



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

**Avaliação *in vitro* das atividades citotóxicas e genotóxicas de um
metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12**

Discente: Pedro Henrique Alves Machado

Orientador: Profa. Dra. Sandra Morelli

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

Uberlândia-MG

2019



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

Avaliação *in vitro* das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12

Discente: Pedro Henrique Alves Machado

Orientador: Profa. Dra. Sandra Morelli

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

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

Uberlândia-MG

2019

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

M149 2019	<p>Machado, Pedro Henrique Alves, 1993- Avaliação in vitro das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12 [recurso eletrônico] / Pedro Henrique Alves Machado. – 2019 Orientadora: Sandra Morelli. Coorientador: Robson José de Oliveira Júnior. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2093 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Morelli, Sandra , 1953-, (Orient.). II. de Oliveira Júnior, Robson José , 1984-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

PALAVRAS-CHAVE DO TRABALHO: metalocomplexo a base de cobre(II), micronúcleo, ROS, apoptose, autofagia, Sarcoma 180, C2C12, HeLa, HFF-1, B16-F10, NIH/3T3

IMPORTANTE: A ficha será confeccionada pelo Setor da Biblioteca campus St^a. Mônica, 2º pavimento, fone 32394259 no horário das 08:00 às 12:00 e das 13:30 às 17:30 apresentando: a obra (boneco) antes do encaminhamento a gráfica.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Vinte e cinco de julho de 2019	Hora de início:	09:20h	Hora de encerramento:	10:00h
Matrícula do Discente:	11722GBI007				
Nome do Discente:	Pedro Henrique Alves Machado				
Título do Trabalho:	Avaliação <i>in vitro</i> das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização <i>in vitro</i> de complexos metálicos de cobre e platina como potenciais drogas antineoplásicas.				

Aos 25 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, no Auditório 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, realizou-se a Apresentação Pública da Dissertação de Mestrado do (a) Discente. A Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica foi assim composta: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli (Orientadora), Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior e Prof^a. Dr^a. Joyce Ferreira da Costa Guerra, realizou o processo de avaliação **não presencial** e considerou o (a) candidato (a) APROVADO (A). Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Prof^a. Dr^a. Renata Santos Rodrigues

Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Genética e Bioquímica

Portaria 1489/17



Documento assinado eletronicamente por **Renata Santos Rodrigues, Coordenador(a)**, em 26/07/2019, às 09:36, 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 **1367632** e o código CRC **5D98E79D**.

Referência: Processo nº 23117.056589/2019-15

SEI nº 1367632



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

Avaliação *in vitro* das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12

Discente: Pedro Henrique Alves Machado

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Sandra Morelli

Examinadores: _____

Data da defesa: ____ / ____ / ____

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

Profa. Dra. Sandra Morelli

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho a minha família, amigos,
minha companheira, a todos que me ajudaram de alguma maneira a
chegar até aqui.

Agradecimentos

À minha mãe Andréa, meu falecido pai Éber, meus irmãos Josué, Bethânia, minha sobrinha Valentina, meus sinceros agradecimentos por todo amor, suporte e aprendizado.

Aos meus amigos nos quais me apoiei e que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e nunca desistir.

À minha companheira Vívian que sempre me ajudou, me incentivou a crescer em todos os aspectos e nunca poupou esforços pra me ajudar.

À Universidade Federal de Uberlândia, lugar onde comecei toda minha jornada acadêmica e permitiu que tudo fosse possível.

À todos os integrantes do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

Meus mais sinceros agradecimentos a minha orientadora Professora Sandra Morelli, ao meu co-orientador e amigo Robson José de Oliveira Júnior, por toda a confiança e apoio prestados a mim, sem a ajuda de vocês não seria possível concluir mais essa etapa.

À todo corpo docente da Universidade Federal de Uberlândia, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte.

À todos que contribuíram de alguma maneira para que esse trabalho fosse concretizado, Samuel, Fernanda, Tiago, Alice, Sofia e Ricardo, obrigado pela ajuda

Aos membros da Banca Examinadora que cordialmente aceitaram o convite para avaliar este trabalho.

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram dentro e fora dos laboratório, só assim permitindo que eu chegasse até aqui.

Resumo

O câncer é um grande problema de saúde pública, levando milhões de pessoas a óbito todo ano, necessitando assim de abordagens terapêuticas mais efetivas. A quimioterapia é uma das terapias mais utilizadas para tratamento das neoplasias e, desde o surgimento da *cisplatina*, a busca por novos metalocomplexos tem aumentado. Neste contexto o cobre tem ganhado destaque, uma vez que se trata de um micronutriente essencial para funções vitais, participando de vários processos biológicos. Quando comparado a células saudáveis, células tumorais exibiram altas concentrações de cobre, apontam estudos, tal fato confere possíveis vantagens em se trabalhar com o metal de transição. Além do mais, o cobre possui redox ativo, conferindo-o potencial de produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), principal mecanismo de ação dos metalocomplexos a base de cobre (II). Quando complexado a outros ligantes, o cobre possui a habilidade de clivar o DNA impulsionando assim o desenvolvimento de variados complexos metálicos que com potencial antitumoral. Neste contexto o presente trabalho caracterizou o potencial antitumoral *in vitro* de um novo metalocomplexo de cobre Cobre (II) associado a 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina) Dri-12. Este complexo metálico apresentou a capacidade de induzir a produção de ROS, possivelmente sendo o mecanismo responsável por danos ao DNA, levando a parada das células tumorais na fase G0/G1 do ciclo celular, induzindo assim a morte celular programada. Quando comparado a *cisplatina* e alguns outros metalocomplexos a base de cobre, Dri-12 apresentou melhores índices de seletividade, possuindo predileção por agir em células tumorais em detrimento das saudáveis. Por possuir ação antitumoral *in vivo* o complexo de cobre (II) Dri -12 torna-se um promissor candidato a agente antitumoral.

Palavras-chave: metalocomplexo a base de cobre(II), micronúcleo, ROS, apoptose, autofagia, Sarcoma 180, C2C12, HeLa, HFF-1, B16-F10, NIH/3T3

Abstract

Cancer is a huge public health issue, which leads to millions of deaths every year, thus requiring more effective therapy approaches. Chemotherapy is one of the most common methods for treating neoplasia and, since the discovery of cisplatin; the search for metal complexes has been increasing. In this context, copper has been gaining notoriety, since it is an essential micronutrient for vital functions and participates in several biological processes. According to studies, tumor cells have shown high copper concentrations when compared to healthy cells, which provides possible advantages to working with this transition metal. Furthermore, copper possesses active redox, granting it the potential to produce ROS (Reactive oxygen species), which is the main action mechanism of copper (II) based metal complexes. When complexed too other ligands, copper has shown the ability to cleave DNA, thus boosting the development of various metal complexes that could possess anti-tumor potential. In this context, this work has described the *in vitro* anti-tumor potential of a copper based metal complex Copper (II) linked to 4-Fluorophenoxyacetic acid hydrazide and 1,10-Phenanthroline] Dri-12. This metal complex has displayed the capacity to induce ROS production, being possibly the main mechanism responsible for DNA damage, stopping tumor cells at the G0/G1 stage of the cell cycle, therefore inducing programmed cell death. When compared to cisplatin and other copper-based metal complexes, Dri-12 has displayed better selectivity rates, preferring to act on tumor cells instead of healthy cells. Due to its *in-vivo* anti-tumor action, the copper complex Dri-12 becomes a promising candidate to anti-tumor agent.

Key words: copper (II) complex, micronucleus, ROS, apoptosis, autophagy, Sarcoma 180, C2C12, HeLa, HFF-1, B16-F10, NIH/3T3

Lista de figuras e tabelas

- Figura 1.** Representação da estrutura química para o complexo metálico Dri-12 (Cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina)7
- Figura 2.** A) Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada na linhagem não tumoral de mioblastos murinos C2C12. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). B) A seta indica uma célula de mioblasto murino C2C12 binucleada apresentando micronúcleo (Coloração Hoechst 33258)..... 18
- Figura 3.** Imagem do gel de eletroforese, evidenciando a capacidade de Dri-12 induzir degradação do DNA genômico (concentração de 20 μ M). M= Marcador molecular de 100 pares de base; C= Meio RPMI-1640; CisPt= Cisplatina 40 μ M.....18
- Figura 4.** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas sarcoma 180 tratadas com diferentes concentrações de Dri-12 (20 μ M, 8 μ M, 4 μ M e 1 μ M). Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).....20
- Figura 5. A)** Gráficos de barra representando as marcações referentes a produção de ROS das células sarcoma 180 tratadas com diferentes Dri-12 (20 μ M, 4 μ M e 1 μ M). Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). **B)** *Dot-plots* da concentração de ROS na linhagem TG180 tratadas com concentrações de Dri-12 (1 μ M, 4 μ M e 20 μ M).....22

Figura 6. Gráfico de barras representando a quantidade de TBARS (nmol/mg de proteínas) para linhagem tumorigênica de sarcoma 180 tratadas com diferentes concentrações de Dri-12. Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0.01$ (cada grupo comparado com o controle negativo por *T-test*).....23

Figura 7. A) Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de Dri-12 (1 μ M, 4 μ M e 10 μ M). Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). **B)** *Time lapse* do processo apoptótico da linhagem HeLa tratada com 100 μ M do metalocomplexo Dri-12.....24-25

Figura 8. A) Imagem evidenciando a presença dos vacúolos autofágicos marcados com MDC nas células tumorigênicas de sarcoma 180 tratadas com 4 μ M Dri-12. **B)** Gráfico representativo da intensidade fluorescência da marcação dos vacúolos autofágicos com MDC. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).....26

Tabela 1. Critérios de classificação de morte celular por fluorescência (Hoechst 33342 e Iodeto de propídeo)..... 14

Tabela 2. Tabela com as linhagens celulares e seus respectivos dados de IC₅₀ (μ M) e IS para os diferentes compostos – Dri-12; Dri-20; Dri-131; Dri-164; Dri-212 e Dri-228..... 16

Tabela 3. Tabela com as linhagens celulares e seus respectivos dados (IC₅₀ e IS) para Dri-12..... 17

Tabela 4. Valores em porcentagem das fases do ciclo celular de células sarcoma 180 tratadas com diferentes concentrações (1 µM, 4 µM, 8 µM e 20 µM) do metalocômplexo Dri-12. Para a tabela, os dados representam a média ± o erro padrão. * p < 0,05. ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001 (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).....	19
Tabela 5. Tabela comparativa da citotoxicidade <i>in vitro</i> entre complexos do subgrupo III das Casiopeínas® (Cas-III-E-a e Cas-III-H-a) e Dri-12 na linhagem HeLa (Fonte: adaptado de ALÉMON-MEDINA <i>et al.</i> 2007).....	28
Tabela 6. Tabela comparativa entre as doses capazes de reduzir 50% da viabilidade celular (IC ₅₀) <i>in vitro</i> em diversas linhagens tumorais da cisplatina e do metalocômplexo de cobre (II) Dri-12.....	29
Tabela 7. Tabela demonstrativa de diversos complexos metálicos a base de cobre que demonstram capacidade de agir sobre o DNA.....	31

Lista de abreviaturas

B16-F10: melanoma murino

C2C12:mioblasto murino

Cyt-B: citocalasina-B

DCF: 2',7' diclorofluoresceína

DCFH-DA: 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína

DNA: ácido desoxirribonucleico

Dri-12: Cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HeLa: adenocarcinoma humano de colo de útero

HFF-1: Fibroblasto humano

IC₅₀: Concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IS: índice de seletividade

MDC: monodansilcadaverina

NIH/3T3: fibroblastos murino

PI: iodeto de propídio

ROS: espécies reativas de oxigênio

TG180: sarcoma murino

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia do câncer	1
1.2 Definições e características do câncer	1
1.3 Terapêutica do Câncer.....	3
1.3.1 Metalocomplexos de platina como agentes quimioterápicos.....	4
1.3.2 Metalocomplexos de cobre II: promissores quimioterápicos.....	5
1.3.3 Metalocomplexo de cobre (II) Dri-12.....	6
2 Objetivos	7
2.1 Objetivo Geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3 Material e métodos	8
3.1 Manutenção das linhagens celulares.....	8
3.2 Ensaio de citotoxicidade Alamar Blue.....	9
3.2.1 Índice de seletividade (IS).....	10
3.3 Teste do micronúcleo: avaliação da genotoxicidade.....	10
3.4 Ensaio de degradação de DNA, por eletroforese.....	11
3.5 Análise da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo.....	12
3.6 Análise de estresse oxidativo.....	12
3.6.1 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	12
3.6.2 Análise do estresse oxidativo sobre lipídeos.....	13
3.7 Ensaio de apoptose.....	14
3.8 Ensaio de autofagia.....	14
3.9 Análises estatísticas.....	15
4. Resultados	15

4.1 <i>screening</i> de metalocomplexos de cobre (II)	15
4.1.2 Citotoxicidade de Dri-12 por Alamar Blue: IC ₅₀ e índice de seletividade.....	16
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade genotóxica de Dri-12.....	17
4.3 Avaliação da degradação de DNA frente ao tratamento com Dri-12.....	17
4.4 Ensaio do ciclo celular: atividade antiproliferativa de Dri-12.....	19
4.5 Avaliação do estresse oxidativo frente ao tratamento com Dri-12.....	21
4.5.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio.....	21
4.5.2 Quantificação de peroxidação lipídica.....	23
4.6 Investigação do tipo de morte celular.....	24
4.7 Ensaio de autofagia por Monodansilcadaverina (MDC).....	25
5. Discussão.....	27
6. Conclusão.....	35
7. Referências.....	36

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do câncer

A incidência de câncer tem aumentado globalmente, gerando a morte de milhões de pessoas, fato que o torna um problema de saúde pública mundial. De acordo com Bray et al. (2018), as estimativas mundiais para o câncer previram a ocorrência de 18.1 milhões de novos casos de câncer, causando 9.6 milhões de mortes. Em termos nacionais o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) previu para 2018 cerca de 634.880 novos casos de neoplasia no país (INCA, 2017).

Os tipos de câncer mais comuns em homens brasileiros são o de próstata (68.220 casos); traqueia, brônquio e pulmão (18.740 casos); cólon e reto (17.380); estômago (13.540 casos) e cavidade oral (11.200). Já em mulheres brasileiras os tipos mais comuns de câncer são o de mama feminina (59.700 casos); cólon e reto (18.980 casos); colo do útero (16.370 casos); traqueia, brônquio e pulmão (12.530 casos) e glândula tireoide (8.040 casos) (INCA, 2017).

Visto que o câncer é uma doença de alta incidência e leva milhões de pessoas a óbito em todo o mundo, ele é considerado um problema de saúde pública (THULLER, 2012). Levando em consideração os dados alarmantes sobre incidência e mortalidade, faz-se necessário melhorar a eficácia de políticas pública de saúde para a prevenção e desenvolver novos métodos mais eficazes para o tratamento da doença, aumentando assim o sucesso de cura ou proporcionar conforto pra pessoas em estágio terminal.

1.2 Definições e características do câncer

Doenças que apresentam um crescimento celular de maneira desordenada e que detém a capacidade de invadir tecidos e órgãos, sejam estes adjacentes ou não, são denominadas como câncer (INCA, 2017). Uma das características mais marcantes desta enfermidade é a capacidade de dividir-se de maneira indefinida, ou seja, as células tumorais podem se dividir de modo infinito, nunca atingindo seu limite divisional (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Observando os tipos de cânceres mais incidentes é possível notar que os mais prevalentes se derivam de tipos celulares que possuem divisão mais ativa, como por exemplo, células epiteliais. Em contrapartida, tipos celulares que não se dividem possuem uma menor chance de originar células tumorais, como prova disso cânceres de células diferenciadas nervosas ou musculares são menos incidentes (SNUSTAD e SIMMONS, 2010).

No que se diz respeito ao seu genoma, o processo de carcinogênese é bastante caótico, onde há muita instabilidade genômica. Em muitos casos ocorre a inativação de genes de reparo de DNA, corroborando para que haja um aumento dos níveis de mutações do material genético, podendo assim afetar genes chaves que controlam vários processos. Por exemplo, a divisão celular é controlada por diversos genes e estes, quando danificados e não reparados, podem resultar em disfunções divisionais, levando as células a se dividirem de maneira descontrolada (INCA, 2017; OJOPI & NETO, 2004).

É conhecido que todo o processo carcinogênico está intimamente relacionado a uma mudança no perfil de expressão gênica das células. Recentemente foi demonstrado que, além das mutações, as alterações epigenéticas anormais influenciam no controle da expressão gênica. As modificações do epigenoma das células tumorais parecem ocorrer de forma anterior aos eventos mutacionais, fazendo com que o silenciamento de genes supressores tumorais e a ativação de oncogenes acarretem em um ambiente propício para a ocorrência de mutações genéticas – importantes no processo de carcinogênese (AHMED *et al.*, 2016; BABA *et al.*, 2016; FEINBERG *et al.*, 2006).

O câncer é resultante de uma grande diversidade de fatores, podendo ser intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores externos estão ligados ao ambiente onde se vive, estilo de vida e hábitos da pessoa. Esses dois fatores (externos e internos) podem interagir entre si e potencializar a chance do desenvolvimento da doença, sendo os fatores ambientais grandes protagonistas. Acredita-se que 80 a 90% dos casos de neoplasias são correlatos a causas extrínsecas que podem alterar o DNA das células (INCA, 2017).

A proliferação de células de forma desenfreada é denominada neoplasia. Este quadro de desordem faz as células perderem suas características genéticas

originais e, devido à sua alta taxa de proliferação, pode dar origem a um amontoado de células de massa irregular, denominada tumor (BOYLE & LEVIN, 2008).

Os tumores comumente são divididos em dois grupos: benignos e malignos. Os tumores benignos são menos agressivos, suas células mantêm-se agrupadas em uma massa celular bem definida, suas características morfológicas se assemelham às células que o originaram e é facilmente tratado (THULLER, 2012; GADELHA *et al.*, 2014). Em contrapartida os tumores malignos (chamados de câncer) detêm grande potencial mitótico e grande agressividade. Tais células conseguem desvencilhar-se da massa tumoral inicial, podendo emitir metástases por vasos sanguíneos ou linfáticos, o que dificulta as estratégias de tratamento (ALMEIDA *et al.*, 2005; GADELHA *et al.*, 2014).

Os tumores malignos conseguem manipular o microambiente ao seu redor, obtendo vantagens para o seu desenvolvimento. Um exemplo é o fato de eles serem capazes de induzir a formação de novos vasos sanguíneos. Este processo, denominado angiogênese, também favorece o processo metastático tumoral (ROCHA, 2013). Para a formação de novos vasos, células endoteliais precisam migrar, proliferar e se diferenciar. Tal encadeamento é coordenado por sinais químicos pró-angiogênicos emitidos pelas células tumorais (SAGHIRI *et al.*, 2015; NISHIDA *et al.*, 2006).

1.3 Terapêutica do câncer

As três abordagens mais comuns para o tratamento do câncer são a cirúrgica, radioterápica e quimioterápica (GADELHA *et al.*, 2014) e para se maximizar o sucesso do tratamento, a escolha da melhor abordagem é essencial. O tipo de neoplasia dita a melhor abordagem, uma vez que é necessário se utilizar da vulnerabilidade do tumor frente aos tratamentos. Atualmente, a combinação de diversas abordagens terapêuticas é amplamente empregada (THULLER, 2012).

1.3.1 Metalocomplexos de platina como agentes quimioterápicos

A quimioterapia se vale da utilização de diversos tipos de drogas estruturalmente diferentes para tratamento de inúmeros tipos de doenças, sendo que a classe dos quimioterápicos conta com mais de 100 medicamentos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Dentre eles, estão os quimioterápicos a base de platina, que se encaixam na classe dos complexos metálicos (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

Os complexos metálicos são utilizados há várias décadas como agentes quimioterápicos e, graças ao sucesso da aplicação da *cis*-diaminodichloroplatina (II) (cisplatina) na terapêutica do câncer, as pesquisas nessa área têm crescido, buscando-se novos metalocomplexos com ação antineoplásica (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

Com intuito de contornar limitações apresentadas pela cisplatina – nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e supressão mieloide –, novos compostos a base de platina foram sintetizados: lobaplatina, nedaplatina, heptaplatina, oxaliplatina e carboplatina. Mesmo que estes novos metalocomplexos demonstrem resultados mais promissores quando comparados à cisplatina, efeitos colaterais graves ainda estão presentes, como mielosupressão (carboplatina e nadaplatina), trombocitopenia (lobaplatina), neurotoxicidade (oxaliplatina), nefrotoxicidade e sangramento intra-abdominal (heptaplatina) (WHEATE *et al.*, 2010).

Apenas dois destes novos compostos conquistaram aprovação para sua utilização a nível mundial (oxaliplatina e carboplatina), enquanto isso, os outros três compostos conseguiram liberação em alguns países da Ásia – lobaplatina na China, nedaplatina no Japão e heptaplatina na Coreia do Sul (WHEATE *et al.*, 2010).

Apesar da efetividade dos complexos à base de platina no tratamento de vários tipos de tumores, um dos obstáculos quanto à sua utilização são os fortes efeitos colaterais e a resistência das células tumorais aos medicamentos. A necessidade de contornar tais problemas, portanto, impulsiona o desenvolvimento de drogas com maior biocompatibilidade (CROSS *et al.*, 2018). Outros metais de

transição além da platina têm sido investigados quanto ao seu potencial antitumoral (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

1.3.2 Metacomplexos de Cobre II: promissores quimioterápicos

Devido às limitações dos metalocomplexos já existentes e utilizados nos tratamentos quimioterápicos, fez-se necessário buscar alternativas para aprimorar tais medicamentos com propriedades antitumorais. Neste cenário os metalocomplexos que apresentam cobre (II) em sua composição vêm ganhando destaque (CROSS et al., 2018).

Quando comparado aos complexos à base de platina, os que possuem cobre em sua composição podem acarretar menor resistência das células tumorais frente ao tratamento, efeitos colaterais relativamente mais brandos no organismo e possuir maior amplitude quanto à sua atividade antitumoral (RUIZ-AZUARA e BRAVO-GÓMEZ, 2010).

Uma das propriedades do cobre quando em condições biológicas é participar de reações de oxirredução, podendo interagir e reagir diretamente com moléculas de oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido e superóxido de oxigênio (SAGHIRI *et al.*, 2015; TISATO *et al.*, 2009). Isso se deve ao fato do cobre ser considerado um metal de transição com redox ativo, que possui a capacidade de passar do estado cuproso (Cu^{1+} , onde se encontra reduzido) para o estado cúprico (Cu^{2+} , no qual está oxidado) (DING *et al.*, 2011; TISATO *et al.*, 2009).

O cobre é naturalmente encontrado no organismo humano, sendo indispensável a presença desse micronutriente para seu perfeito funcionamento. O cobre desempenha papel de grupo prostético em enzimas e proteínas, participa da respiração mitocondrial além de ser cofator da angiogênese – processo de suma importância para a progressão e metástase tumoral (SAGHIRI *et al.*, 2015; TISATO *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2010).

Alguns tipos de cânceres humanos, como linfoma de Hodkin's, pulmão, cérebro, colo do útero, leucemia, cérebro, sarcoma, mama, fígado e próstata,

exibiram concentrações elevadas de cobre em comparação às células saudáveis (SAGHIRI *et al.*, 2015; FREZZA *et al.*, 2010). Uma explicação para este aumento nas concentrações intracelulares do cobre nos tumores pode estar relacionada com sua função de cofator para a angiogênese (XIAO *et al.*, 2010).

Além das atividades desempenhadas no metabolismo celular normal, quando em desbalanço, o cobre possui a capacidade de interagir com o DNA de maneira não covalente, de maneira intercalante, por intermédio de ligação eletrostática e pode interagir com os sulcos desta molécula (SANTINI *et al.*, 2014).

Essa interação pode levar à clivagem desta importante molécula, bloqueio da replicação e conseqüente interrupção do ciclo celular, levando a célula à apoptose. Por apresentar menor toxicidade em relação a outros metais (já que é um elemento presente no organismo), por sua interatividade com DNA e potencial pra clivar esta molécula, e por sua maior demanda em células tumorais, muitos metalofármacos que possuem cobre em sua composição têm sido avaliados como potenciais antineoplásicos (PRAVIN *et al.*, 2017).

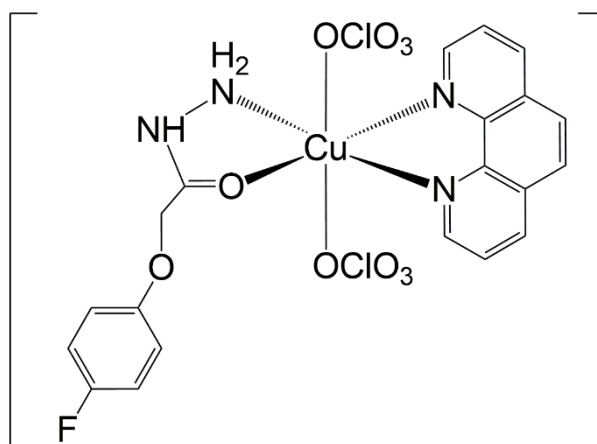
Outro aspecto que corrobora para a importância do estudo de novos metalocomplexos de cobre (II) é que dois complexos de uma família de drogas que possui como base o cobre (II), as Casiopeínas®, já estão na primeira fase de estudos clínicos por terem sido mais eficazes que os metalocomplexos já utilizados na quimioterapia (PAIXÃO, *et al.*, 2017).

1.3.3 Metalocomplexo de cobre (II) Dri-12

O complexo metálico foi sintetizado por nosso grupo de pesquisa a partir de uma reação de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.09 g, 0.25 mmol) juntamente com 0.25 mmol de hidrazida diluídas em metanol. Tal mistura foi agitada por 2 horas com posterior adição de um ligante heterocíclico (0.25 mmol) doador de N,N que previamente foi dissolvido em metanol. Passadas 48 horas, o composto foi levado a filtração, lavado utilizando metanol e secado via redução de pressão (PAIXÃO, *et al.*, 2017).

Todo processo culminou na obtenção do complexo Dri-12, que trata-se de (Cobre(II) associado a 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina), como mostra a Figura 1.

Figura 1. Representação da estrutura química para o complexo metálico Dri-12 (Cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina).



2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os mecanismos citotóxicos e genotóxicos *in vitro* do metalocomplexo de Cobre (II) Dri-12.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do Dri-12 utilizando as linhagens tumorigênicas murinas sarcoma (TG180) e melanoma murinho (B16-F10); linhagens não tumorigênicas de mioblastos murino(C2C12) e fibroblastos murino (NIH/3T3). Também na linhagem de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) e na linhagem não tumoral humana de fibroblastos (HFF-1), por intermédio dos ensaios de citotoxicidade Alamar Blue;
- Definir a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) *in vitro* do Dri-12 em diferentes linhagens celulares;
- Investigar a atividade genotóxica do Dri-12, por intermédio do teste de micronúcleo;

- Investigar a interação do metalocomplexo Dri-12 com o DNA, por meio de eletroforese em gel de agarose, utilizando DNA genômico de células tratadas com o composto metálico;
- Investigar a atividade antiproliferativa do metalocomplexo Dri-12, por intermédio da citometria de fluxo;
- Investigar a capacidade de indução de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) perante ao tratamento da linhagem com o metalocomplexo Dri-12, por intermédio da citometria de fluxo;
- Avaliar a indução de peroxidação lipídica por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Investigar qual o tipo de morte celular o tratamento com Dri-12 acarreta) por meio da marcação com iodeto de propídio e Hoechst
- Investigar se o tratamento com Dri-12 tem a capacidade ativar a via autofágica, utilizando a marcação da monodansilcadaverina (MDC), por microscopia de fluorescência;

3. Material e métodos

3.1 Manutenção das linhagens celulares

As diversas linhagens celulares – TG180, C2C12, B16-F10, NIH/3T3, HeLa e HFF-1 –, foram cultivadas *in vitro*, utilizando garrafas de cultura com volume de 25 cm² contendo em seu interior meio RPMI-1640 (Gibco®, Paisley, UK) suplementado com 2mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, (Sigma Chemical Co.®, St. Louis, USA), 10% de volume de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab®, Campinas, Brazil). Todas as garrafas foram mantidas em incubadora de CO₂ (5%) na temperatura de 37°C.

3.2 Ensaio de citotoxicidade Alamar Blue

Para se verificar o potencial citotóxico do metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 foi realizado o teste de viabilidade pela redução da resazurina. Em uma microplaca estéril de 96 poços, as diversas linhagens celulares (1×10^5 cels/poço) foram cultivadas em 100 μ L de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB). O complexo metálico Dri-12 foi diluído de modo seriado e foram testados nas células concentrações variando de 1 a 100 μ M.

A microplaca foi armazenada em incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C por 48 horas. Após 40 horas de tratamento, cada poço da microplaca foi acrescido com 20 μ L reagente colorimétrico Alamar Blue, para que, ao se completar as 48h de tratamento, fosse realizado a leitura em uma leitora de placa. Foi utilizado os comprimentos de onda 570 e 600 nm.

Levando em consideração Bénéré *et al.* (2007) a viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

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

Na qual:

A1 = absorbância das células tratadas com Dri-12 à 570nm;

A2 = absorbância das células tratadas com Dri-12 à 600nm;

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);

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

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

Foram utilizados para este ensaio as linhagens TG180, C2C12, B16-F10, NIH/3T3, HeLa e HFF-1.

3.2.1 Índice de seletividade (IS)

Para verificar se o metalocomplexo é seletivo perante células tumorais, foi necessário calcular o índice de seletividade (IS), que é dado pela razão entre as concentrações necessárias para reduzir 50% da viabilidade celular (IC₅₀), tanto da célula não tumoral e da linhagem tumoral.

Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da linhagem não tumoral}}{IC_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

Resultados ≥ 2 mostram que o composto foi mais seletivo para as linhagens tumorais, ou seja, mata duas vezes mais células neoplásicas do que células saudáveis e são considerados promissores (BADISHA, *et al.*, 2009).

3.3 Teste do micronúcleo: avaliação da genotoxicidade

Para o ensaio de genotoxicidade *in vitro* foi seguido o protocolo da OECD 487 com algumas modificações. Com o intuito de investigar se o composto apresentava ação genotóxica, mioblastos murinos C2C12 (2×10^4 cels/poço) com no mínimo 90% de viabilidade foram dispostos em uma microplaca estéril de 96 poços. As células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 4 horas antes de serem adicionadas as diferentes concentrações do complexo metálico de cobre (II) Dri-12. As concentrações testadas foram: 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM e 2 µM por apresentarem viabilidade celular >70%.

Para controle positivo do experimento foi utilizado uma droga que possui sua ação genotóxica já comprovada, a colchicina (0,3 µg/ml). Para controle negativo, as células receberam a adição de meio de cultura.

O tempo de incubação com os tratamentos se deu por 24h em estufa CO₂ (5%) a 37°C. Os testes foram realizados em quadruplicata. Dado o tempo de incubação, foi retirado o sobrenadante dos poços e adicionado citocalasina B (5 µg/ml) e as células foram mantidas por mais 24 horas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C.

Após o término desta etapa, os poços foram lavados com PBS1x e posteriormente fixadas com solução de formalina tamponada (10% de formol em PBS1x). A microplaca foi reservada a 4°C *overnight*. Para a remoção do fixador foi acrescido PBS1x e as células foram coradas com fluorocromo Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) a 5 µM. Tal corante possui a capacidade de corar DNA e, para que a marcação ocorresse, a microplaca foi incubada no escuro dentro de uma estufa por 20 minutos, a 37°C.

Após ter se completado este passo, a placa foi lavada com PBS 1x e finalmente foi acrescido a solução de montagem (Na₂HPO₄ 100mM em PBS 1x). A microplaca foi analisada em microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA), onde imagens foram capturadas. Foram contadas pelo menos 2000 células que fossem bincucleadas para cada concentração, sendo considerados os micronúcleos que estavam presentes nas células binucleadas.

3.4 Ensaio de degradação de DNA, por eletroforese

Para se verificar se o complexo à base de cobre (II) Dri-12 possui a capacidade de gerar degradação do material genético, células de sarcoma 180 (10⁶ cels/mL) foram cultivadas em 250 µL de meio completo RPMI-1640 e dispostas em placa de cultura estéril de 12 poços, onde foram tratadas por 24h com três diferentes concentrações do mesmo, sendo: 1 µM, 4 µM e 20 µM. Ao término do tempo de incubação, as células que foram recuperadas por centrifugação tiveram seu DNA genômico extraído utilizando o *kit Quick-DNA™ universal* (Zymo research-USA). O DNA foi quantificado utilizando NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific), onde foi padronizado para as diferentes amostras a concentração de 10 ng de DNA por µL de solução. Em um gel de agarose (0,8%) e para coloração do DNA foi utilizado brometo de etídeo. Foi aplicado no gel 50 ng de DNA pra cada tratamento e a eletroforese correu por 2 horas a 80 volts. O gel foi levado a um transluminador e a imagem foi capturada com câmera digital comum.

3.5 Análise da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo

A partir da quantidade de DNA presente na célula, é possível saber em qual fase do ciclo celular a mesma se encontra, utilizando a marcação por iodeto de propídeo e análise em citometro de fluxo (KRISHAN, 1975).

A fim de investigar se o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 detinha atividade antiroliferativa, a linhagem tumoral sarcoma 180 (10^6 células/ml) foi incubada em 500 μ L de meio RPMI-1640 (completo) em uma placa estéril de 12 poços. Foram analisadas as seguintes concentrações da metalodroga Dri-12: 1 μ M, 4 μ M, 8 μ M e 20 μ M. As células foram incubadas com o tratamento por 48h. Dado o tempo de incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, gerando um *pellet*, que foi lavado em PBS1x (procedimento repetido duas vezes), e fixado em solução de etanol (70% em PBS 1x). As amostras foram armazenadas a 4°C *overnight*. Após esta etapa, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e o *pellet* foi ressuscitado em PBS 1x contendo 10 μ g/ml de iodeto de propídeo e 100 μ g/ml de RNase (afim de remover a contaminação por RNA e não interferir no experimento, permitindo que apenas o DNA fosse corado). As células foram incubadas no escuro por 45 minutos a 37°C e logo após esta etapa as amostras foram levadas para análise por citometro de fluxo ACCURI (BD). A leitura foi realizada no canal FL2. Os dados resultantes da citometria foram analisados pelo *software* FloJo (versão 10)

3.6 Análises de estresse oxidativo

3.6.1 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para analisar a capacidade do metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio foi utilizado a marcação por 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) e posterior análise em citometro de fluxo. Em uma microplaca estéril de 24 poços, células de sarcoma 180 (10^6 cels/mL) foram ressuscitadas em 250 μ L de meio RPMI-1640 completo. A linhagem tumorigênica foi tratada por 24h horas com as concentrações de DRI-12 de 1 μ M, 4 μ M e 20 μ M, cisplatina (40 μ M) ou meio de cultura (controle negativo). Dado o tempo de tratamento, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 rpm por 5

minutos, sendo o *pellet* ressuscitado em PBS 1x, prosseguindo centrifugação mais uma vez. Desta vez as amostras foram ressuscitadas em uma solução contendo a sonda para ROS – DCFH-DA (20 μ M) e iodeto de propídeo (0,5mg/L) em 100 μ l PBS 1x, sendo as células mantidas no escuro a 37°C por uma hora. Para controle negativo do experimento foi estabelecido que uma das amostras não receberia tratamento com o metalocomplexo Dri-12, assim como a adição da sonda (DCFH-DA+ PI). Os controles positivos consistiam em uma amostra que foi tratada com peróxido de hidrogênio (100 μ M) e marcada com DCFH-DA (20 μ M); outra amostra marcada apenas com 7-aminoactinomicina D (7- AAD) e por último uma amostra com dupla marcação (DCFH-DA e PI).

Posterior ao tempo de incubação, as células foram analisadas nos canais FITC e PE do citometro de fluxo, os dados resultantes foram analisados utilizando o *software* FloJo (versão 10).

3.6.2 Análise do estresse oxidativo sobre lipídeos

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método de BUEGE & AUST (1978), que se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados formando um produto final que pode ser mensurado em espectrofotômetro a 535 nm. As células de sarcoma 180 (2×10^7 cels/mL) foram tratadas com três concentrações (1, 4 e 20 μ M) do complexo de cobre (II) Dri-12 por 24h. Ao término do tempo de incubação com o tratamento as células foram homogeneizadas em PBS gelado. As células foram lisadas através de três ciclos de congelamento e descongelamento. O homogenato foi misturado com TCA, ácido tricloroacético (28% p/v em HCl), TBA (1% em ácido acético) e BHT, aquecido por 15min a 95°C e em seguida colocado em um banho de gelo. Posteriormente, o precipitado foi removido por centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4°C, e a absorbância do sobrenadante determinada a 535 nm em espectrofotômetro. Os níveis de MDA foram calculados utilizando o 1,1,3,3- tetrametoxipropano como padrão para construção da curva de calibração.

3.7 Ensaio de apoptose

Em uma microplaca estéril de 96 poços, a linhagem de carcinoma cervical humano – HeLa (10^5 cels/poço) – foi tratada com diferentes concentrações de Dri-12 (1, 4 e 10 μM) por 48h. Após o tempo de tratamento, as células foram ressuspendidas em uma solução de Hoechst 33342 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e iodeto de propídeo ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo incubadas no escuro a 37°C por 10 minutos. Foram capturadas imagens utilizando microscópio de fluorescência (Evos). Foram contadas pelo menos 300 células por foto de cada replicata (totalizando 900 células por tratamento). As células foram avaliadas levando em consideração a estrutura da cromatina e sua coloração (Tabela 1), e as porcentagens de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose foram determinadas a partir do número total de células contadas (Bronikowska et al., 2012; Rahman et al., 2013; Rogalska et al., 2013).

Tabela 1. Critérios de classificação de morte celular por fluorescência (Hoechst 33342 e Iodeto de propídeo).

Viáveis	Cromatina organizada (azul)
Apoptose inicial	Cromatina altamente condensada ou fragmentada (azul brilhante)
Apoptose tardia	Cromatina altamente condensada ou fragmentada (rosa brilhante)
Necrose	Cromatina organizada (vermelho)

3.8 Ensaio de autofagia

A fim de verificar se o composto Dri-12 induz ativação da via autofágica, a linhagem de sarcoma 180 foi tratada com o complexo Dri-12 nas concentrações de 1, 4 e $20\mu\text{M}$, peróxido de hidrogênio 1 mmol/L (controle positivo) ou meio de cultura (controle negativo) em uma placa de cultura de 24 poços (2×10^5 células por poço) com 250 μl de meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% SFB. As células foram tratadas por 24 horas e logo após foi adicionada de 0.05mM de

Monodansylcadaverine (MDC) – Sigma-Brasil – por poço e incubado a 37°C, no escuro, em estufa de CO₂ (5%) por 60 minutos. Em seguida as células foram recolhidas, centrifugadas e o pellet lavado com PBS gelado 1X (processo repetido 3 vezes). O pellet foi ressuspendido em uma solução de PBS+Glicina 0,1M e colocados 500µl dessa solução de células-PBS-Glicina em placa de 24 poços e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss L5M510, Alemanha).

3.9 Análises estatísticas

Para o **IC50** (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi determinada usando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA), a partir de uma regressão não linear, em que a porcentagem de a viabilidade celular foi determinada como uma função logarítmica das concentrações testadas, assumindo um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para o teste de **micronúcleo** as análises foram realizadas por *one-way* ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni. As análises estatísticas da progressão do **ciclo celular** e dos ensaios de **autofagia** foram realizadas por *one-way* ANOVA com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni. As análises estatísticas dos ensaios de **ROS** e apoptose foram realizadas por *two-way* ANOVA com múltiplas comparações e pós-teste Bonferroni. A análise da **peroxidação lipídica** foi realizada pelo *T test*. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 *Screening* de metalocomplexo de cobre (II)

Para a escolha do melhor complexo de cobre (II) dentre os sintetizados por nossa equipe de pesquisa foi realizado um *screening* no qual o metalocomplexo escolhido seria aquele que apresentasse melhor índice de seletividade, utilizando as linhagens murinas de sarcoma 180 e mioblastos C2C12.

Sendo assim foram testados os seguintes compostos: Dri-12, Dri-20, Dri-131, Dri-164, Dri-212 e Dri-228.

Obtém-se o índice de seletividade dividindo o IC₅₀ linhagem não tumoral pelo IC₅₀ linhagem tumoral onde considera-se significativo valores de IS ≥ 2 (BADISA, *et al.*, 2009).

Após a triagem o composto escolhido foi o Dri-12, uma vez que se sobressaiu aos demais, apresentando o maior índice de seletividade nas linhagens celulares escolhidas para o *screening*, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Tabela com as linhagens celulares e seus respectivos dados de IC₅₀ (μM) e IS.

Composto	IC₅₀ TG180	IC₅₀ C2C12	IS
Dri-12	4,157	19,852	4,775
Dri-20	5,145	4,061	0,788
Dri-131	22,735	17,233	0,758
Dri-164	9,426	17,103	1,814
Dri-212	27,04	56,76	2,099
Dri-228	8,486	17,366	2,046

4.1.2 Citotoxicidade de Dri-12 por Alamar Blue: IC₅₀ e índice de seletividade

Após o *screening* realizado anteriormente, foi definido que seriam aprofundados os testes com o metalocômplexo de cobre (II) Dri-12, uma vez que dentre todos testados apresentou o maior índice de seletividade.

Foram utilizadas no total seis linhagens celulares, sendo três delas tumorais (murinas: sarcoma 180 e melanoma B16-F10; humana: adenocarcinoma de colo de útero Hela) e três linhagens não tumorais (murinas: mioblastos C2C12 e fibroblastos NIH/3T3; humana: fibroblasto HFF-1).

O complexo de cobre (II) Dri-12 apresentou melhores resultados para as linhagens de sarcoma 180 e melanoma murino, onde seus índices de seletividade forma respectivamente 4,775 e 5,841 (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela com as linhagens celulares e seus respectivos dados (IC₅₀ e IS)

Linhagens celulares e seus respectivos IC₅₀ (µM)		IS
TG180: 4,157	C2C12: 19,853	4,775
B16-F10: 1,832	NIH/3T3: 10,7	5,841
HeLa: 2,823	HFF-1: 0,892	0,316

4.2 Avaliação *in vitro* da atividade genotóxica de Dri-12

Para avaliar a atividade genotóxica de Dri-12 células de mioblasto murino C2C12 foram tratadas com as seguintes concentrações: 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM e 2 µM. Para o controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 e para o controle positivo foi utilizado colchicina (0,3 µg/ml).

A frequência de micronúcleo presentes nas células que receberam tratamento de 2 µM do metalocomplexo Dri-12 foi significativa, evidenciando uma possível interação entre o composto e o DNA. Outro fato interessante foi que a taxa de células binucleadas, no tratamento com 2 µM de Dri-12, foi ligeiramente menor (1400 células), fato que pode estar relacionado a uma propriedade mitodepressora deste metalocomplexo. A Figura 2 expressa o gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontradas na linhagem celular de mioblasto C2C12 e evidencia a presença de micronúcleo em uma célula binucleada.

4.3 Avaliação da degradação de DNA frente ao tratamento com Dri-12

Para avaliar se o composto Dri-12 possuía a habilidade de interagir com o DNA, células tumorigênicas de sarcoma 180 (10⁶ cels/mL) foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do metalocomplexo – 1 µM, 4 µM e 20 µM.

Foi utilizado para controle positivo uma metalodroga já usada na quimioterapia (*cisplatina* a 40 µM) e para controle negativo as células foram tratadas apenas com meio de cultura RPMI-1640.

Os resultados encontrados mostram que o complexo metálico Dri-12 na concentração de 20 µM detém capacidade de induzir degradação do DNA

genômico das células tumorigênicas de sarcoma 180, fato que não é observado quando as mesmas foram tratadas com *cisplatina* (40 μM), como evidenciado na Figura 3.

Figura 2. A) Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada na linhagem não tumoral de mioblastos murinos C2C12. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). B) A seta indica uma célula de mioblasto murino C2C12 binucleada apresentando micronúcleo (Coloração Hoechst 33258).

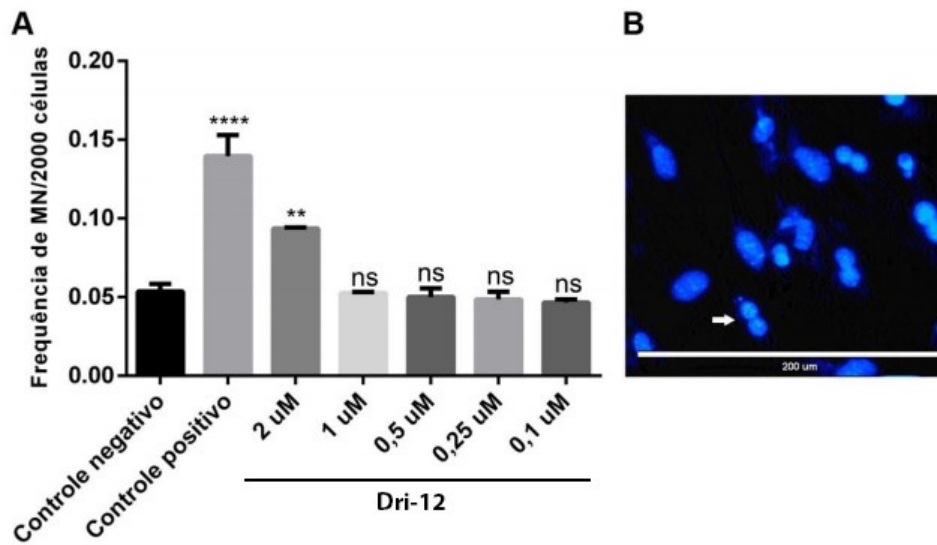


Figura 3. Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%), evidenciando a capacidade de Dri-12 induzir degradação do DNA genômico (concentração de 20 μM). M= Marcador molecular de 100 pares de base; C-= Meio RPMI-1640; CisPt= *Cisplatina* 40 μM .



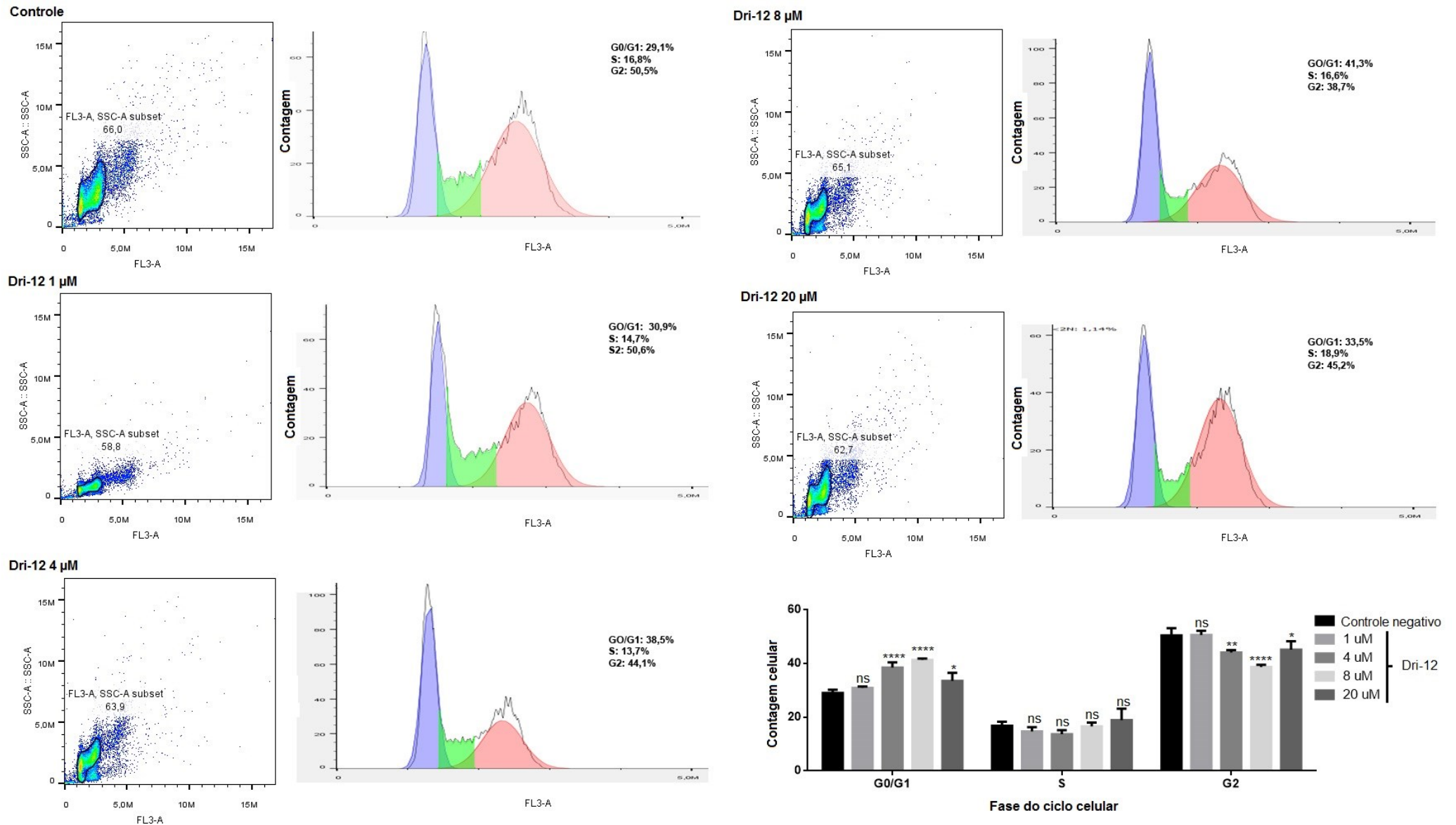
4.4 Ensaio do ciclo celular: atividade antiproliferativa de Dri-12

Para verificar se o metalocomplexo Dri-12 possui atividade antiproliferativa, a linhagem tumorigênica Sarcoma 180 foi tratada por 24 horas com as diferentes concentrações (20 μM , 8 μM , 4 μM e 1 μM) do complexo metálico. Foi utilizado o citometria de fluxo para as análises (por intermédio da marcação dos núcleos celulares com propídeo) para compreender toda a dinâmica do ciclo celular. Com este ensaio foi possível visualizar que os tratamentos com o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 nas concentrações de 4, 8 e 20 μM foram capazes de aumentar a porcentagem das células tumorigênicas de sarcoma 180 na fase G0/G1. As mesmas concentrações foram capazes de diminuir a porcentagem de células em G2 quando comparadas ao controle (tabela 4). Os histogramas e gráfico de barras deixam visível essa mudança de perfil na fase do ciclo celular da linhagem tumoral sarcoma 180 tratada com a metalodroga Dri-12 (Figura 4), evidenciando assim um aprisionamento das células de TG180 na fase G0/G1.

Tabela 4. Valores em porcentagem das fases do ciclo celular de células sarcoma 180 tratadas com diferentes concentrações (1 μM , 4 μM , 8 μM e 20 μM) do metalocomplexo Dri-12. Para a tabela, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni)

Tratamentos	Etapa do ciclo celular		
	G0/G1	S	G2
Meio RPMI-1640	29,1%	16,8%	50,5%
Dri-12 1 μM	30,9% ns	14,7% ns	50,6% ns
Dri-12 4 μM	38,5% ****	13,7% ns	44,1% **
Dri-12 8 μM	41,3% ****	16,6% ns	38,7% ****
Dri-12 20 μM	33,5% *	18,9% ns	45,2% *

Figura 4. Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas sarcoma 180 tratadas com diferentes concentrações de Dri-12 (1 μ M, 4 μ M, 8 μ M e 20 μ M). Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni)



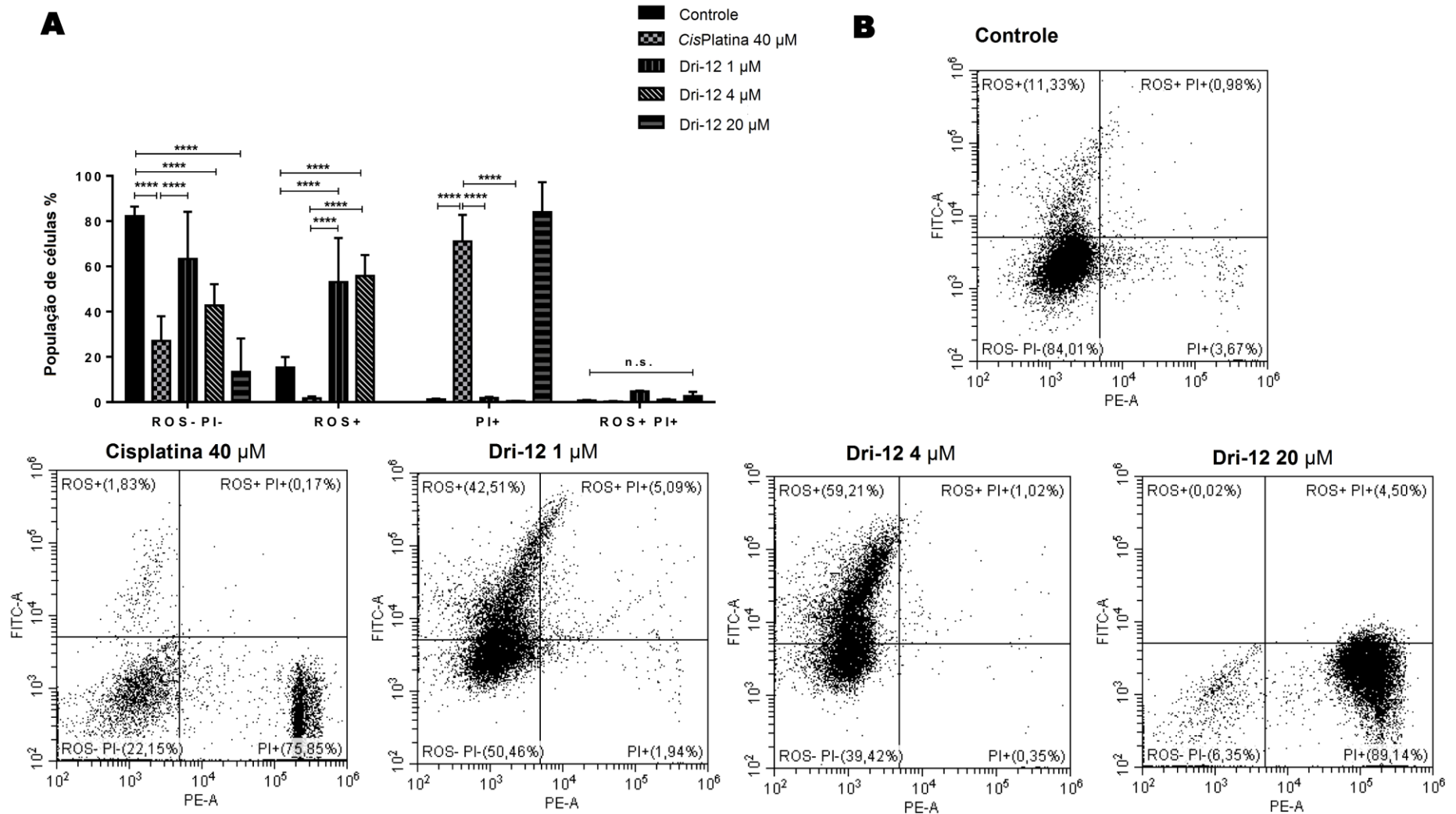
4.5 Avaliação do stress oxidativo frente ao tratamento com Dri-12

4.5.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Para verificar se o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 possui a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, células murinas de sarcoma 180 foram tratadas com diversas concentrações do composto (1, 4 e 20 μM) por 24 horas. Ao término do tratamento as células foram marcadas com sonda para ROS (DCFH-DA e PI) e analisadas no citometro de fluxo.

Os dados obtidos revelaram que o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 mesmo na menor concentração – 1 μM – é capaz de induzir uma enorme produção de espécies reativas de oxigênio, foi encontrado 42,51 % de ROS nas células tratadas com Dri-12. Na concentração de 4 μM Dri-12 foi quantificado 59,21% de ROS presentes nas células de sarcoma 180 tratadas como mostra a Figura 5.

Figura 5. A) Gráficos de barra representando as marcações referentes a produção de ROS das células sarcoma 180 tratadas com diferentes Dri-12 (20 μ M, 4 μ M e 1 μ M). Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). **B)** *Dot-plots* da concentração de ROS na linhagem TG180 tratadas com concentrações de Dri-12 (1 μ M, 4 μ M e 20 μ M).

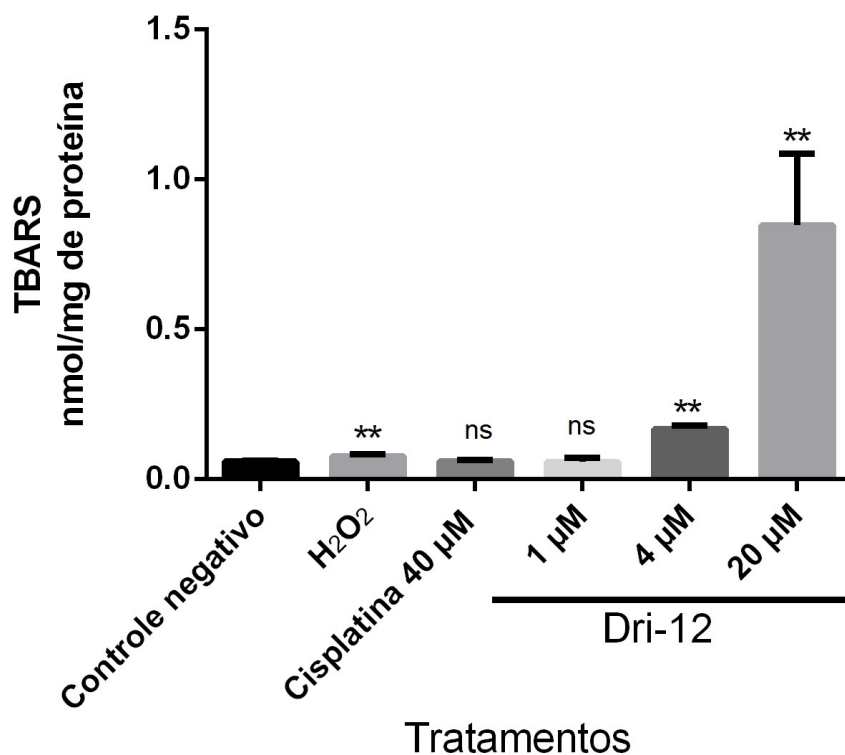


4.5.2 Quantificação de peroxidação lipídica

Para analisar a capacidade do metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 gerar peroxidação lipídica foi utilizado o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) baseando-se em BUEGE & AUST (1978).

Os dados obtidos demonstram que Dri-12 possui grande capacidade de induzir lipoperoxidação nas concentrações de 4 e 20 μM . Tais resultados evidenciam que o complexo metálico detém grande potencial de induzir estresse oxidativo na linhagem tumorigênica de sarcoma 180 como mostra a figura 6.

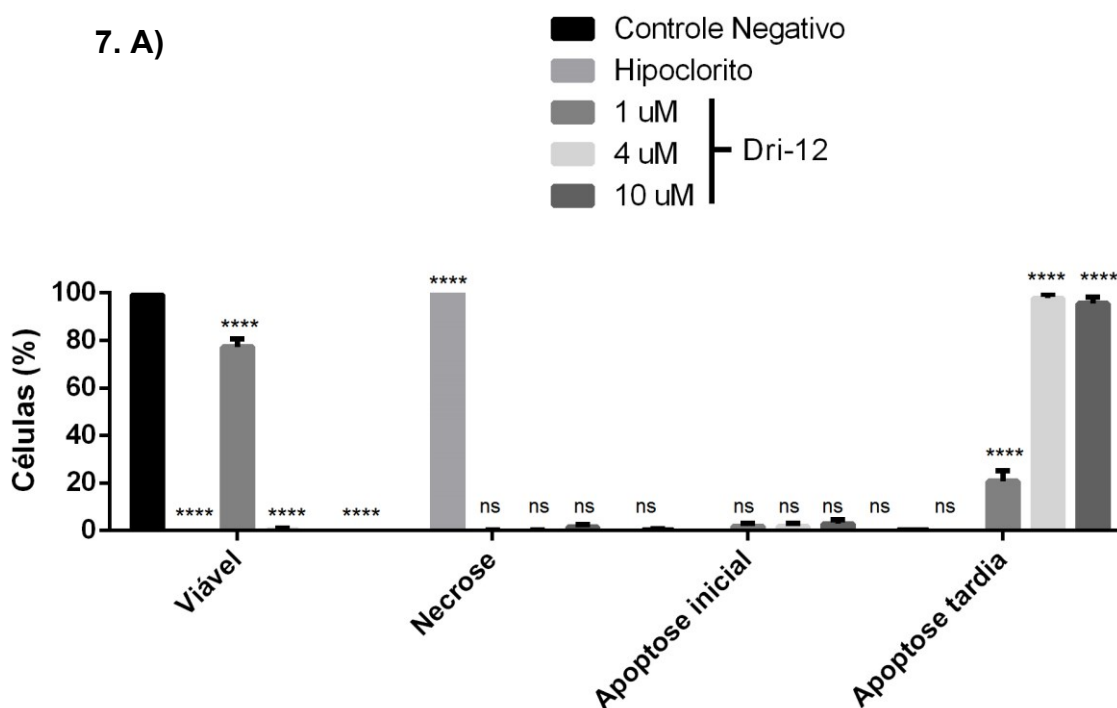
Figura 6. Gráfico de barras representando a quantidade de TBARS (nmol/mg de proteínas) para linhagem tumorigênica de sarcoma 180 tratadas com diferentes concentrações de Dri-12. Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (cada grupo comparado com o controle negativo por Students's *T-test*)



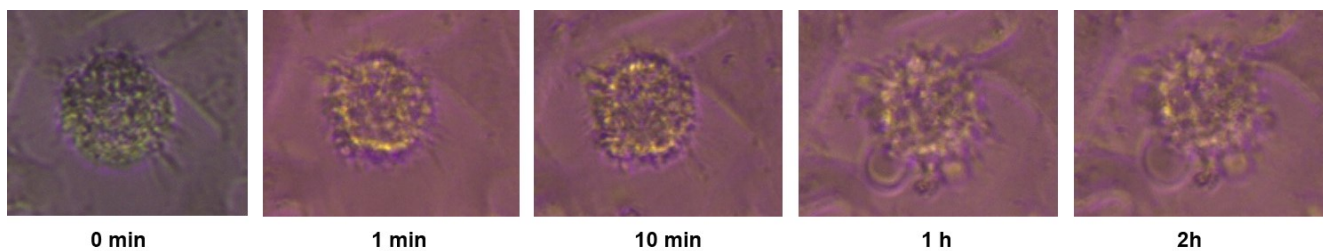
4.6 Investigação do tipo de morte celular

A fim de elucidar qual o tipo de morte celular o tratamento com o metalocômplexo de cobre (II) Dri-12 acarreta em células de adenocarcinoma de colo de útero humano HeLa, a linhagem foi tratada por 24 horas com três concentrações do complexo –1, 4 e 10 μM . O metalocômplexo Dri-12 mostrou-se capacidade significativa de induzir apoptose tardia nas células HeLa, desde a menor concentração testada –1 μM – até a mais alta –10 μM – (Figura 7a). Foi realizado também capturas de imagens de células HeLa tratadas com 100 μM do complexo metálico Dri-12. Foi possível visualizar processo apoptótico em tempo real (Figura 7b).

Figura 7. A) Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de Dri-12 (1 μM , 4 μM e 10 μM). Para o gráfico de barras, os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). **B)** *Time lapse* do processo apoptótico da linhagem HeLa tratada com 100 μM do metalocômplexo Dri-12.



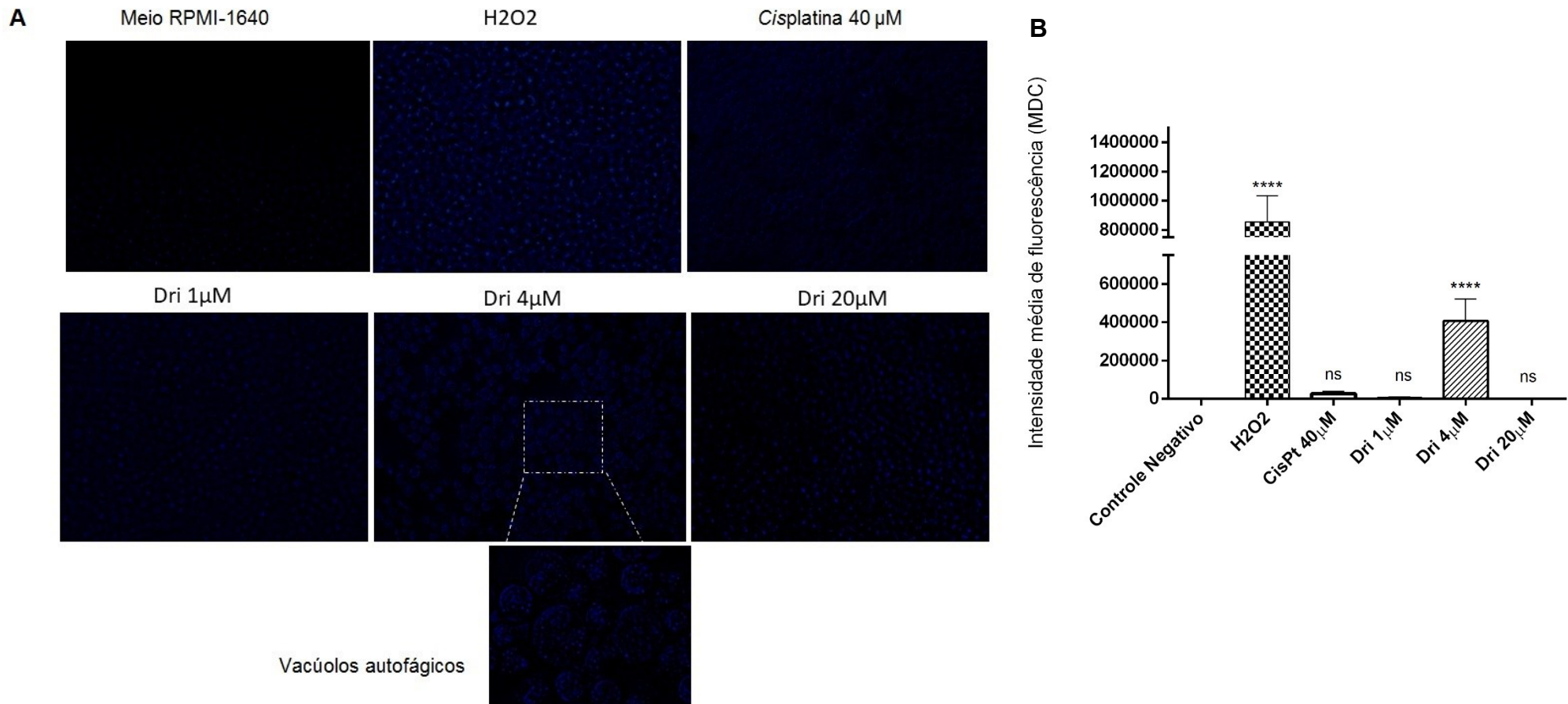
7. B)



4. 7 Ensaio de autofagia por Monodansilcadaverina (MDC)

Ainda com a intenção de investigar os mecanismos de morte celular que é acarretado pelo metalocômplexo de cobre (II), células tumorigênicas de sarcoma 180 foram tratadas com três concentrações do complexo (1, 4 e 20 μM) para verificar se ele é capaz de ativar a via autofágica. Graças a marcação com MDC, foi possível visualizar que o metalocômplexo de cobre (II) Dri-12 na concentração de 4 μM foi capaz de induzir a via autofágica das células TG180 (Figura 8).

Figura 8. A) Imagem evidenciando a presença dos vacúolos autofágicos marcados com MDC nas células tumorigênicas de sarcoma 180 tratadas com 4 μ M Dri-12. B) Gráfico representativo da intensidade fluorescência da marcação dos vacúolos autofágicos com MDC. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni)



5. Discussão

O êxito da utilização da *cisplatina* no tratamento oncológico acarretou uma evolução nas pesquisas na área farmacêutica para o desenvolvimento de novos metalocomplexos com ação antineoplásica (GUO *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2015).

Neste cenário complexos metálicos que possuem como metal o cobre (II), vem ganhando notoriedade. Estes metalocomplexos vem apresentando suas vantagens como agentes antineoplásico por apresentarem a capacidade de interagir com o DNA, podendo se ligar e clivá-lo resultando assim na morte das células neoplásicas (BORGES *et al.*, 2016). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo averiguar *in vitro* o potencial antitumoral de Dri-12.

Nardone (1977) definiu que a citotoxicidade tratava-se de um conjunto de alterações homeostáticas celulares, que detêm a habilidade de afetar as capacidades adaptativas da célula, bem como o seu metabolismo, processo replicativo e sobrevivência. Comparando-se os dados entre os grupos onde não foram administrado tratamento com os que receberam o tratamento com Dri-12 (cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina), fica claro a citotoxicidade (concentração-dependente) significativa de tal metalocomplexo.

Em 2007 Alémon-Medina e colaboradores avaliaram variados complexos metálicos a base de cobre, referentes a família das Casiopeínas[®], e alguns complexos do subgrupo III apresentaram uma baixa citotoxicidade frente a linhagem HeLa. Realizando o tratamento com concentrações de 100 µM as drogas Cas-III-E-a Cas-III-H-a conseguiram reduzir 26,2% e 89,1% respectivamente da viabilidade celular em HeLa. Em contrapartida o metalocomplexo Dri-12 precisou de apenas 2,823 µM para reduzir metade da viabilidade celular na mesma linhagem, evidenciando assim uma grande eficiência citotóxica contra a linhagem de adenocarcinoma de útero humano HeLa (Tabela 5).

Tabela 5. Tabela comparativa da citotoxicidade *in vitro* entre complexos do subgrupo III das Casiopeínas® (Cas-III-E-a e Cas-III-H-a) e Dri-12 na linhagem HeLa (Fonte: adaptado de ALÉMON-MEDINA *et al.* 2007).

Comparação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> entre complexos do subgrupo III das Casiopeínas® e Dri-12 na linhagem HeLa	
Cas-III-E-a (100 µM)	Dri-12 (2,823 µM)
Redução da viabilidade celular: 26,2 %	Redução da viabilidade celular: 50 %
Cas-III-H-a (100 µM)	Dri-12 (2,823 µM)
Redução da viabilidade celular: 89,1 %	Redução da viabilidade celular: 50 %

De acordo com dados na literatura a concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) da *cisplatina* nas mesmas linhagens celulares tumorais murinas (Sarcoma 180 e melanoma B16-F10) foi respectivamente 16 e 2,3 vezes maior (LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010) do que a IC_{50} do complexo de cobre (II) Dri-12. Na linhagem de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa), a IC_{50} da *cisplatina* foi cerca 3,3 vezes maior (PUTRAL *et al.*, 2005) quando comparado a Dri-12.

O complexo Dri-12 mostrou ser mais eficiente em reduzir 50% da viabilidade celular nas mesmas linhagens celulares anteriormente citadas, quando comparado a *cisplatina*, uma metalodroga mundialmente empregada no tratamento oncológico (tabela 6).

Tabela 6. Tabela comparativa entre as doses capazes de reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) *in vitro* em diversas linhagens tumorais da *cisplatina* e do metalocomplexo de cobre (II) Dri-12.

Comparação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> entre <i>cisplatina</i> e Dri-12		
Linhagens	IC_{50} <i>Cisplatina</i>	IC_{50} Dri-12
Sarcoma 180	64,83 μ M (LIMA <i>et al.</i> , 2014)	4,157 μ M
B16-F10	4,2 μ M (SILVA <i>et al.</i> , 2010)	1,832 μ M
HeLa	9,4 μ M (PUTRAL <i>et al.</i> , 2005)	2,823 μ M

Em relação a células saudáveis, é possível encontrar maiores concentrações de cobre em alguns tipos de neoplasias humanas (colo de útero, sarcoma e mama). Este fato pode estar relacionado a alta taxa metabólica e capacidade das células tumorigênicas induzir angiogênese. Este processo é necessário para a progressão tumoral e o cobre participa como grupo prostético pra várias enzimas e proteína nesses processos. (SAGHIRI *et al.*, 2015; FREZZA *et al.*, 2010). Tais características podem ter favorecido o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12, conferindo a ele maior atividade citotóxica quando comparado à *cisplatina*.

Outra característica desejada em um medicamento quimioterápico é sua seletividade, ou seja, que haja predileção de sua ação sobre células tumorais. O composto Dri-12 exibiu excelentes índices de seletividade para sarcoma 180 (4,775) e melanoma B16-F10 (5,84). De acordo com Mahavorasirikul *et al.*, (2010)

compostos que detêm $IS > 3$ são categorizados como extremamente seletivos, portanto, agem 3 vezes mais sobre células tumorais em detrimento das células saudáveis.

Para verificar se o metalocomplexo Dri-12 também detém ação genotóxica foi realizado o ensaio do micronúcleo (recomendado pela OECD como um dos testes para investigação). Foram analisadas somente as células interfásicas binucleadas (graças ação da citocalasina B que impede a citocinese), garantindo assim que o ciclo divisional fora completado (FENECH, 2000).

Genotoxina é definida como qualquer substância que possa acometer o DNA, ou seja, gerar danos a essa molécula – quebra de cadeia dupla ou simples – ou até mesmo mutações – pontuais, numéricas ou estruturais – (NAGARATHNA *et al.*, 2013). Os micronúcleos podem ser definidos como diminutos corpos extranucleares contendo em seu interior DNA (fragmentos ou até mesmo cromossomos inteiros) que devido a algum evento genotóxico não foi incluso ao núcleo celular principal (SHIBAI-OGATA *et al.*, 2011).

Os mioblastos murinos C2C12 que foram tratados com diferentes concentrações de Dri-12 apresentaram um aumento da frequência de micronúcleos, indicando que o metalocomplexo de cobre (II) é genotóxico e que age sobre o DNA, indiretamente ou diretamente.

Muitos metalocomplexos que possuem como base o cobre também foram avaliados quanto a sua capacidade de agir sobre a molécula de DNA (Tabela 7), e demonstraram tal habilidade (SERMENT-GUERRERO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2004).

A capacidade do complexo Dri-12 (cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina) interagir com o DNA e elevar a frequência de micronúcleos, pode estar relacionado com a 1,10-fenantrolina, que compõe a estrutura do metalocomplexo. De acordo com Zhang e colaboradores (2004) a 1,10-fenantrolina é classificada como nucleasse artificial além de atuar como agente intercalante (devido a sua estrutura planar), e estudos com bis(1,10-fenantrolina) mostraram que tal substância é hábil em clivar a molécula de DNA quando presente peróxido de hidrogênio e tiol.

Tabela 7. Tabela demonstrativa de diversos complexos metálicos a base de cobre que demonstram capacidade de agir sobre o DNA.

Metalocomplexos a base de cobre que demonstraram agir sobre DNA	
Autores	Complexos
SERMENT-GUERRERO <i>et al.</i> , 2011	Casiopeínas ®
ZANG <i>et al.</i> , 2004	[Cu(phen)(L-Thr)(H ₂ O)](ClO ₄)
SILVA <i>et al.</i> , 2014	[Cu(hyd)(bpy)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄)
	[Cu(hyd)(phen)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄)
	[Cu(Shyd)(bpy)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄)
	[Cu(Shyd)(phen)(acn) (ClO ₄)](ClO ₄)

Outro fato importante é que o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 mostrou ser capaz de induzir fragmentação de DNA genômico em células tumorigênicas de sarcoma 180. Provando mais uma vez sua capacidade de atuar de forma direta ou indireta sobre o DNA, acarretando danos significativos. Tal evento também foi evidenciado por Polloni e colaboradores (2019) onde demonstraram que o complexo metálico de cobre(II) Cu(BTA)phen era capaz de induzir fragmentação do DNA genômico em células TG180 na concentração de 50 µM.

De acordo com Alberts e colaboradores (2010) compreende-se que ciclo celular possui quatro fases – G1, S, G2 e M. Resumidamente, na fase G1 acontece a preparação celular para a síntese de DNA; durante a fase S ocorre a síntese do material genético; a fase G2 é caracterizada pela organização da célula para o processo mitótico, onde na fase M ocorre a divisão celular. Para que o processo de divisão celular aconteça de forma fidedigna a progressão do ciclo divisional é controlada por *checkpoints*, onde é verificada a integridade celular e caso haja qualquer problema é bloqueado o avanço do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2010).

Como exemplo de problemas que podem ocorrer durante o processo de divisão celular são os danos ao DNA, quando os pontos de checagem os reconhecem, as células são aprisionadas em G1 ou G2. Ainda podem ocorrer falhas durante o processo de duplicação do material genético, sendo assim as células são detidas na etapa S, e caso ocorra distúrbios relativos aos fusos mitóticos as células ficam reclusas a fase M (CONCKLIN, 2004). O metalocômplexo de cobre (II) Dri-12 provou possuir atividade antiproliferativa, uma vez que acarretou no aprisionamento das células de sarcoma 180 na fase G0/G1, este fato pode relacionado a danos ao DNA. O complexo Dri-12 anteriormente provou ter ação genotóxica, uma vez que foi capaz de aumentar a frequência de micronúcleos, sendo também capaz de degradar DNA genômico, o que pode estar relacionado com o aprisionamento das células em G0/G1 (que indica danos ao DNA). Outros complexos a base de cobre demonstraram paralisar o ciclo celular, detendo as células em G/G1 (HU *et al.*, 2017; POLLONI *et al.*, 2019; TREJO-SÓLIS *et al.*, 2005; RAJALAKSHMI *et al.*, 2012) o que corrobora para o resultado encontrado.

Quando há o bloqueio da progressão do ciclo celular e as células são retidas em algum ponto de checagem existem dois caminhos a serem seguidos: corrigir os danos celulares ou, dependendo da gravidade do dano (caso ele seja irreparável) as células são levadas à morte programa – apoptose (CONCKLIN, 2004). Um dos tipos de morte celular é a apoptose, processo que não gera resposta inflamatória, uma vez que é um processo coordenado pela própria célula, onde existem muitas alterações bioquímicas e morfológicas. Durante o processo apoptótico existe a condensação do núcleo celular, formação dos *blebbings* na membrana (JAYAKIRAN, 2015).

Tendo ciência que o metalocômplexo de cobre (II) Dri-12 paralisa as células em G0/G1 (possivelmente por acarretar danos ao DNA), foi investigado qual via de morte celular o tratamento com o complexo Dri-12 gerava nas células. Existem vários ensaios possíveis para quantificação e diferenciação do tipo de morte celular, neste trabalho foi realizado dupla marcação com Hoechst 3342 e iodeto de propídio. O metalocômplexo de cobre (II) Dri-12 demonstrou uma alta capacidade em induzir apoptose tardia (concentração dependente) na linhagem HeLa, comportando-se como outros complexos de cobre testados por outros autores (HALEEL *et al.*, 2016; POLLONI *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2016), além do que, a utilização de agentes

quimioterápicos frente diferentes linhagens tumorais frequentemente induz morte celular via apoptose (HALEEL *et al.*, 2016).

É sabido que um desbalanço na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem acarretar danos diretamente ou indiretamente em várias estruturas celulares – proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, organelas (RAY *et al.*, 2012). O quadro de estresse oxidativo está relacionado com a indução de morte celular (REDZA-DUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016). Para investigar se o tratamento com metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 possuía a capacidade de induzir um quadro de estresse oxidativo levando as células a apoptose, foi realizado a dupla marcação (DCFH-DA e Pi), possibilitando quantificar níveis de ROS intracelular e morte celular (ERUSLANOV e KUSMARTSEV, 2010).

O tratamento com o metalocomplexo Dri-12 foi capaz de induzir uma superprodução de espécies reativas de oxigênio na linhagem tumorigênica TG180 nas concentrações de 1 e 4 μM , elevando em até quase 60% a produção de ROS. Quando analisa-se o tratamento de 20 μM é possível perceber não houve alteração significativas nos níveis de ROS, tal fato pode estar relacionado aos altos índices de morte celular (visto que tal concentração de Dri-12 é cerca de 4 vezes maior do que o IC_{50} para a linhagem TG180). Por serem moléculas pequenas após a morte celular acontece a perda das espécies reativas de oxigênio para o meio extracelular, não sendo possível sua quantificação (ERUSLANOV e KUSMARTSEV, 2010; REDZA-DUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016). O tratamento com a concentração de 4 μM de Dri-12 conseguiu aumentar em quase 60% os níveis de ROS intracelular, porém não foi possível visualizar morte celular nessa concentração. Tal fenômeno possivelmente pode ser explicado devido ao tempo de tratamento celular, que se deu por 24 horas – tempo escolhido por receio de que a morte celular acarretasse na perda de ROS para o meio extracelular, não sendo possível sua quantificação – e o metalocomplexo de cobre (II) possui sua ação completa em 48 horas de tratamento.

A literatura evidencia que vários tipos de complexos metálicos que possuem como base o cobre detêm a habilidade de induzir o aumento da produção de ROS (LOW *et al.*, 2017; QIN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2017; TREJO-SÓLIS *et al.*, 2012), corroborando assim com os resultados encontrados.

Foi realizado também o teste de peroxidação lipídica para verificar o nível de estresse oxidativo gerado pelo tratamento com Dri-12 em células TG180. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (BUEGE e AUST, 1978), em virtude da capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados formando um produto final que pode ser mensurado por espectrofotometria. O metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 apresentou grande capacidade em acarretar peroxidação lipídica nas concentrações de 4 e 20 μM . Tal fato pode ser explicado em virtude de que vários metais de transição que possuem seu redox ativo (cobre, cromo, cádmio, níquel, vanádio, manganês e ferro) detêm a habilidade de induzir a peroxidação lipídica via produção de ROS (de maneira mais específica, produção de radicais hidroxil) (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

É descrito que o processo autofágico realiza funções celulares de remediação para situações críticas, este processo por linhas gerais, tem como objetivo reciclar moléculas intracelulares. Quando a célula passa por desbalanço de espécies reativas de oxigênio o processo autofágico tem como objetivo reduzir a quantidade de ROS dentro da célula. Quando a célula exibe uma exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio que consegue acometer os mecanismos de proteção celular, ocorre a disfunção da autofagia – provocada pelo excesso de indução do processo autofágico. A superestimulação da autofagia gerada por ROS acarreta em morte celular via apoptose ou autofágica (LEE *et al.*, 2014; REDZADUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016). Morfologicamente, este tipo de morte é marcado por vacuolização citoplasmática massiva (GALLUZZI *et al.*, 2012; MORSELLI *et al.*, 2009), uma vez que, durante o processo, substratos intracelulares e extracelulares são entregues para os lisossomos para degradação ou reciclagem (RAVIKUMAR *et al.*, 2010; MIZUSHIMA, 2007).

Para verificar se o metalocomplexo de cobre (II) era capaz de induzir a via autofágica foi realizado a marcação por monodansilcaderiverina, que permite a visualização dos vacúolos autofágicos. Os resultados obtidos mostraram que na concentração de 4 μM o complexo Dri-12 é capaz de induzir processo autofágico em células de sarcoma 180, provavelmente devido à alta produção de ROS que o composto consegue desencadear, levando assim a célula a apoptose. Estudos

relatam que nanopartículas e complexos a base de cobre detêm a capacidade de induzir a via autofágica (LAHA *et al.*, 2014; TREJO-SÓLIS *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2010) corroborando assim com os resultados obtidos.

Os experimentos realizados demonstram que o complexo de cobre (II) Dri-12 é uma substância citogenotóxica, com altos índices de seletividade, sendo capaz de induzir estresse oxidativo que ativa a via autofágica e conseqüentemente conduz a célula a apoptose.

6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos o metalocomplexo de cobre (II) Dri-12 apresentou atividade antitumoral *in vitro*. O composto acarreta na indução de espécies reativas de oxigênio (devido cobre possuir redox ativo), que podem participar indiretamente ou diretamente acarretando danos no DNA, levando a uma paralisação das células neoplásicas na fase G0/G1, promovendo assim a morte celular. O processo de morte celular está relacionado com a disfunção autofágica, resultando no processo apoptótico. O complexo Dri-12 apresentou alto índice de seletividade *in vitro*, tornando-o um grande candidato a agente quimioterápico. Porém são necessários testes *in vivo* para verificar a eficácia antitumoral em modelos animais, bem como elucidar a toxicidade do composto em um organismo como um todo.

7. Referências

AHMED, A. A.; MUSA, H. H.; SIFALDIN, A. Z.; MUSA, T. H. Epigenetic events in male common urogenital organs cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**. P. 1-9, 2016

<https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2016.06.004>

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

ALÉMON-MEDINA, R.; BREÑA-VALLE, M.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J. L.; GRACIA-MORA, M. I.; RUIZ-AZUARA, L. Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 60, p. 219-228, 2007

<https://doi.org/10.1007/s00280-006-0364-9>

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

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

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

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/360438>

BABA, Y.; ISHIMOTO T.; KURASHIGE, J.; IWATSUKI, M.; SAKAMOTO, Y.; YOSHIDA, N.; WATANABE, M.; BABA, H. Epigenetic field cancerization in gastrointestinal cancers. **Cancer Letters**, 2016

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.009>

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

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>

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

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.018>

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

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BRONIKOWSKA, J. et al. The Coumarin Psoralidin Enhances Anticancer Effect of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6449–6464, 29 maio 2012.

<https://doi.org/10.3390/molecules17066449>

CONCKLIN, K. A. Chemotherapy-Associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, n. 4, p. 294-300, 2004

<https://doi.org/10.1177/1534735404270335>

CROSS, E. D. et al. 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>

DING, X.; XIE, H.; KANG, Y. J. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 301-310, 2011

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.06.010>

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry **Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology**, v. 594, p. 1–477, 2014

https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4

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

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

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p.81-95, 2000

[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; DOU, Q. P. Novel metal and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, n.16, p.1813-1825, 2010.

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

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

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–20, 2012.

<https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>

GUO, Q. J.; YE, S.S; CAO, N.; HUANG, J.; GAO, J.; CHEN, Q. Y. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 577-582, 2010

<https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.08.001>

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

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.120>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v.144, p. 646-674, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HU, J.; LIAO, C.; GUO, Y.; YANG, F.; SANG, W.; ZHAO, J. Copper(II) complexes inducing apoptosis in cancer cells, and demonstrating DNA and HSA interactions. **Polyhedron**, 2017

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.04.018>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 128 p., 2017

<https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2018v64n1.115>

JAYAKIRAN, M. Apoptosis-Biochemistry: A mini review. **Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1000205, 2015

<https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000205>

J. A. BUEGE AND S. D. AUST. Microsomal lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*. In: **Journal of Physics: Conference Series**. [s.l: s.n.]. v. 71p. 012004.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

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

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

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

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

LEE, Y. H.; CHENG, F. Y.; CHIU, H. W.; TSAI, J. C. FANG, C. Y.; CHEN, C. W. WANG, Y. J. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4706-4715, 2014

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.021>

LIMA, A. P. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105865>

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

<https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1260711>

MA, T.; XU, J.; WANG, Y.; YU, H.; YANG, Y.; LIU, Y.; DING, W.; ZHU, W.; CHEN, R.; GE, Z.; TAN, Y.; JIA, L.; ZHU, T. Ternary copper (II) complexes with amino acid chains and heterocyclic bases: DNA binding, cytotoxic and cell apoptosis induction properties. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 144, p. 38-46, 2015

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

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

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

MIZUSHIMA, N. Autophagy: Process and function. **Genes and Development**, v. 21, n. 22, p. 2861–2873, 2007

<https://doi.org/10.1101/gad.1599207>

MORSELLI, E. et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 9, p. 1524–1532, 2009

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.006>

NARDONE, R. M. Toxicity testing in vitro. **Growth, nutrition, and metabolism of cells culture**, v.3, p. 417-495, 1977

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-598303-7.50017-5>

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 599–616, 2017

<https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

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

<https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>

OJOPI, E. P. B., NETO, E. D. Genômica e oncologia. In: Genômica. São Paulo: **Atheneu**, 2004, p. 363-387

PAIXÃO, D. A. et al. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, n. li, p. 138–146, 2017

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

POLLONI, L. et al. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, n. October 2018, p. 108586, 2019

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>

PRAVIN, N. et al. 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>

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

<https://doi.org/10.1124/mol.105.014191>

QIN, Q. P. et al. Synthesis and antitumor mechanisms of a copper (II) complex of anthracene-9-imidazoline hydrazone (9-AIH). **Metallomics**, v. 7, n. 7, p. 1124-1136, 2015

<https://doi.org/10.1039/C5MT00027K>

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1383–1435, 2010

<https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

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

ROGALSKA, A. et al. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 239–249, 2012

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.09.006>

RUIZ-AZUARA, L.; BRAVO-GÓMEZ, M. E. Copper compounds in cancer chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3606-3615, 2010

<https://doi.org/10.2174/092986710793213751>

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

SANTINI, C. et al. Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815–862, 2014

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.011>

SERMENT-GUERRERO, J.; CANO-SANCHEZ, P.; REYES-PEREZ, E.; VELAZQUEZ-GARCIA, F.; BRAVO-GOMEZ, M. E.; RUIZ-AZUARA, L. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas®. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1376-1384, 2011

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>

SHIBAI-OGATA, A.; KAKINUMA, C.; HIOKI, T.; KASAHARA, T. Evaluation of high-throughput screening for *in vitro* micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. **Mutagenesis**, p. ger037, 2011

<https://doi.org/10.1093/mutage/ger037>

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SANTOS, G. C.; FERNANDES, N. G.; SILVEIRA, J. N.; FERREIRA, A. M. C.; BORTOLOTTI, T.; TEREZI, H.; BORTOLUZZI, A. J.; NEVES, A.; PEREIRA-MAIA, E. C. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper (II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, p. 67-76, 2014

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

SILVA, H. et al. Novel platinum(II) complexes of long chain aliphatic diamine ligands with oxalato as the leaving group. Comparative cytotoxic activity relative to chloride precursors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1961–1967, 2010

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001000023>

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

SYED ABDUL RAHMAN, S. N.; ABDUL WAHAB, N.; ABD MALEK, S. N. In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–14, 2013

<https://doi.org/10.1155/2013/257108>

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

TISATO, F.; MARZANO, C.; PORCHIA, M.; PELLEI, M.; SANTINI, C. Copper in diseases and treatment, and copper-based anticancer strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 708-749, 2009

<https://doi.org/10.1002/med.20174>

TREJO-SOLÍS, C. et al. Cas 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>

TREJO-SOLÍS, C.; JIMENEZ-FARFAN, D.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; FERNANDEZ-VALVERDE; F.; CRUZSALGADO, A., RUIZ-AZUARA, A., SOTELO, J. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 156, 2012

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

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8097-8340, 2010

<https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>

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

https://doi.org/10.3892/ijo_00000655

ZHANG, S.; ZHU, Y.; TU, C.; WEI, H.; YANG, Z.; LIN, L.; DING, J.; ZHANG, J.; GUO, Z. A novel cytotoxic ternary copper (II) complex of 1,10-phenanthroline and L-threonina with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 2099-2106, 2004

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.09.014>