividade numa linhagem celular humana de leucemia mieloide aguda (KATSAROU et al., 2008).

Vidal et al., (2017) utilizaram o SMART para avaliar os efeitos da casiopeína (III)Ea em células somáticas de *D. melanogaster*. Os autores detectaram atividade genotóxica para a casiopeína (III)Ea que foi dose não dependente, bem como morte celular por apoptose. Outro estudo também relatou atividade genotóxica da casiopeína (III)Ea por meio do teste Cometa, revelando fragmentação do DNA com subsequente morte celular induzida por dano oxidativo (ALEMÓN-MEDINA et al., 2017).

Nos hemócitos de *D. melanogaster*, com base nos resultados dos testes Cometa e SMART, nanopartículas de cobre induzem quebras da dupla cadeia de DNA através de estresse oxidativo (CARMONA et al., 2015). Resultados consistentes com os apresentados neste estudo foram obtidos por Khabour et al., (2013), relatando níveis significativos de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs induzidas por dois complexos de cobre através de um mecanismo de estresse oxidativo. Alguns complexos cobre-fenantrolina também induzem trocas entre cromátides irmãs por meio de um mecanismo oxidativo derivado da intercalação (ALEMÓN-MEDINA et al., 2017).

Os descendentes do cruzamento HB produzem altos níveis de complexo enzimático antioxidante citocromo P450 (CYP450) (LEHMANN, 2003). CYP450 é um complexo de hemeproteínas envolvidas na monooxigenação de uma ampla gama de substratos endobióticos e xenobióticos (HWANG et al., 2001).

Kim et al., (2002) avaliaram a atividade antioxidante de CYP450 em microssomos hepáticos de ratos na presença de cobre(II), constatando que sua atividade diminuía com o aumento das concentrações de Cu(II), e que isso foi mais eficaz do que com outros cátions. Além disso, o cobre interage diretamente com as enzimas P450, induzindo uma alteração conformacional de P450 a P420 e reduzindo o conteúdo de α -hélice. De acordo com outro estudo, os íons de cobre podem interagir com enzimas P450 complexas através de alguma ligação não específica aos grupos de tiol ou aminoácidos, promovendo alterações conformacionais que interferem com sua atividade catalítica (LETELIER., 2009).

Em um estudo com culturas humanas de hepatócitos, foi observado níveis elevados de RNAm das enzimas antioxidantes CYP450 na presença de maiores concentrações de complexos de cobre(II), mas não foram detectados níveis significativos nas concentrações mais baixas (DVORÁK et al., 2010). Campero-Peredo et al., (2016) avaliaram a interação

entre a casiopeina (III)Ea com o complexo enzimático citocromo P450, detectou atividade prolongada e reduzida para o complexo enzimático, indicando um efeito inibitório irreversível com um padrão competitivo.

Como os complexos de cobre apresentam comportamento inibitório do CYP450, acreditamos que as menores concentrações de $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ (6,92 e 13,84 mM), do cruzamento HB, não apresentaram atividade devido à sua ligação irreversível com o sítio ativo de CYP450, impedindo sua interação com o DNA. Entretanto, na concentração de 27,67 mM, os níveis de expressão do CYP450 foram insuficientes para interagir com toda a quantidade de $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ presente na solução, permitindo que as demais moléculas interagissem com o DNA, induzindo assim o efeito recombinogênico.

Os agentes intercaladores e os agentes indutores de quebra de cadeia dupla de DNA são causas importantes de recombinação (LEHMANN., 2003). A recombinação é um tipo importante de dano ao DNA que pode induzir a perda de heterozigose, levando a efeitos citotóxicos subsequentes. Como tal, o SMART é uma ferramenta útil para avaliar os efeitos mutagênicos que detecta com precisão eventos mutagênicos e recombinogênicos. (LOPES et al, 2015).

Tabela 4 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, derivados do cruzamento padrão (ST) e tratados com $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ (6,92, 13,84 ou 27,67 mM), controle positivo (0,4 mM DXR) e controle negativo (água de osmose reversa).

Genótipos e tratamentos (mM)	Número indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (No. de manchas) diagnostico estatístico ^a						Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (i)	Frequência de indução de manchas (por 10^5 céls por divisão celular ^d)		Recombinação ^e (%)
		Simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>m = 2</i>	Simples grandes (>2 céls) ^b <i>m = 5</i>	Gêmeas <i>m = 5</i>	Total de manchas <i>m = 2</i>	Total manchas mwh ^c (n)	Sem correção por tamanho		Com correção por tamanho		
		<i>mwh/flr³</i>									
<i>mwh/flr³</i>											
Contr. Neg.	60	1,02 (61)	0,15 (9)	0,00 (0)	1,17 (70)	70	1,74	2,39	2,00		
DXR 0,4	60	2,07 (124) +	5,53 (332) +	2,32 (139) +	9,92 (595) +	528	3,98 {4,32}	18,03 {15,64}	71,00 {78,04}	94,87	
CDP 6,92	60	1,65 (99) +	0,55 (33) +	0,03 (2) i	2,23 (134) +	134	2,04 {2,36}	4,58 {2,19}	4,70 {2,80}	84,04	
CDP 13,84	60	0,97 (58) -	0,20 (12) i	0,03 (2) i	1,20 (72) -	72	1,79 {3,50}	2,46 {0,07}	2,13 {0,19}		
CDP 27,67	60	1,18 (71) +	0,20 (12) i	0,02 (1) i	1,40 (84) -	84	1,81 {2,14}	2,87 {0,48}	2,51 {0,53}		
<i>mwh/TM3</i>											
Contr. Neg.	40	0,88 (35)	0,10 (4)	f	0,98 (39)	39	1,69	2,00	1,61		
DXR 0,4	40	1,70 (68) +	0,43 (17) +		2,13 (85) +	85	1,74 {1,78}	4,35 {2,36}	3,64 {2,03}		
CDP 6,92	40	0,50 (20) -	0,05 (2) i		0,55 (22) -	22	1,41 {2,06}	1,13 -{0,87}	0,75 -{0,91}		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr³*) e heterozigotas平衡adas (*mwh/TM3*) foram avaliadas

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*= fator para resultados significantemente negativos. Nível de significância $p \leq 0.05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando clones *mwh* de manchas simples e gêmeas.

^dFrequência de formação de clones: clones/moscas/48,800 células (sem correção de tamanho) Frei et al. (1992).

^eCalculado como $\{[DXR \text{ isolada} - (DXR + [Cu(dox)(phen)]^{2+})] / DXR\} \times 100$, de acordo com Abraham (1994)

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3* uma vez que o cromossomo平衡ador não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 5 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, derivados do cruzamento de alta bioativação (HB) e tratados com $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ (6,92, 13,84 ou 27,67 mM), controle positivo (0,4 mM DXR) e controle negativo (água de osmose reversa).

Genótipos e tratamentos	Número indivíduos	Manchas por indivíduo (No. de manchas) diagnóstico estatístico ^a						Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (i)	Frequência de indução de manchas (por 10^5 céls por divisão celular ^d)		Recombinação ^e (%)
		Simples pequenas (1-2 céls) ^b	Simples grandes (>2 céls) ^b	Gêmeas	Total de manchas	Total manchas mwh ^c	Sem correção por tamanho		Com correção por tamanho		
		(mM)	(N)	m = 2	m = 5	m = 5	m = 2	(n)			
<i>mwh/flr³</i>											
Contr. Neg.	60	1.08(65)	0.13(8)	0.00(0)	1.22(73)	73	1.66		2.49	1.97	
DXR 0.4 mM	60	1.32(79)	-	9.15(549)	+	0.72(43)	+	11.18(671)	+	661	5.14 {5.57}
CDP 6.92 mM	60	1.20(72)	-	0.30(18)	+	0.05(3)	i	1.55(93)	-	90	1.89 {2.88}
CDP 13.84 mM	60	1.17(70)	-	0.12(07)	i	0.07(4)	i	1.35(81)	-	78	1.67 {1.80}
CDP 27.67 mM	60	1.65(99)	+	0.22(13)	i	0.03(2)	i	1.90(114)	+	108	1.79 {2.06}
<i>mwh/TM3</i>											
Contr. Neg.	40	0.55(22)	0.05(02)	f		0.60(24)		24	1.75	1.23	1.03
DXR 0.4 mM	40	0.65(26)	-	0.25(10)	+			0.90(36)	+	36	2.47 {3.92}
CDP 27.67 mM	40	0.43(17)	-	0.03(1)	i			0.45(18)	-	18	1.39 {2.83}

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr³*) e heterozigotas平衡adas (*mwh/TM3*) foram avaliadas

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m= fator para resultados significantemente negativos. Nível de significância $p \leq 0.05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando clones *mwh* de manchas simples e gêmeas.

^dFrequência de formação de clones: clones/moscas/48,800 células (sem correção de tamanho) Frei et al. (1992).

^eCalculado como $\{[\text{DXR isolada} - (\text{DXR} + [\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+})]/\text{DXR}\} \times 100$, de acordo com Abraham (1994)

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3* uma vez que o cromossomo平衡ador não contém o gene mutante *flr³*.

5 Conclusão

Nas condições e concentrações experimentais utilizadas neste estudo foi demonstrado que $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ possui boa permeabilidade pela membrana plasmática e boa solubilidade em meio aquoso, mostrando maior capacidade de interação com o DNA, além disso, foi verificado que $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ é citotóxico contra duas linhagens celulares de câncer murino (TG180 e B16F10), com seletividade significativa para melanoma B16F10 e menos citotóxico contra uma linhagem celular derivada de macrófagos não-tumorigênicos RAW 264.7, sugerindo menor toxicidade contra as células saudáveis do paciente. A administração de N-acetil-L-cisteína resultou na inibição significativa dos efeitos citotóxicos do composto, o que é um indicativo de um mecanismo mediado por espécies reativas de oxigênio. O complexo de cobre também induziu a formação de micronúcleos, confirmando a indução de danos ao DNA, possivelmente a partir de mecanismos de danos oxidativos. Os resultados dos testes *in vivo* mostraram que $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ possui alto potencial quimioterápico, pois foi capaz de reduzir significativamente o tamanho dos tumores implantados sarcoma S180 e Ehrlich. O teste SMART mostrou que $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ é um agente recombinogênico direto, independente da bioativação, uma vez que o $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ aumenta significativamente o número de manchas mutantes em ambos os cruzamentos ST e HB, com um aumento de mais de 80% na taxa recombinogênica quando comparados os descendentes de MH e BH, demonstrando que $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ tem como alvo principal de ação a molécula de DNA. Conclui-se, portanto, que o $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ é um candidato promissor para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas, uma vez que apresentou comportamento seletivo para células tumorais e possui seletividade satisfatória para atravessar a membrana e chegar ao DNA, seu principal alvo de ação.

Referências

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATERS, M.D; AITIO, A., IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutat. Res.** 463, 111-172, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1)

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Biologia Molecular da Célula**. Artamed, ed.6, p. 1092-1098. 2017.

ALEMÓN-MEDINA, R; BREÑA-VALLE, M; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J. L; GRACIA ÁLVAREZ-BARRERA, L; RODRÍGUEZ-MERCADO, J. J; LÓPEZ-CHAPARRO, M; ALTAMIRANO-LOZANO, M. A. Genotoxicity of Casiopeina III-Ea in mouse bone marrow cells. **Drug Chem Toxicol**; v.40, n.3, p.333–338, 2017. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1229787>

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2010. Atlanta: American Cancer Society, 2010.

ARAÚJO, Bethânia Cristhine de.; **Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da doxorrubicia em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

ARSHAD, M., KHAN, Q. M., IQBAL, T., MUKHTAR, K. Assessment of genotoxic effects of Doxycycline in mice by the comet assay -. **Rawal Med J**; v.30, n.2, p.85–87, 2005. Available at: <http://www.scopemed.org/?mno=8868>.

AUERBACH C. Remark on the -Table for determining the statistical significance of mutation frequencies.|| **Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen**, v.10, n.3, 256p, 1970; [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90124-7)

BAARS, A.J. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. **Drug. Metab. Rev.** V. 11 p. 191-221. 1980. <https://doi.org/10.3109/03602538008994025>

BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Immunotherapy**, v.58, p.317-324, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0576-4>

BECCO, L.; RODRÍGUEZ, A.; BRAVO, M. E.; PRIETO, M. J.; RUIZ-AZUARA, L.; GARAT, B.; MORENO, V.; GAMBINO, D. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: interaction with DNA and proteins and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.109, p. 49–56, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010>

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>

BOGO, D. **Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural.** 2009. 67p. Tese (Pós graduação) - Programa de Pós-graduação em saúde e desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

BONASSA, E. M. A.; SANTANA. T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica.** 3ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCICI, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G. MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis Advance Access**, v. 28, p.625-631, 2007. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>

BORTOLOTTO, T., SILVA, P. P., NEVES, A., PEREIRA-MAIA, E. C., TERENZI, H. Photoinduced DNA cleavage promoted by two copper(II) complexes of tetracyclines and 1,10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 10519–10521, 2011. <https://doi.org/10.1021/ic201349s>

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia geral.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 367 p. ISBN 9788527723176 (broch.).

BRAVO-GÓMES, M. E.; de la PAZ, A. L. H.; GRACIA-MORA, I. Antineoplastic evaluation of two mixed chelate copper complexes (Casiopeínas®) in HCT-15 Xenograft Model. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 57, p. 205-211, 2013. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v57i3.208>

BREWER, G. J. Risks of Copper and Iron toxicity during aging in humans. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 319-326, 2010. <https://doi.org/10.1021/tx900338d>

BUSCHFORT, C.; WITTE, I. Induction and mechanism of DNA single- and double-strand breaks by tetracycline/Cu(II) in the absence of light. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 12, p. 2927–2930, 1994. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.12.2927>

CADAVID-VARGAS, J. F; ARNAL, P. M; MOJICA SEPÚLVEDA, R. D; RIZZO, A; SORIA, D. B; e DI VIRGILIO, A. L. Copper complex with sulfamethazine and 2,2'-bipyridine supported on mesoporous silica microspheres improves its antitumor action toward human osteosarcoma cells: cyto- and genotoxic effects. **BioMetals**, v.2, n.1. p.21-32, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0154-y>

CAMPERO-PEREDO, C., BRAVO-GÓMEZ, M. E., HERNÁNDEZ-OJEDA, S. L., OLGUIN-REYES, S. DEL R., ESPINOSA-AGUIRRE, J. J., RUIZ-AZUARA, L. Effect of [Cu(4,7-dimethyl-1,10 phenanthroline) (acetilacetonato)]NO₃, Casiopeína III-Ea, on the activity of cytochrome P450. **Toxicol Vitr**, v.33, n.3, p.16–22, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.008>

CANO, B.L.; MOREIRA, M.R.; GOULART, M.O.; GONÇALVES, N.S.; VENEZIANI, R.C.S.; BASTOS, J.K.; AMBRÓSIO, S.R. Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of kaurenoic acid and its semi-synthetic derivatives methoxy kaurenoic acid and kaurenol in CHO-K1 cells. **Food Chem. Toxicol.**, v.102, p.102-108, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.003>

CARMONA, E. R., INOSTROZA-BLANCHETEAU, C., OBANDO, V., RUBIO, L., MARCOS, R. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen**, n.791, p.1–11, 2015, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.006>

CARMONA, E. R; CREUS, A; MAARCOS, R; Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, n.724, p.35-40, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.008>

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; BARAÚNA, N. J. C.; CURIONI, A. O. Correlação entre a evolução clínica e a freqüência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 48, p.317-322, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302002000400037>

CARVALHO, Maria Cristina de Melo Pessanha. Lesões precursoras do câncer cervicouterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem ginecológica. **Escola Anna Nery**. v. 14, p. 617-624. 2010. <https://doi.org/10.1590/S1414-81452010000300026>

CERCHIARO, G.; COSTA-FERREIRA, A. M. Oxindoles and copper complexes with Oxindole-derivatives as potential pharmacological agents. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 8, pp. 1473-1485, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000800003>

CHEFF, D. M.; e HALL, M. D. A Drug of Such Damned Nature. Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research. **Journal medicinal chemistry**. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01351>

CHEN, C.H.; SIGMAN, D.S. Proc. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper: sequence-specific targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 83, p. 7147–7151, 1986. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.19.7147>

CHEROBIN ACFP, WAINSTEIN AJA, COLOSIMO EA, GOULART EMA, BITTENCOURT FV. Prognostic factors for metastasis in cutaneous melanoma. **An Bras Dermatol**, 93(1):19- 26. 2018. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20184779>

CORONA-RIVERA, A. URBINA-CANO, P., BOBADILLA-MORALES, L., VARGAS-LARES, J. D. E. J., RAMIREZ-HERRERA, M. A., MENDOZA-MAGAUA, M. L., TROYO-SANROMAN, R., DIAZ-ESQUIVEL, P., CORONA-RIVERA, J. R. Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 4, p. 389–396, 2007. <https://doi.org/10.1007/BF03195238>

CROSS, E. D., ANG, M. T. C., RICHARDS, D. D., CLEMENS, A. C., MUTHUKUMAR, H., MCDONALD, R., WOODFOL, L., CKLESS, K., BIERENSTIEL, Synthesis, characterization, cytotoxicity and antimicrobial activity of copper complexes of N-imine pendant derivatives of 2-(methylthio) aniline. **Inorganica Chimica Acta**, v. 481, p. 69–78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.09.027>

D'ANGELO, S. P.; TAP, W.D.; SCHWARTZ, G. K.; CARVAJAL R. D. Sarcoma Immunotherapy: Past Approaches and Future Directions. **Hindawi Publishing Corporation**. v. 2014, 13 p. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/391967>

de BIE, P., MULLER, P., WIJMENGA C., KLOMP L.W. Molecular pathogenesis of Wilson

and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, v.44, p.673-688, 2007.
<https://doi.org/10.1136/jmg.2007.052746>

DEEPA-PARVATHI, V., RAJAGOPAL, K., 2014. Nanotoxicology testing: Potential of Drosophila in toxicity assessment of nanomaterials. **Int. J. Nanosci. Nanotechnol.** 5, 25-35.

DEMIR, E; TURNA, F; KAYA, B; CREUS, A; MARCOS, R. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. **Food and Chemical Toxicology**, n.53, p.221-227, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.053>

DENOYER, D., MASALDAN S, L. A., FONTAINE, S., CATER, M, A.Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”. **Metalloomics**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476., 2015.
<https://doi.org/10.1039/C5MT00149H>

DVOŘÁK, Z., VRZAL, R., ŠTARHA, P., KLANICOVÁ, A., TRÁVNÍČEK, Z. Effects of dinuclear copper(II) complexes with 6-(benzylamino)purine derivatives on AhR and PXR dependent expression of cytochromes P450 CYP1A2 and CYP3A4 genes in primary cultures of human hepatocytes. **Toxicology in Vitro**; v.24, n.2, 425–429, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.10.012>

FANTONI, N. Z., MOLPHY, Z., SLATOR, C., MENOUNOU, G., TONILOLO, G., MITRIKAS, G., MCKEE, V., CHATGILIALOGLU, C., KELLETT, A. Polypyridyl based Copper Phenanthrene Complexes: A New Type of Stabilized Artificial Chemical Nuclease. **Chemis'try - A European Journal**, v. 24, p. 1–18, 2018.
<https://doi.org/10.1002/chem.201804084>

FENECH, M. Cytookinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**, v. 2, p. 1084-1104, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, 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)

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 131-136, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00086-6)

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v.136, n.5, p.359-86, 2015. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

FILOMENI, G. CERCHIARO, G., DA COSTA FERREIRA, A. M., DE MARTINO, A., PEDERSEN, J. Z., ROTILIO, G., CIRIOLO, M. R. Pro-apoptotic activity of novel isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage. **J Biol Chem**, v.282, n.16, 12010–12021, 2007.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M610927200>

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; CESAR, E. T.; BERALDO, H. A. Química Inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química na Escola**, 2005. v.6, p.13-18.

FOROODY, F., DUVENVOORDEN, W. C., SINGH, G. Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells. **Anticancer Drugs**, v.20, n.2, p.115–122, 2009. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32831c14ec>

FREI, H., WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutat Res Mutagen Relat Subj**, v.203, n.4, p,297–308, 1988. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90019-2)

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>

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E; New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila melanogaster* wing spot test. **Mutation Research**, v. 216, p. 179-187, 1989. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(89\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0165-1161(89)90003-4)

GALLAGHER, J.; CHEN, C.H.; PAN, C.Q.; PERRIN, D.M.; CHO, Y.M.; SIGMAN, D.S. Optimizing the Targeted Chemical Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline-Copper by Ligand Modification. **Bioconjugate Chemistry**. v. 7, p. 413–420, 1996.
<https://doi.org/10.1021/bc960028t>

GARCÍA-GIMÉNEZ, L. J., GONZÁLEZ-ALVAREZ, M., LIU-GONZÁLEZ, M., MACÍAS, B., BORRÁS, J., ALZUET, G. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenanthroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocyte. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.103, n.6, p. 923–934, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.04.003>

GOODMAN, V.L., BREWER, G.J., MERAJVER, S.D. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. **Endocrine-Related Cancer**, n.11, p.255-263. 2004.
<https://doi.org/10.1677/erc.0.0110255>

GRAF, U; ABRAHAM, S.K; GUZMÁN-RICON, J.; WÜRGLER F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, n. 222, p. 359-373, 1998.

GRAF, U; WÜRGLER F.E; KATZ, A. J; FREI, H; HALL, C. B; KALE, P.B. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ mutagen**, v.6, p. 153-188, 1984. <https://doi.org/10.1002/em.2860060206>

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2016. 780p.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U. ***Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor**. In : Biomonitoring and Biomarkers a Indicators of Environmental Change, Edit by F. M. Butterworth et al., Phenunum Press, N.Y., pp 169-181. 1995.

HÄLLSTRÖM, I.; BLANCK, A., ATUMA, S. Genetic variation in cytochrome P450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Pharmacology**, v.33, p.13-20, 1984. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90364-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90364-2)

HALLSTRÖM, I.; Genetic regulation of the cytochrome P-450 in *Drosophila melanogaster*. **Progress in Clinical and Biological Research**, n. 209, p. 419- 425, 1986.

HAMID, Z. A; TAN, H. Y; CHOW, P. W; HARTO, K. A. W; CHAN, C. Y; MOHAMED, J. The Role of N-Acetylcysteine Supplementation on the Oxidative Stress Levels, Genotoxicity and Lineage Commitment Potential of *Ex Vivo* Murine Haematopoietic Stem/Progenitor Cells. **Sultan Qaboos Univ Med J**. v.18, n.2, p.130-136. 2018.
<https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.02.002>

HANAHAN, D. E Weinberg, R. A. Chapter 2: Hallmarks of Cancer: An Organizing Principle for Cancer Medicine. **Health Library**. 2015.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. 1614p.

HATHAWAY, B. J.; TOMLINSON, A. A. G. Copper(II) ammonia complexes. Coordination Chemistry Reviews, v. 5, p. 1-43, 1970. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80073-9](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80073-9)

HLAVKA, J. J.; BOOTHE, J. H. (Eds.). **The Tetracyclines**. Springer-Verlag, Berlin, p.233, 1985. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70304-1>

HWANG, D. Y., CHAE, K. R., SHIN, D. H., HWANG, J. H., LIM, C. H., KIM, Y. J., KIM, B. J., GOO, J. S., SHIN, Y. Y., JANG, I. S., CHO, J. S., KIM, Y. K. Xenobiotic response in humanized double transgenic mice expressing tetracycline-controlled transactivator and human CYP1B1. **Arch Biochem Biophys**, v.395, n.1 p.32–40, 2001.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2542>

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Inca, 2012. 129 p.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). **Estimativa 2017: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Inca, 2018. 124p.

KACHADOURIAN, R.; BRECHBUHL, H.M.; RUIZ-AZUARA, L.; GRACIA-MORA, I.; DAY, B.J. Casiopeina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. **Toxicology**. v. 268, p. 176–183, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.010>

KALINOWSKA-LIS, U., SZABŁOWSKA-GADOMSKA, I., LISOWSKA, K., OCHOCKI, J., MAŁECKI, M., FELCZAK, A. Cytotoxic and Antimicrobial Properties of Copper(II) Complexes of Pyridine and Benzimidazole Derivatives. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 643, n. 15, p. 993–998, 2017. <https://doi.org/10.1002/zaac.201700115>

KATSAROU, M. E., EFTHIMIADOU, E. K., PSOMAS, G., KARALIOTA, A., VOURLOUMIS, D. Novel Copper (II) Complex of N -Propyl-norfloxacin and 1,10-Phenanthroline with Enhanced Antileukemic and DNA Nuclease Activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 470–478, 2008. <https://doi.org/10.1021/jm7013259>

KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B.; TREVOR, Anthony J. **Farmacología Básica**

e Clínica. Amg, ed. 12, p. 949-953. 2014.

KENNE, F. R.; SMITH, J. A.; COLLINS, J. G. Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v.253, n.15-16, p.2021-2035, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.004>

KERBEL, R. S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. **Cancer Biology and Therapy**, v. 2, p. 134-139, 2003. <https://doi.org/10.4161/cbt.213>

KHABOUR, O. F., SALEH, N°L., ALZOUBI, K. H., HISAINDEE, S., AL-FYAD, D., AL-KAABI, L., DODEEN, A., ESMADI, F. T. Genotoxicity of structurally related copper and zinc containing Schiff base complexes. **Drug Chem Toxicol**, v.36, n.4, p.435–442, 2013. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.776577>

KIM, J.S., AHN, T., YIM, S. K., YUN, C. H. Differential effect of copper (II) on the cytochrome P450 enzymes and NADPH-cytochrome P450 reductase: inhibition of cytochrome P450-catalyzed reactions by copper (II) ion. **Biochemistry**, v.41, n.30, 9438–9447, 2002. <https://doi.org/10.1021/bi025908b>

KURASHIGE, T.; SHIMAMURA, M.; NAGAYAMA, Y. Differences in quantification of DNA double-strand breaks assessed by 53BP1/γH2AX focus formation assays and the comet assay in mammalian cells treated with irradiation and N-acetyl-L-cysteine. **Journal of Radiation Research**, v. 57, n. 3, p. 312–317, 2016. <https://doi.org/10.1093/jrr/rw001>

LACERDA, M. A. Quimioterapia e Anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 51, no.3, p.250-270, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942001000300009>

LARSEN, A.K., ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, n.2, p.167-181, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00058-5)

LEGNAME, G. et al. Prion and doppel proteins bind to granule cells of the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 16285-16290, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.242611999>

LEHMANN, M., FRANCO, A., DE SOUZA PRUDENTE VILAR, K., LUÍZA REGULY, M., DE ANDRADE, H. H. R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen**, v.539, n.1–2, p.167–175, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00162-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00162-1)

LETELIER, M. E., FAÚNDEZ, M., JARA-SANDOVAL, J., MOLINA-BERRÍOS, A., CORTÉS-TRONCOSO, J., ARACENA-PARKS, P., MARÍN-CATALÁN, R. Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions. **J Appl Toxicol**, v.29, n.8, p.695–702, 2009. <https://doi.org/10.1002/jat.1460>

LIEBER, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Non-homologous DNA End-Joining Pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v.79, n.1, p.181–211, 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>

MARZANO, C., PELLEI, M., TISATO, F., SANTINI, C. Copper Complexes as Anticancer Agents. **Anticancer Agents Med Chem**, v.9, n.2, p.185–211, 2009.

<https://doi.org/10.2174/187152009787313837>

MOLPHY, Z., SLATOR, C., CHATGILIALOGLU, C., KELLETT, A. DNA oxidation profiles of copper phenanthrene chemical nucleases. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p.1–9, 2015. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00028>

MONTAGNER, D., GANDIN, V., MARZANO, C., ERXLEBEN, A. DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 145, p. 101–107, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.013>

MORA, M. I., RUIZ-AZUARA, L. INDUCTION of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). **Cancer Chemother Pharmacol**; v.60, n. 2, p.219– 228, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0364-9>

MROUEH, M., DAHER, C., HARIRI, E., DEMIRDJIAN, S., ISBER, S., CHOI, E. S., MIRTAMIZDOUST, B., HAMMUD, H. H. Magnetic property, DFT calculation, and biological activity of bis[(μ 2-chloro)chloro(1,10-phenanthroline)copper(II)] complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, n. II, p. 53–60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.023>

NAKAMOTO, K., TSUBOI, M. e STRAHAN, G.D. **Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra**, 1a ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
<https://doi.org/10.1002/9780470370612>

NUNES, C. J., BORGES, B. E., NAKAO, L. S., PEYROUX, E., HARDRÉ, R., FAURE, B., RÉGLIER, M., GIORGI, M., PRIETO, M. B., OLIVEIRA, C. C., DA COSTA- FERREIRA, A. M. Reactivity of dinuclear copper(II) complexes towards melanoma cells: Correlation with its stability, tyrosinase mimicking and nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 149, p. 49–58, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.05.007>

OCANHA-XAVIER JP, XAVIER-JUNIOR JCC, MARQUES MEA. Melanoma: clinical, evolutive and histopathological characteristics of a series of 136 cases. **An Bras Dermatol**, 93(3):373-6. 2018. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20186690>

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R, J, Agentes antineoplásicos biorreduíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n.6, p.976-984, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600015>

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I.; KILIC, I.; GULDUR, M. Ehrlich ascitic carcinoma, Review. **African J. of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PATEL. K. J., TANNOCK. I. F.; The influence of P-glycoprotein expression and its inhibitors on the distribution of doxorubicin in breast tumors. **BMC Cancer**. v.9, n.356, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-356>

PEREIRA, F. D. C., LIMA, B. A., DE LIMA, A. P., PIRES, W. C., MONTEIRO, T., MAGALHÃES, L. F., COSTA, W., GRAMINHA, A. E., BATISTA, A. A., ELLENA, J., SIVEIRA-LACERDA, E. D. E. P. Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN = benzonitrile; N-N = 2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P = 1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2- bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylph. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 149, p. 91–101, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.011>

PESSOA, C. **Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro**, 2000. 129 f Dissertação de mestrado - curso de pósgraduação em farmacologia, Fortaleza. 2000.

PINTO, A. P.; CRUM, C. P. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. **Clinical Obstetrics And Gynecology**, v. 43, n. 2, p.352-362, jun. 2002. <https://doi.org/10.1097/00003081-200006000-00015>

PLATTS, J. A., OLDFIELD, S. P., REIF, M. M., PALMUCCI, A., GABANO, E., OSELLA, D. The RP-HPLC measurement and QSPR analysis of log Po/wvalues of several Pt(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 7, p. 1199–1207, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.035>

POGOZELSKI, W. K., TULLIUS, T. D. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1089–1108, 1998.

PONCE, E. C. L.; GUZMÁN, V. T.; RUIZ, P. A.; ROMIEU, I.; CARRILLO, L. L. Cáncer de Mama. Un Hilo Conductor Histórico, Presente y Futuro. **Salud Pública Mex, México**, v. 38, n. 2, p. 139-152, 1996.

PRAVIN, N., KUMARAVEL, G., SENTHILKUMAR, R., RAMAN, N. Water-soluble Schiff base Cu(II) and Zn(II) complexes: Synthesis, DNA targeting ability and chemotherapeutic potential of Cu(II) complex for hepatocellular carcinoma – in vitro and in vivo approach. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1–17, 2017. <https://doi.org/10.1002/aoc.3739>

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

RENKAWITZ, J., LADEMANN, C. A., JENTSCH, S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, n.6, p.369–383, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3805>

RESENDE, P. A. **Avaliação citogenética da resposta ao tratamento quimioterápico em mulheres portadoras de câncer de mama**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica) - Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2007.

REY, N. A., NEVES, A., SILVA, P. P., PAULA, F. C., SILVEIRA, J. N., BOTELHO, F. V., VIEIRA, L.Q., PICH, C. T., TERENZI, H., PEREIRA-MAIA, E. C. A Synthetic dinuclear copper(II) hydrolase and its potential as antitumoral: Cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1323– 1330, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.05.008>

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, 2016.

RIVOIRE, W. A.; CORLETA, H. V. E.; BRUM, I. S.; CAPP, E. Molecular biology of cervical cancer. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 6, n. 4, p.447-451, dez. 2006. <https://doi.org/10.1590/S1519-38292006000400012>

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines.

Coordination Chemistry Reviews, p.1633-1648, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.017>

ROSSI, L. M., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., HÖRNER, ROSMARI., SZPOGANICZ, B., TERENZI, H., MANGRICH, A. S., PEREIRA-MAIA, E., CASTELLANO, E. E., HAASE, WOLGANG. Synthesis, structure and properties of unsymmetrical-alkoxo-dicopper(II) complexes: Biological relevance to phosphodiester and DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 6, p. 1807–1822, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2004.10.027>

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>

SAFI, R., NELSON, E. R., CHITNENI, S. K., FRANZ, K. J., GEORGE, D. J., ZALUTSKY, M. R., MCDONNELL, D. P. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics. **Cancer Research**, v. 74, n. 20, 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3527>

SAIKALI, Z., e SINGH, G. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis metastasis. **Anticancer Drugs**; v.14, n10, p.773–778, 2003.

<https://doi.org/10.1097/00001813-200311000-00001>

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. MARQUES, E.K. **Mutagêneses Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.201-223.

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, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400135x>

SANTOS CA, SOUZA DLB. Melanoma mortality in Brazil: trends and projections (1998-2032). **Rev Ciência & Saúde Col**, 24(4):1551-1561, 2019. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018244.13932017>

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology and Therapeutics**.v.1, p. 411-435. 1977. [https://doi.org/10.1016/0362-5478\(77\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0362-5478(77)90004-3)

ŞEKEROĞLU, Z. A., AFAN, F., ŞEKEROĞLU, V. Genotoxic and cytotoxic effects of doxycycline in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Drug Chem Toxicol**, v.35, n.3, p.334–340, 2012. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.621954>

SERMENT-GUERRERO, J., BRAVO-GOMEZ, M. E., LARA-RIVERA, E., RUIZ-AZUARA, L. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. **J Inorg Biochem**, v.166, p.68–75, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.007>

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are result of related genotoxic events. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 38, p. 38-45, 2001. <https://doi.org/10.1002/em.1048>

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer Statistics, 2017. CA: **Cancer J Clin**, 67(1):7-

30. 2017. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>

SILVA, I.C.; POLAQUINI, C.R.; REGASINI, L.O.; FERREIRA, H.; PAVAN, F.R. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food Chem. Toxicol.** v. 105, p. 300-307, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.033>

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, R. G. S. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v. 14, n. 1, p. 200-217, 2017.

SILVA, P. P., GUERRA, W., DOS SANTOS, G. C, FERNANDES, N. G. SILVEIRA, J. DA COSTA FERREIRA, A. M., BORTOLOTTO, T., TERENZI, 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. **J Inorg Biochem**, v.132, n.1, 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., BORTOLOTTO, T., FISCHER, F. L., TERENZI, 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. **Inorg Chem**. v. 50, n. 14, p. 6414–6424, 2011. <https://doi.org/10.1021/ic101791r>

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos de genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2017.

SPEIT, G.; SCHMID, O.; FROHLER-KELLER, M.; LANG, I.; TRIEBIG, G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by de micronucleus test with exfoliated bucal mucosa cell, **Mutat. Res.**, v. 627, p. 129-131, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.013>

STRACHAN, T.; READ, A. P.; **Genética Molecular Humana**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 808p.

SUN, S-Y. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. **Cancer Biology & Therapy**, v. 9, p. 109–110, 2010. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.2.10583>

TANNOCK, I. F. A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumors. **Cancer Res.**, v. 29, n. 8, p. 1527-1534, 1969.

TARDITO, S., MARCHIÒ, L. Copper Compounds in Anticancer Strategies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1325–1348, 2009. <https://doi.org/10.2174/092986709787846532>

TISATO, F., MARZANO, C., PORCHIA, M., PELLEI, M., SANTINI, C. Copper in Diseases and Treatments, and Copper Based Anticancer Strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 708–749, 2010. <https://doi.org/10.1002/med.20174>

TREJO-SOLÍS, C., PALENCIA G, ZÚÑIGA S, RODRÍGUEZ-ROPON A, OSORIO- RICO L, LUVIA ST, GRACIA-MORA I, MARQUEZ-ROSADO L, SÁNCHEZ A, MORENO-GARCÍA ME, CRUZ A, BRAVO-GÓMEZ ME, RUIZ-RAMÍREZ L, RODRÍGUEZ-ENRIQUEZ S, SOTELO J. Cas IIgly 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>

TUREL, I.; KLJUN J. Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, p.2661-2687, 2011. <https://doi.org/10.2174/156802611798040787>

VIDAL, M. L., PIMENTEL, E., CRUCES, M. P., HERNÁNDEZ, S., RUIZ-AZUARA, L. Cytotoxic and genotoxic actions of Casiopeina III-Ea (Cas III-Ea) in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues**, v.80, n.6, 365–373, 2017. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1326072>

VILES, J. H. et al. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 2042-2047, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2042>

VOGEL, E. Genetical relationship between resistance to insecticides and procarcinogens in two *Drosophila* populations. **Arch. Toxicol.** v. 43, p. 201-211. 1980.
<https://doi.org/10.1007/BF00297585>

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.25, p. 2677–2681, 2014. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>

WEHBE, M., LEUNG, A. W. Y., ABRAMS, M. J., ORVIG, C., BALLY, M. B. A Perspective – can copper complexes be developed as a novel class of therapeutics? **Dalton Transaction**, v. 46, p. 0758–10773, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7DT01955F>

World Health Organization (WHO). **Cancer**. 2018. Disponível em:
<<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em dez. 2019.

XIAO Z., BROSE J., SCHIMO S., ACKLAND S. M., LA FONTAINE S., WEDD A.G. Unification of the copper(I) binding affinities of the metallo-chaperones Atx1, Atox1, and related proteins: detection probes and affinity standards. **J Biol Chem**; v.286, n.13, p.11047–11055, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213074>

XU, B., WANG, W., GUO, H., SUN, Z., WEI, Z., ZHANG, X., LIU, Z., TISCHFIELD, J. A., GONG, Y., SHAO, C. Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction. **Mutation research**, v.770, n. 1, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.08.004>

ZALACAIN, M.; SIERRAS-SÚMAGA, L.; PATIÑO, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. **Anales Sis San Navarra**, v.28, 2005. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300007>

ZAMBONI, W. C., TORCHILIN, V., PATRI, A. K., HRKACH, J., STERN, S., LEE, R., NEL, A., PANARO, N. J., GRODZINSKI, P. Best practices in cancer nanotechnology: Perspective from NCI nanotechnology alliance. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 3229–3241, 2012. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2938>

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p. 481-489, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00081-4)

ZHANG, Z., BI, C., SCHMITT, S. M., FAN, Y., DONG, L., ZUO, J., DOU, Q. P. 1,10-

Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 1257–1267, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0940-x>