

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E DE INTERAÇÃO E DEGRADAÇÃO
DE DNA *IN VITRO* DO COMPLEXO METÁLICO COBRE(II) [Cu(4- FH)(phen)(ClO₄)₂]

TIAGO RODRIGUES DE SOUZA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Graduação de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para Obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia

UBERLÂNDIA – MG

Novembro/2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E DE INTERAÇÃO E DEGRADAÇÃO
DE DNA *IN VITRO* DO COMPLEXO METÁLICO COBRE(II) [Cu(4- FH)(phen)(ClO₄)₂]

TIAGO RODRIGUES DE SOUZA

Orientador: Robson José de Oliveira Júnior

Co-orientador: Pedro Henrique Alves Machado

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Graduação de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para Obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia

UBERLÂNDIA – MG

Novembro/2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E DE INTERAÇÃO E DEGRADAÇÃO
DE DNA *IN VITRO* DO COMPLEXO METÁLICO COBRE(II) [Cu(4- FH)(phen)(ClO₄)₂]

TIAGO RODRIGUES DE SOUZA

Orientador: Robson José de Oliveira Júnior
IBTEC/UFU

Co-orientador: Pedro Henrique Alves Machado
IBTEC/UFU

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Nilson Nicolau Junior

UBERLÂNDIA – MG
Novembro/2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E DE INTERAÇÃO E DEGRADAÇÃO
DE DNA *IN VITRO* DO COMPLEXO METÁLICO COBRE(II) [Cu(4- FH)(phen)(ClO₄)₂]

TIAGO RODRIGUES DE SOUZA

Aprovado pela Banca Examinadora em: 04/11/2021 Nota: _____

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior, IBTEC/UFU/MG

Uberlândia, 04 de novembro de 2021

Agradecimentos

Agradeço a todos que participaram dessa jornada e contribuíram de alguma forma para o crescimento pessoal, desenvolvimento dos projetos e da pesquisa. Aos meus colegas, amigos, noiva e família que me apoiaram e continuam me apoiando. A Universidade Federal de Uberlândia e todo o conjunto que me permitiu amadurecer e ser o que sou hoje. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelas oportunidades oferecidas. Ao meu orientador e co-orientador que acolheram, ensinaram, possibilitaram a realização e conclusão desse trabalho.

A todos os envolvidos, por todo apoio, paciência, dedicação e ensinamentos, minha sincera gratidão.

Resumo

O contínuo crescimento de casos e índices de mortalidade causados pelo câncer torna necessário a incessante busca por maneiras de tratar, curar e confortar os indivíduos acometidos pela doença. A abordagem sistêmica é uma das formas indispensáveis no tratamento de neoplasias, sendo a quimioterapia o protocolo mais frequente empregado. Com isso em mente, tem-se continuamente a busca por complexos que sejam mais seletivos e menos tóxicos para o organismo como um todo. Desse modo, o estudo de metalocomplexos de cobre(II) tem tido crescente interesse no uso como potencial atividade antitumoral, devido as vantagens que eles oferece, destacando-se na literatura por sua atividade redox e biocompatibilidade. Portanto, o presente trabalho buscou avaliar o potencial citotóxico do complexo de cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético hidrazida e 1,10-fenantrolina [Cu(4-FH)(phen)(ClO₄)₂] (DRI-12) em linhagens de melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto embrionário murino (NIH/3T3) por meio do ensaio colorimétrico de citotoxicidade de redução da resazurina à resofurina. Além de utilizar o DNA plasmidial siSTRIKE™ U6 *Hairpin Cloning System (Human)* – hMGFP como modelo na técnica de eletroforese em gel de agarose, no intuito de verificar a capacidade do complexo de interagir e clivar o DNA. Bem como, elucidar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo. Assim, foi possível notar que o complexo foi citotóxico para o melanoma B16-F10 (IC₅₀ = 3,89μM), interagiu e clivou o DNA plasmidial nas formas II (circular) e III (linear) na ausência e presença de peróxido de hidrogênio, além disso, induziu maior produção de ROS intracelular. Vale ressaltar que a citotoxicidade do DRI-12 foi seletiva para melanoma B16-F10 (IS=3,78). Portanto, fica evidente o potencial quimioterápico deste complexo, o que o torna um candidato promissor a agente antitumoral.

Palavras-chave: complexo de cobre(II), clivagem DNA, antitumoral.

Abstract

The continuous growth of cases and mortality rates by cancer makes it necessary to constantly search for ways to treat, cure and comfort individuals affected by the disease. The systemic approach is one of the essential ways in the treatment of neoplasms, with chemotherapy being the most frequently used protocol. With this in mind, there is a continuous search for complexes that are more selective and less toxic for the organism as a whole. Thus, the study of copper(II) metallocomplexes has had growing interest in their use as a potential antitumor activity, due to the advantages they offer, standing out in the literature for their redox activity and biocompatibility. Therefore, the present work aimed to evaluate the cytotoxic potential of copper(II) complex associated with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and 1,10-phenanthroline [Cu(4-FH)(phen)(ClO₄)₂] (DRI-12) in murine melanoma (B16-F10) and murine embryonic fibroblast (NIH/3T3) lineages by colorimetric assay of cytotoxicity of reduction of resazurin to resofurin. In addition to using the siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP plasmid DNA as a model in the agarose gel electrophoresis technique, in order to verify the ability of the complex to interact and cleave the DNA. As well as elucidating the production of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry. Thus, it was possible to note that the complex was cytotoxic to B16-F10 melanoma (IC₅₀ = 3.89 μM), interacted and cleaved plasmid DNA in forms II (circular) and III (linear) in the absence and presence of hydrogen peroxide, furthermore, it induced greater production of intracellular ROS. It is noteworthy that DRI-12 cytotoxicity was selective for B16-F10 melanoma (IS = 3.78). Therefore, the chemotherapeutic potential of this complex is evident, making it a promising candidate for an antitumor agent.

Keywords: copper(II) complex, DNA cleavage, antitumor

Lista de Figuras e Tabelas

- Figura 1.** Representação ilustrativa do ensaio colorimétrico de citotoxicidade por ensaio redução da resazurina à resofurina e diagrama esquema do plaqueamento utilizado. **A)** Imagem ilustrativa do ensaio colorimétrico exibindo a gradação de cores. Quanto mais roxo, menor metabolismo da resazurina e, portanto, menor viabilidade. Quanto mais rosa, maior a redução da resazurina (azul/roxo) à resofurina (vermelho/rosa) e conseqüentemente, maior a viabilidade. **B)** Esquema do plaqueamento utilizado para o tratamento na microplaca. Branco = apenas meio; C-: controle negativo, apenas meio e células; DRI-12: em diferentes concentrações com presença de células e meio; C+: controle positivo, meio, células e tratamento com cisplatina 100µM (Fonte: autoria própria). 10
- Figura 2.** Quantificação de ROS por citometria de fluxo. ns: estatisticamente não significativo. *p < 0,05. ***p < 0,001. Dados comparados ao Controle (Fonte: autoria própria). 15
- Figura 3.** Dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 *Hairpin Cloning System (Human)* – hMGFP). **A)** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento, onde: **1:** Marcador; **2:** Controle sem tratamento; **3:** DRI-12 (5µM); **4:** DRI-12 (20µM); **5:** DRI-12 (5µM) + DMSO; **6:** DRI-12 (20µM) + DMSO; **7:** *Nhe I*; **8:** H₂O₂ 15mM; **9:** DRI-12 (5µM) + H₂O₂ 15mM; **10:** DRI-12 (20µM) + H₂O₂ 15mM; **11:** DRI-12 (5µM) + H₂O₂ 15mM + DMSO; **12:** DRI-12 (20µM) + H₂O₂ 15mM + DMSO; **13:** 300mM H₂O₂. **B)** Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose. Dados expressos a partir da média ± desvio padrão de três ensaios. Análise estatística feita por 2way ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ^{ns} não significativo comparando com o controle sem tratamento (Fonte: autoria própria). 17
- Figura 4.** Representação esquemática do possível mecanismo de ação do complexo DRI-12 na molécula de DNA. A molécula de cobre em um ambiente contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por meio de uma reação do tipo Fenton, gera o radical hidroxila (*OH) que desencadeia a clivagem oxidativa de fitas simples ou duplas da molécula de DNA (Fonte: autoria própria). 23
- Tabela 1.** Concentração inibitória de 50% de células viáveis (IC₅₀) e índice de seletividade (IS) para o complexo nas 2 linhagens utilizadas, descritos como média ± desvio padrão. (Fonte: autoria própria). 14

Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de células viáveis (IC₅₀) do complexo DRI-12 em B16-F10 na presença e ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Valores descritos como média ± desvio padrão (Fonte: autoria própria). 15

Abreviaturas

4-FH: 4-ácido fluorofenoxiacético hidrazida

carboplatina: $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{cbdca})]$

cbdca: 1,1'-ciclobutanodicarboxilato

cisplatina: $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$

Cu: cobre

DCFH-DA - diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DO - densidade óptica

DRI-12: $[\text{Cu}(4\text{-FH})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]$

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

INCA: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar

IS - Índice de seletividade

NAC: N-acetilcisteína

OMS: Organização Mundial de Saúde

phen: 1,10-fenantrolina

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Características e epidemiologia do câncer.....	1
1.2.	Tratamentos do câncer.....	2
1.2.1.	Quimioterapia	3
1.3.	Complexos metálicos e o cobre	4
2.	OBJETIVOS	8
2.1.	Objetivo geral.....	8
2.2.	Objetivos específicos.....	8
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1.	Manutenção das linhagens <i>in vitro</i>	8
3.2.	Citotoxicidade por ensaio de resazurina (alamarBlue®).....	9
3.3.	Índice de seletividade (IS).....	11
3.4.	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo.....	11
3.5.	Transfecção, expansão e purificação do DNA plasmidial	12
3.6.	Ensaio de clivagem do DNA	13
3.7.	Análises estatísticas	13
4.	RESULTADOS.....	14
4.1.	Citotoxicidade do complexo DRI-12 pelo ensaio colorimétrico resazurina (alamarBlue®)	14
4.2.	Citotoxicidade do complexo DRI-12 em associação com N-acetilcisteína (NAC)	14
4.3.	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) associado a DRI-12 na ausência ou presença de N-acetilcisteína (NAC) em B16-F10.....	15
4.4.	Avaliação do potencial de clivagem do DRI-12 ao DNA plasmidial	16
5.	DISCUSSÃO.....	18
5.1.	Ensaio de citotoxicidade.....	18
5.2.	Influência das espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico*	20
5.3.	Interação e clivagem do DNA	22
6.	CONCLUSÃO	24
7.	REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características e epidemiologia do câncer

As células são as estruturas unitárias funcionais dos seres vivos, com capacidade de existência isolada – seres unicelulares – ou estabelecendo formas organizadas e complexas – pluricelulares – como é o caso do corpo humano (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). O crescimento e a reprodução são características fundamentais a maioria das células. Há um padrão cíclico, ordenado, que precede e estabelece a divisão celular. Em tecidos normais as células proliferam apenas quando necessário, desempenhando um sistema de controle do ciclo e morte celular (INCA, 2020).

Já as células cancerosas apresentam um crescimento diferente das células normais. O sistema de morte e controle do ciclo celular são contornados, de modo a garantir a continuidade da célula cancerosa e consequente proliferação. O descontrole na multiplicação e no ciclo celular ocorre devido às sucessivas mutações que afetam a célula e seus clones. Desse modo, as mutações geram nas células modificações que possibilitam a proliferação excessiva e independente dos processos fisiológicos de progressão. Portanto, o câncer representa um grande grupo de doenças que se caracterizam por apresentarem um acúmulo de mutações e devida plasticidade epigenética, o que as tornam aptas a garantir mecanismos como resistência a morte celular, capacidade de evadir do sistema imune, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos, invasão e metástase (FLAVAHAN; GASKELL; BERNSTEIN, 2017; FOSTER, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A proliferação incorreta das células, isto é, o crescimento exagerado e desordenado, é o que se denomina neoplasia. Esta, pode ainda ser diferenciada como benigna ou maligna. As formas benignas são quando as células se organizam em uma massa celular bem delimitada, não se desprendem dela e não invadem, portanto, os tecidos vizinhos. Porém a partir do momento que a invasão tecidual ocorre, este tumor torna-se de caráter maligno (MALTA *et al.*,

2018; SANCHEZ-VEGA *et al.*, 2018). A característica invasiva e a capacidade do câncer espalhar-se pelo corpo afetando órgãos vizinhos designam o que é chamado de metástase. A metástase, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, em inglês, *World Health Organization* – WHO), representa uma das principais causas de morte pelo câncer (WHO, 2020).

Ainda de acordo com a OMS, em 2018 havia cerca de 9,6 milhões de mortes devido ao câncer, representando a segunda principal causa de morte no mundo. Em 2020, a OMS, seguindo fontes de dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), indica que o câncer foi responsável por quase 10 milhões de mortes. No Brasil, conforme dados do GLOBOCAN, o número de casos novos em 2020, em ambos os sexos e todas as idades, foram mais de 590 mil, acarretando cerca de 260 mil mortes. Já o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) prevê, para cada ano do triênio 2020-2022, uma estimativa de desenvolvimento de 625 mil novos casos de câncer (GLOBOCAN, 2020; INCA, 2019; WHO, 2020).

1.2. Tratamentos do câncer

Os tratamentos para o câncer incluem diversas metodologias e drogas, bem como seu uso em conjunto. Os tratamentos podem atuar de maneira local ou sistemicamente. Os procedimentos locais incluem cirurgia e radioterapia para uma região delimitada no corpo, enquanto os tratamentos sistêmico podem afetar o organismo como todo e incluem a quimioterapia, imunoterapia, terapia direcionada, terapia hormonal e até mesmo o transplante de células-tronco – utilizado para suprir a necessidade de células da medula óssea que foram destruídas pela ação do câncer ou pelo efeito adverso do uso da quimioterapia e/ou radiação usada no tratamento do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Cerca de um terço dos indivíduos são curados apenas com o uso da cirurgia ou radioterapia quando o tumor permanece delimitado, sem indícios metastáticos, a tempo do

diagnóstico. Com o prenúncio da metástase, torna-se necessário investir em uma abordagem sistêmica para aumentar a eficácia do tratamento (CHU, 2018).

Para um tratamento eficiente, é importante que haja um diagnóstico precoce e adequado, uma vez que os padrões de tratamento irão depender de diversas variáveis, como o tipo, o estágio, as peculiaridades do câncer e o organismo do indivíduo em questão. Desse modo, o tratamento poderá fornecer maior possibilidade de cura e qualidade de vida a pessoa acometida (BAIRD; MEYERS; HU, 2018; CHU, 2018; DEGEORGE; HOLT; HODGES, 2017; INCA,2020; LAYKE; LOPEZ, 2004).

1.2.1. Quimioterapia

A quimioterapia faz parte da rotina de tratamento de diversos tipos de câncer, em diversos estágios, podendo ser combinado ou não a outros métodos como a cirurgia e radioterapia. A partir disso, a quimioterapia pode ser então usada com diversas finalidades, como a neoadjuvante, adjuvante, paliativa, curativa e no controle temporário da doença (BJÖRNMALM *et al.*, 2017; MAHVI *et al.*, 2018; MILLER *et al.*, 2019; ROMA-RODRIGUES *et al.*, 2019).

A terapia neoadjuvante atua no objetivo de reduzir os tumores localizados para torná-los ressecáveis – tumor pequeno que pode ser retirado por cirurgia – ou melhorar a situação do paciente. Já a adjuvante é indicada após o tratamento curativo, quando não há mais detecção de neoplasia maligna. O tratamento paliativo busca amenizar os sinais e sintomas, por tempo limitado, do indivíduo devido ao acometimento pelo câncer. A finalidade curativa ocorre com o intuito de curar indivíduos com neoplasias malignas onde será a abordagem terapêutica principal, sendo associado ou não a outros métodos como a cirurgia e a radioterapia por exemplo. Enquanto para o controle temporário da doença, devido a impossibilidade de cura, fornece uma maneira de aumentar a sobrevida do indivíduo doente (CHU, 2018; INCA, 2020).

Os agentes quimioterápicos funcionam em células alvo com uma alta taxa proliferativa, que é uma característica das células cancerosas. É recomendado que após a cirurgia ocorra o

uso de quimioterápico como uma forma adjuvante, de modo que o procedimento seja realizado para dissecar o tumor e a terapia adjuvante administrada tente eliminar quaisquer células cancerosas que não tenham sido removidas pela cirurgia e ainda possam se espalhar, bem como células tumorais circulantes. A maioria dos agentes quimioterápicos antitumorais apresentam toxicidade e necessitam de estudos prévios sobre sua atuação no organismo, seus efeitos adversos e sua eficácia para que possam ser utilizados com segurança (ANDRADE; SILVA, 2007; MARTÍNEZ-CAMPA *et al.*, 2017).

Apesar dos efeitos colaterais encontrados com o uso de quimioterápicos, esta abordagem terapêutica é a modalidade com maior taxa de cura de vários tumores, principalmente se tratando de estágios avançados, onde seu uso passa a ser mais necessário em virtude da estratégia de ação sistêmica. No tratamento de melanoma avançado, por exemplo, a quimioterapia é uma das primeiras opções viáveis. De acordo com Wilson e Schuchter (2016), o uso de adjuvantes e algumas combinações na busca de aprimorar as respostas clínicas, entretanto, não se mostraram eficientes em causar o aumento da sobrevida geral. Apesar das possibilidades de substituição aos tratamentos, a quimioterapia ainda é importante para o tratamento paliativo de melanomas refratários, progressivos e recorrentes (DOMINGUES *et al.*, 2018; WILSON; SCHUCHTER, 2016).

1.3. Complexos metálicos e o cobre

Os potenciais terapêuticos de compostos à base de metal são datados desde os tempos antigos. Desde então, os complexos metálicos, destacando-se principalmente os metais de transição, têm demonstrado características bem definidas e um potencial de atividade redução-oxidação (redox) natural (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

Em virtude da indispensabilidade dos quimioterápicos nos tratamentos do câncer, a demanda por compostos à base de metais no tratamento desta doença é crescente. Os efeitos citotóxicos *in vitro* demonstrados por compostos que se baseiam em metais têm sido

promissores, o que promove a busca por compostos que se liguem seletivamente ao alvo biomolecular, alterando o mecanismo de proliferação celular, ou seja, que possuam capacidade citostática. Tais compostos devem ser amplamente testados em relação às suas atividades biológicas (EBRAHIMIPOUR *et al.*, 2017; PAGES *et al.*, 2015).

Com as possibilidades de alterações moleculares e modificações da estrutura química de um composto, vários complexos químicos à base de metal inéditos podem ser sintetizados, tornando possível a prospecção de novas drogas com efeitos citotóxicos e farmacocinéticos mais seletivos e potentes. Portanto, tem-se buscado conjugar os compostos metálicos com moléculas promissoras e biocompatíveis para direcionar a distribuição da droga no organismo e aprimorar sua eficácia (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

O uso de complexos metálicos como quimioterápico já é bem conhecido desde o surgimento da cisplatina $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ e a carboplatina $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{cbdca})]$, (cbdca= 1,1'-ciclobutanodicarboxilato) e sua eficiência frente ao tratamento tumoral. O mecanismo de ação da cisplatina ocorre devido às interações entre o complexo com o DNA, formando adutos, causando interrupções do ciclo celular, direcionando as células ao processo apoptótico e conseqüentemente culminando neste efeito citotóxico. Entretanto, da mesma forma que o efeito citotóxico ocorre nas células tumorais, o mesmo pode ocorrer nas células saudáveis e levar a reações adversas. A cisplatina pode ser vinculada a vários efeitos colaterais, entre eles é possível ressaltar os sintomas de náusea, vômito, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade (ALDOSSARY, 2019; CAIRES *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2015).

A cisplatina surgiu como um guia para os compostos metálicos no tratamento das enfermidades neoplásicas, sendo usado amplamente em diversos tipos de câncer. Apesar das células tumorais desenvolverem resistência a essa droga, o mesmo foi vital para a contínua busca de novos compostos alternativos. Com isso, o desenvolvimento de novos fármacos à base de metais é indispensável para produzir tratamentos que apresentem o mínimo de reações

adversas, toxicidade seletiva, maior acessibilidade aos indivíduos e desempenho antineoplásico eficaz (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

Logo, com o interesse em quimioterápicos promissores à base de metais, o cobre apresenta características interessantes como sua essencialidade à maioria dos organismos aeróbicos. Além disso, possui atribuições como cofator estrutural de enzimas e o envolvimento em diversas atividades catalíticas e biológicas. Na busca por novos fármacos antitumorais capazes de superar as limitações dos já existentes, como efeitos adversos graves, toxicidade, resistência inerente e adquirida por parte das células tumorais, há um empenho crescente no estudo com biometais como o cobre (Cu), por serem biocompatíveis e menos tóxicos que os metais não-endógenos. Além disso, o cobre é um candidato atrativo e bem relatado na literatura, dada sua capacidade no tratamento de cânceres devido à sua biodisponibilidade e à observação de níveis elevados de cobre no microambiente tumoral (EBRAHIMIPOUR *et al.*, 2015; MONTAGNER *et al.*, 2015; PAGES *et al.*, 2015; SANDHAUS *et al.*, 2016; SEMISCH *et al.*, 2014).

O cobre como cofator é essencial para os processos de angiogênese induzidos pelo tumor. Além disso, pode desencadear a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células humanas. Estudos sobre as atividades biológicas de complexos de Cu(II) incluindo ligação ao DNA, clivagem desta molécula e atividades antimicrobianas foram extensivamente documentados na literatura. Os complexos de Cu(II) são considerados uma das melhores alternativas aos complexos de platina no âmbito da atividade antitumoral, principalmente devido à sua biocompatibilidade e funções significativas nos sistemas biológicos. Por exemplo, seu acúmulo nas células cancerosas devido à permeabilidade seletiva de suas membranas aos compostos de cobre (EBRAHIMIPOUR *et al.*, 2015; MONTAGNER *et al.*, 2015).

Complexos de cobre(II) demonstram maior atividade quando na presença de ligantes heterocíclicos, inclusive associados à 1,10-fenantrolina no tratamento antitumoral

(RODRIGUES *et al.*, 2020). O interesse em compostos que contenham ligantes N,N-heterocíclicos como a 1,10-fenantrolina e outros variantes derivados, surgiram devido ao fato de serem reconhecidos por facilitarem a intercalação com o DNA. Inúmeros complexos a partir de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{+2}$ com a capacidade de clivagem do DNA foram descritos (POLLONI *et al.*, 2019). Além da 1,10-fenantrolina ser usada como um doador N,N-heterocíclico também tem sido estudado o uso de derivados de hidrazidas, pois estas apresentam propriedades conhecidas como a capacidade de se coordenar a metais de transição e possuem certa atividade antibacteriana e antitumoral. Com isso, há diversas possibilidades para conjugações em complexos metálicos, tornando-os auspiciosos. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antitumoral do Cobre(II) associado à 4-ácido fluorofenoxiacético hidrazida e 1,10-fenantrolina $[\text{Cu}(4\text{-FH})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]$, genericamente chamado como DRI-12, sintetizado por nossos colaboradores (PAIXÃO *et al.*, 2017).

A viabilidade celular e os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são amplamente utilizados em testes de toxicidade de substâncias e na triagem de drogas em células alvo. Portanto, colaboram na avaliação da toxicidade do composto e no caso de pesquisas oncológicas, avalia a inibição do crescimento de células tumorais. São experimentos iniciais que fornecem uma maneira rápida, pouco onerosa e que não requer o uso de animais para o teste das amostras e avaliação preliminar (ASLANTÜRK, 2018).

Com isso, o presente trabalho avalia o potencial antitumoral do complexo DRI-12 por meio dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* com o uso das linhagens celulares de melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto embrionário murino (NIH/3T3), capacidade de interação e clivagem do DNA plasmidial e a sua capacidade de indução de ROS em células tumorais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar os mecanismos citotóxicos do complexo [Cu(4-FH)(phen)(ClO₄)₂] (DRI-12), bem como sua capacidade de induzir produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e interagir e clivar DNA plasmidial *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Examinar a atividade citotóxica do complexo de cobre(II) utilizando as linhagens B16-F10 e NIH/3T3;
- Determinar a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) do complexo de cobre(II) nas linhagens;
- Calcular o índice de seletividade do complexo (IS);
- Avaliar a influência do ROS na ação citotóxica do complexo ao comparar o tratamento em B16-F10 na presença e ausência de N-acetilcisteína (NAC) e quantificação de ROS por citometria de fluxo;
- Avaliar capacidade de interação e clivagem do DNA com uso do complexo de cobre(II), por meio de ensaio de degradação plasmidial, utilizando o plasmídeo siSTRIKE™ U6 *Hairpin Cloning System (Human)* – hMGFP;
- Avaliar a influência de ROS na interação e clivagem do DNA plasmidial pelo complexo;

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Manutenção das linhagens *in vitro*

As linhagens utilizadas foram as células de melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto embrionário murino (NIH/3T3). As linhagens foram cultivadas *in vitro*, em garrafas de cultura de volume 25cm², com meio RPMI-1640 (Gibco®, Paisley, UK) suplementado com 25mM HEPES, 2mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina (Sigma Chemical

Co.[®], St. Louis, USA) e 10% do volume de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab[®], 40, Campinas, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.2. Citotoxicidade por ensaio de resazurina (alamarBlue[®])

Os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos pelo método de redução da resazurina, um composto não tóxico, permeável as células e de coloração azul não fluorescente, que ao ser metabolizado pela célula é transformado a resofurina, composto de coloração vermelho-rosa e altamente fluorescente. O método seguiu-se de acordo com o protocolo do reagente alamarBlue[®]. As linhagens celulares (2 x 10⁴ células por poço) foram incubadas em 200 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 96 poços. Após adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo de cobre DRI-12 (100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4 e 1µM) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Ao término de 24 horas de tratamento, foi adicionado a cada poço da microplaca 20 µL do agente revelador alamarBlue[®], com leitura subsequente após o prazo de incubação (4 horas). Os experimentos foram realizados em quadruplicata técnica e duplicata biológica. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro em 570 e 600nm e as absorbâncias foram utilizadas na fórmula de cálculo da viabilidade celular.

A viabilidade celular foi calculada baseada nas densidades ópticas (DO) dos poços das monocamadas tratadas, comparadas com a DO média dos poços controle (células incubadas na ausência de tratamento) com o uso da seguinte fórmula:

$$V(\%) = \frac{(O1 \times Am1) - (O2 \times Am2)}{(O1 \times Mc1) - (O2 \times Mc2)} \times 100$$

Em que:

V(%) = Viabilidade celular em porcentagem;

O1 = 117216 (Coeficiente de extinção molar do alamarBlue[®] oxidado a 600nm);

Am1 = Densidade óptica dos poços com células tratadas a 570nm (incubadas com DRI-12) menos o valor da densidade óptica da média do branco;

O2 = 80586 (Coeficiente de extinção molar do alamarBlue[®] oxidado a 570nm);

Am2 = Densidade óptica dos poços com células tratadas a 600nm (incubadas com DRI-12) menos o valor da densidade óptica da média do branco;

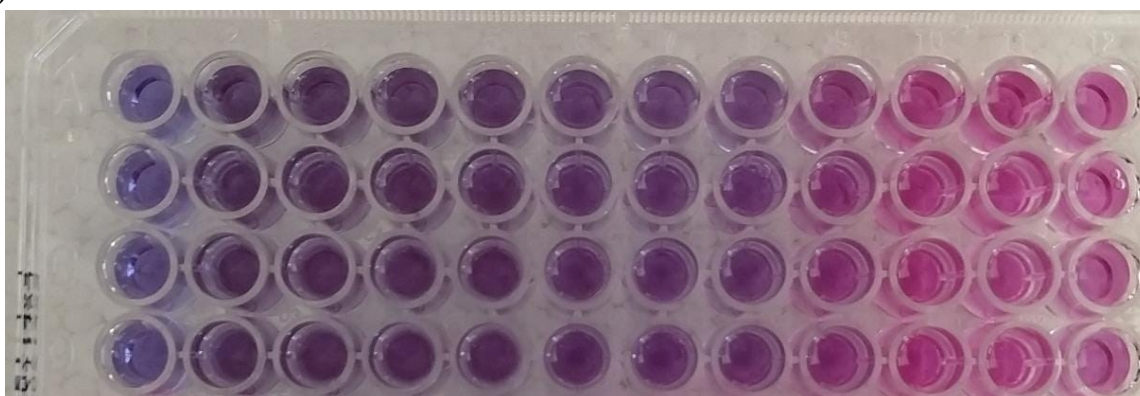
Mc1 = Densidade óptica média do controle negativo a 570nm menos o valor da densidade óptica da média do branco;

Mc2 = Densidade óptica média do controle negativo a 600nm menos o valor da densidade óptica da média do branco.

Os tratamentos aplicados nas microplacas apresentaram volume final de 200µL por poço contendo células quando necessário (exceção ao branco). Os tratamentos e suas respectivas concentrações foram dispostas da seguinte maneira (**Figura 1**).

Figura 1. Representação ilustrativa do ensaio colorimétrico de citotoxicidade por ensaio redução da resazurina à resofurina e diagrama esquema do plaqueamento utilizado. **A)** Imagem ilustrativa do ensaio colorimétrico exibindo a gradação de cores. Quanto mais roxo, menor metabolismo da resazurina e, portanto, menor viabilidade. Quanto mais rosa, maior a redução da resazurina (azul/roxo) à resofurina (vermelho/rosa) e conseqüentemente, maior a viabilidade. **B)** Esquema do plaqueamento utilizado para o tratamento na microplaca. Branco = apenas meio; C-: controle negativo, apenas meio e células; DRI-12: em diferentes concentrações com presença de células e meio; C+: controle positivo, meio, células e tratamento com cisplatina 100µM (Fonte: autoria própria).

A)



B)

	← DRI-12 →										
Branco	100µM	80µM	60µM	40µM	20µM	10µM	8µM	6µM	4µM	1µM	C+
Branco	100µM	80µM	60µM	40µM	20µM	10µM	8µM	6µM	4µM	1µM	C+
Branco	100µM	80µM	60µM	40µM	20µM	10µM	8µM	6µM	4µM	1µM	C+
Branco	100µM	80µM	60µM	40µM	20µM	10µM	8µM	6µM	4µM	1µM	C+
C-											
C-											
C-											
C-											

Também foi realizado experimento de viabilidade celular com o uso de N-acetilcisteína (NAC) na concentração de 5mM em B16-F10 para avaliar a ação do complexo mediante o uso de antioxidante e como as espécies reativas de oxigênio (ROS) afetaria a citotoxicidade do complexo.

Foi preparada uma solução estoque de NAC/Hepes (100mM e 100mM), diluído em meio RPMI 1640 completo e filtrado em filtros de seringa com membrana de 0,22 μ M. A partir da solução, foi realizado o co-tratamento do NAC (concentração final 5mM) com as concentrações de DRI-12 (100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4 e 1 μ M) e controle negativo (NAC, meio e células).

3.3. Índice de seletividade (IS)

O IS foi determinado a partir dos valores de concentrações necessárias para reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) obtidos após análise das linhagens tumorais e não tumoral. O foi então calculado pela fórmula:

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

Sendo considerado significativo um valor de $IS \geq 2$. O índice possibilitará a verificação da seletividade do complexo em estudo sobre as células tumorais (BADISA, *et al.*, 2009).

3.4. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo

Para quantificar a indução da geração de ROS pelo complexo, fez-se uso da marcação por diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) e em sequência, análise por citometria de fluxo. O tratamento das células com complexo DRI-12 foi feito em microplaca estéril de 24 poços utilizando a linhagem B16-F10 sendo alocadas 1×10^6 células por poço. Realizado em triplicata para cada situação experimental, as células foram tratadas por 24 horas com o complexo metálico a 2 μ M na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) nas concentrações 2,5mM, 5mM, 10mM e controle negativo (meio de cultura). Para a determinação dos gates na citometria de fluxo, foram utilizadas células não tratadas e não marcadas para que

fosse identificado a granulometria normal e autofluorescência características da linhagem de melanoma murino (B16-F10) e o controle tratado com peróxido de hidrogênio (100 μ M) foi marcado com diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, 20 μ M). As amostras foram então ressuspensas em solução contendo a sonda para marcação DCFH-DA (20 μ M) e mantidas a 37°C no escuro. Após a marcação as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e posteriormente o *pellet* foi ressuspensado em PBS 1X. Em seguida as amostras foram analisadas por citometria de fluxo Beckman Coulter CytoFLEX no canal FITC e os dados coletados foram analisados pelo *software* CytExpert 2.4 e GraphPad Prism 7.00.

3.5. Transfecção, expansão e purificação do DNA plasmidial

O plasmídeo siSTRIKE™ U6 *Hairpin Cloning System (Human)* – hMGFP foi transfectado para células eletrocompetentes (*E. coli* DH5 α). Uma alíquota de 1 μ L da reação de recombinação foi adicionada em 40 μ L de células DH5 α eletrocompetentes, previamente preparadas e alíquotadas. O DNA plasmidial a ser inserido foi adicionado junto a alíquota de reação e as células na cubeta de eletroporação previamente resfriada em gelo. O conjunto foi submetido ao pulso de 1,8kV/25 μ F (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Em sequência, rapidamente após a eletroporação, foram adicionados 1mL de meio LB líquido e as células foram ressuspensas. A suspensão de células transformadas foi transferida para um tubo de ensaio, incubando-se durante 40 minutos a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi distribuída uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de *petri* contendo meio LB sólido com antibiótico de seleção (concentração final de 100mg de ampicilina). As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 16-20 horas.

Uma das colônias isoladas da placa de *petri* foi selecionada aleatoriamente e adicionada em Erlenmeyer contendo 100mL de meio LB contendo o antibiótico de seleção (concentração final de 100 mg ampicilina) e incubadas a 37°C, sob agitação de 200rpm por 24 horas. Desses

modo a célula DH5 α foi adequadamente proliferada e conseqüentemente a quantidade de plasmídeo foi expandida para o experimento de degradação plasmidial. A extração do plasmídeo ocorreu de acordo com o protocolo presente no kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit.

3.6. Ensaio de clivagem do DNA

Para avaliar a capacidade do complexo de clivar o DNA, o complexo DRI-12 foi misturado com alíquotas de DNA plasmidial. A partir do plasmídeo extraído foram preparadas um conjunto de misturas (volume total de 20 μ L) contendo 30ng/ μ L do plasmídeo, e diferentes concentrações do complexo DRI-12 (5 e 20 μ M) em PBS 1X. O ensaio foi realizado na presença e ausência de dimetil sulfóxido (DMSO – 0,05%) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 15mM) ou na presença de ambos. O plasmídeo também foi avaliado na presença da enzima de restrição adequada (*NheI*), utilizada como controle de quebra das duas fitas do DNA. As misturas das reações foram incubadas a 37°C por 12 horas e posteriormente foram adicionados 5 μ L do tampão de carga (loader - 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 30% de glicerol, 10mM de EDTA). As amostras foram submetidas a eletroforese, em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,05% (10 μ g/mL) em tampão Tris-borato 90mM, pH 8,0, EDTA 20mM (0,5X TBE). O gel foi submetido a 80 volts por 3 horas e fotografado sob luz ultravioleta. A quantificação das bandas foi realizada pelo software ImageJ versão 1.53k (Java 1.8.0_172).

3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram performadas no programa GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Foram considerados estatisticamente significativos os dados em que *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Os IC₅₀ encontrados foram determinados com o uso da regressão não linear disponível, calculado a partir do logaritmo das concentrações testadas considerando intervalo de confiança de 95%. A

quantificação de ROS seguiu-se pela análise de variância one-way ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. Enquanto o ensaio de degradação plasmidial, foi realizado o teste two-way ANOVA mas também seguido de comparação múltipla de Dunnett.

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade do complexo DRI-12 pelo ensaio colorimétrico resazurina (alamarBlue®)

Os resultados de citotoxicidade foram obtidos a partir do ensaio colorimétrico de redução da resazurina (azul não fluorescente) à resofurina (vermelho-rosa altamente fluorescente) (alamarBlue®) devido ao metabolismo das células viáveis. Foram utilizadas duas linhagens, uma não tumoral e uma tumoral, NIH/3T3 e B16-F10 respectivamente. Após leitura de placas em espectrofotômetro e aplicação dos cálculos de viabilidade as análises indicaram que o tratamento com o DRI-12 acarretou em notória citotoxicidade na linhagem tumoral quando comparado a células não-tumorais. O índice de seletividade (IS) foi de 3,78 (**Tabela 1**), indicando que o complexo foi seletivo para as células tumorais B16-F10.

Tabela 1. Concentração inibitória de 50% de células viáveis (IC_{50}) e índice de seletividade (IS) para o complexo nas 2 linhagens utilizadas, descritos como média \pm desvio padrão. (Fonte: autoria própria).

Complexo	IC_{50} NIH/3T3	IC_{50} B16-F10	IS
DRI-12	14,68 μ M \pm 8,31	3,89 μ M \pm 2,18	3,78

4.2. Citotoxicidade do complexo DRI-12 em associação com N-acetilcisteína (NAC)

Para verificar a influência das espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico, o tratamento na linhagem B16-F10 com o complexo DRI-12 também foi realizado na presença de NAC (5mM), um antioxidante sequestrador de ROS. O co-tratamento com NAC resultou no aumento da concentração inibitória de 50% de células viáveis (IC_{50}), elevando em quase 100% a dose necessária do complexo na linhagem tumoral B16-F10 (**Tabela 2**).

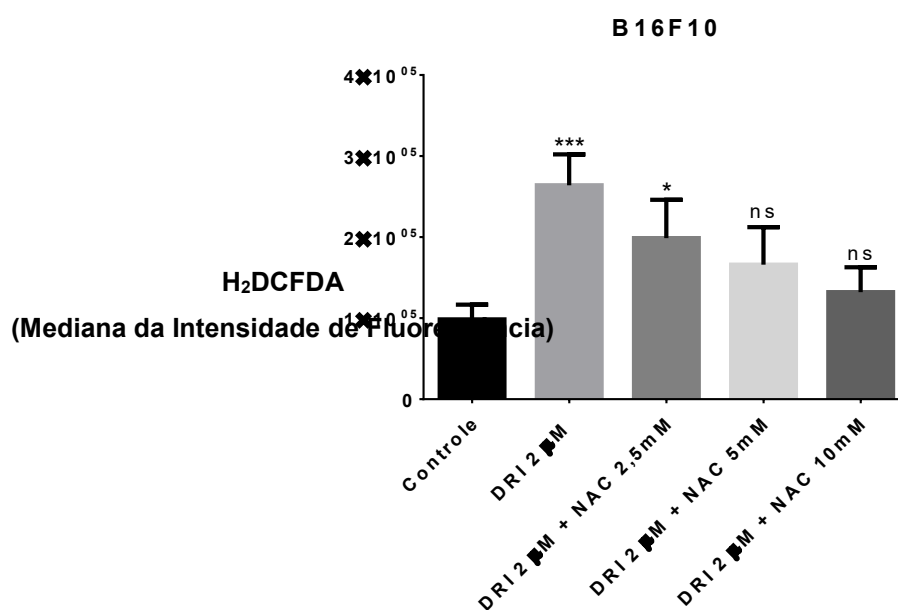
Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de células viáveis (IC₅₀) do complexo DRI-12 em B16-F10 na presença e ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Valores descritos como média ± desvio padrão (Fonte: autoria própria).

Complexo	IC ₅₀ B16-F10 + NAC	IC ₅₀ B16-F10	Razão
DRI-12	7,77µM ± 5,64	3,89µM ± 2,18	2,00

4.3. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) associado a DRI-12 na ausência ou presença de N-acetilcisteína (NAC) em B16-F10

A avaliação do potencial oxidante do complexo por citometria de fluxo mostrou que o mesmo induziu um aumento significativo na concentração de ROS intracelular em comparação com o controle negativo. Quando associado ao NAC, foi observada uma queda na produção de ROS intracelular induzido pelo DRI-12. À medida que a concentração de NAC aumentou, a detecção de ROS foi reduzida, sendo considerado estatisticamente não significativo a partir do uso das concentrações de NAC 5 e 10mM quando comparados ao controle (**Figura 2**).

Figura 2. Quantificação de ROS por citometria de fluxo. ns: estatisticamente não significativo. *p < 0,05. ***p < 0,001. Dados comparados ao Controle (Fonte: autoria própria).



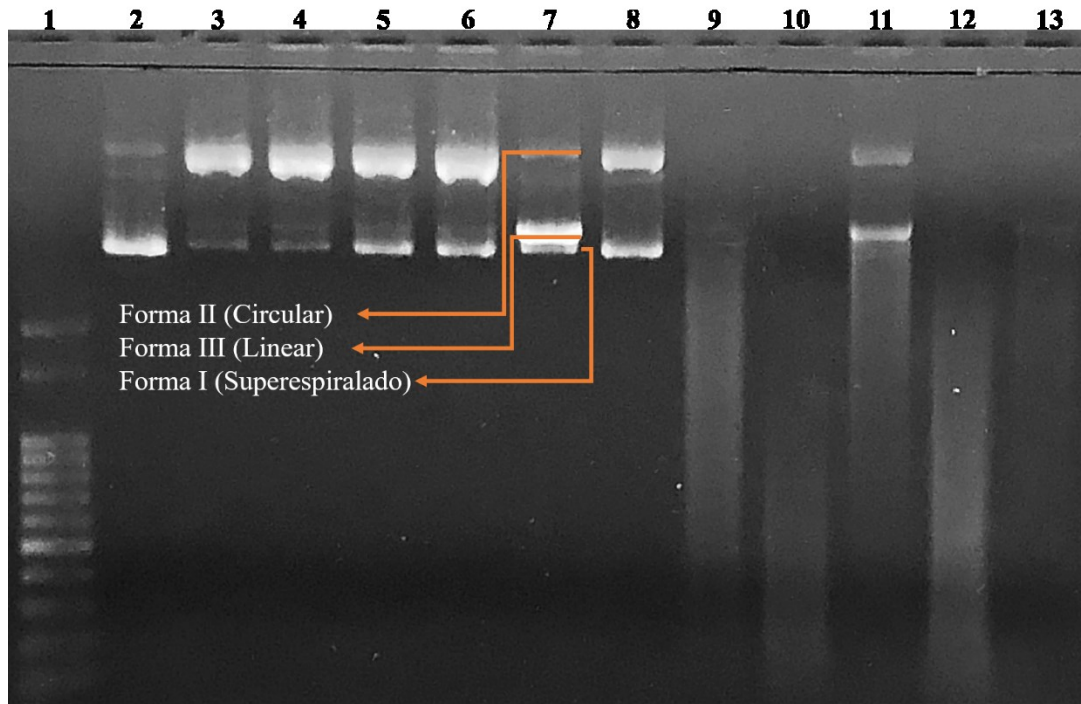
4.4. Avaliação do potencial de clivagem do DRI-12 ao DNA plasmidial

Após a eletroforese foi possível detectar no gel a presença de três padrões de bandas correspondentes às formas possíveis de se encontrar o DNA plasmidial (**Figura 3A**). A forma I (super espiralada) refere-se a forma mais compacta do plasmídeo, sem a presença de quebras nas fitas de DNA, o que torna mais fácil a migração pela malha do gel e por isso é indicada como a banda mais inferior encontrada no gel. A forma II é a estrutura com maior dificuldade de migração, uma vez que devido a quebras em uma das fitas, seja por ação física, enzimática ou química, torna a composição mais circular ou relaxada, sendo apontada como a banda mais superior do gel. Já a forma III, seria o resultado de um dano capaz de quebrar as duas fitas da molécula de DNA simultaneamente na mesma posição, como por exemplo a ação de uma enzima de restrição, o que faz com que o plasmídeo adquira uma conformação linearizada. Normalmente apresenta o padrão de banda entre as outras duas formas do plasmídeo, ou seja, com migração intermediária.

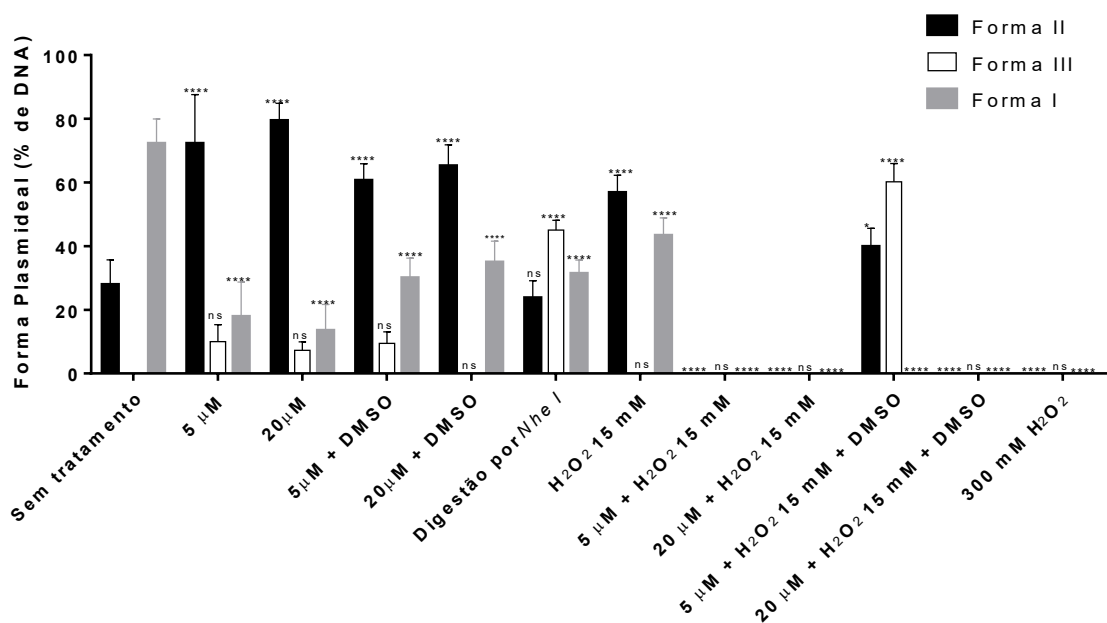
Foi possível observar, com o experimento, a capacidade do complexo interagir e causar quebras ao DNA (**Figura 3A e B**). O uso do complexo isoladamente induziu um aumento na intensidade da banda correspondente à forma plasmidial II (circular) a qual indica ocorrência de quebras simples na fita de DNA em todas as concentrações do complexo testadas (5 e 20 μ M) (**Figura 3A**, colunas 3 e 4) quando comparadas ao controle negativo (sem tratamento) (**Figura 3A**, coluna 2). Quando o complexo foi associado ao DMSO, que é um agente sequestrador de radical hidroxila (OH), observa-se um considerável aumento na intensidade da banda correspondente à forma I (super espiralada) que corresponde ao plasmídeo íntegro, acompanhado de uma redução da intensidade da banda correspondente à forma II, demonstrando a formação do radical hidroxila na reação (**Figura 3A**, colunas 5 e 6).

Figura 3. Dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 *Hairpin Cloning System (Human)* – hMGFP). **A)** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento, onde: 1: Marcador; 2: Controle sem tratamento; 3: DRI-12 (5µM); 4: DRI-12 (20µM); 5: DRI-12 (5µM) + DMSO; 6: DRI-12 (20µM) + DMSO; 7: *Nhe I*; 8: H₂O₂ 15mM; 9: DRI-12 (5µM) + H₂O₂ 15mM; 10: DRI-12 (20µM) + H₂O₂ 15mM; 11: DRI-12 (5µM) + H₂O₂ 15mM + DMSO; 12: DRI-12 (20µM) + H₂O₂ 15mM + DMSO; 13: 300mM H₂O₂. **B)** Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose. Dados expressos a partir da média ± desvio padrão de três ensaios. Análise estatística feita por 2way ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns não significativo comparando com o controle sem tratamento (Fonte: autoria própria).

A)



B)



Foi utilizada a enzima de restrição *Nhe I* como controle positivo para quebra dupla na fita de DNA, uma vez que o plasmídeo possui um sítio de restrição para essa enzima, observando-se eficiência na indução de uma banda intermediária com a forma plasmidial III (linear) (**Figura 3A**, coluna 7). O tratamento apenas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (15mM) teve como objetivo simular um ambiente oxidativo, o que por si só gerou aumento significativo na intensidade da banda correspondente à forma plasmidial II (circular) (**Figura 3A**, coluna 8).

Vale ressaltar que foi possível notar o surgimento de pequenas bandas referentes a forma III nos tratamentos que envolveram os complexos isolados (5 e 20µM) (**Figura 3A**, colunas 3 e 4) e na menor concentração (5µM) associada ao DMSO (**Figura 3A**, coluna 5), o que indica que o complexo também é capaz de induzir quebras duplas na fita de DNA.

Além disso, foi possível observar que o DRI-12 na presença de H₂O₂, que estimula as condições ideais para reação de Fenton, induziu a degradação completa do DNA plasmidial, fato este visualizado pela ausência de bandas de DNA no gel (**Figura 3A**, colunas 9 e 10). Interessantemente, na **Figura 3A**, coluna 11 podemos observar que na menor concentração utilizada do DRI-12 (5µM) na presença de H₂O₂ e DMSO induziu um aumento na intensidade da banda da forma II e III, que estavam ausentes quando o complexo nessa concentração foi utilizado apenas em associação com o peróxido. Desse modo, o uso do DMSO associado ao complexo exibiu determinada proteção aos danos de DNA.

5. DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de citotoxicidade

Retomando Aldossary (2019) e Ndagi, Mhlongo e Soliman (2017), é possível dizer que a cisplatina foi um marco para os quimioterápicos metalocomplexo. Seu estudo e eficácia no tratamento aos diversos tipos de câncer são bem descritos na literatura e conhecidos na atualidade, assim como os efeitos adversos que sua utilização impõe. Embora haja resistência

das células cancerosas aos tratamentos com cisplatina e outros medicamentos, foram essas limitações que impulsionaram a busca por novos compostos, alternativos e mais seletivos. Em virtude disso, o complexo de cobre(II) DRI-12 se apresenta como uma molécula em potencial para a continuidade em testes visando o tratamento tumoral por apresentar citotoxicidade seletiva, ou seja, maior efeito citotóxico em célula tumoral (B16-F10) do que em célula não-tumoral (NIH/3T3).

Não há muitos dados sobre a concentração inibitória de 50% das células viáveis (IC_{50}) do complexo de cobre(II) DRI-12, uma vez que se trata de um complexo recentemente sintetizado por nossos colaboradores. No entanto, o IC_{50} apresentado pelo complexo na linhagem B16-F10 foi semelhante a alguns dos complexos de cobre(II) contendo 1,10-fenantrolina de acordo com outros autores. Porém, também foi observado que comparado a outros complexos de cobre(II), de base schiff ou não, o IC_{50} foi menor (para alguns cerca de 4 a 10 vezes menor), demonstrando alto potencial citotóxico (ANUPAMA *et al.*, 2017; BORGES *et al.*, 2016; COLLINS *et al.*, 2000; HAMMUD *et al.*, 2020; MARUOKA *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2018).

Segundo Medeiros *et al.* (2018) o complexo $[Cu(phen)(van)_2]$ exibiu um mecanismo de ação dose-dependente efetivo contra B16-F10 e IC_{50} de $3,39\mu M$. De acordo com Hammud *et al.* (2020) o complexo Bis $[(\mu\text{-azido})\text{-chloro}\text{-}(1,10\text{-phenanthroline})\text{-copper(II)}]$ exibiu o IC_{50} médio entre as linhagens tumorais, incluindo a B16-F10, de $1,21\mu M$ e a cisplatina usada no estudo teve o IC_{50} médio avaliado em $16,3\mu M$. Desse modo, o complexo estudado no presente trabalho não só apresentou um IC_{50} semelhante ($3,89\mu M$) em B16-F10, como também revelou ser necessário uma concentração cerca de 4 vezes menor quando comparada a cisplatina para inibir 50% da viabilidade celular deste melanoma murino.

Os autores Anupama *et al.* (2017) apresentaram 2 complexos de base schiff. Os ensaios de citotoxicidade apresentaram, para o complexo 2 contendo 1,10-fenantrolina IC_{50} de $12,6\mu M$

enquanto o complexo 1 contendo 2,2-bipiridina, 5 μ M, sendo inclusive pelos autores, considerado próximo ao IC₅₀ de doxorubicina (2,5 μ M), que já é um fármaco de uso amplo na quimioterapia e foi atribuído como controle positivo. Portanto, é válido dizer que o complexo DRI-12 apresentou resultados semelhantes ao tratamento controle com doxorubicina em B16-F10.

Os complexos apresentados por Collins *et al.* (2000), Borges *et al.* (2016) e Maruoka *et al.* (2012), quando comparados ao IC₅₀ do DRI-12, necessitaram de concentrações de 4 a 10 vezes superior para desempenhar a inibição de 50% da viabilidade celular em B16-F10. Logo, o presente complexo possui um alto potencial citotóxico na linhagem, uma vez que apresenta baixo IC₅₀ e maior seletividade quando comparado a células normais.

A complexação do cobre a determinados ligantes pode favorecer e impulsionar o efeito citotóxico (COLLINS *et al.*, 2000). Hammud *et al.* (2020) também elucidam a possível citotoxicidade devido a capacidade das estruturas aromáticas de 1,10-fenantrolina do complexo atuarem como um ligante ativo que estabelece intercalação por ligações π - π com o DNA.

O IC₅₀ calculado para o complexo na linhagem de NIH/3T3 foi de 14,68 μ M e em B16-F10 3,89 μ M. O que resulta em uma seletividade quase 4 (3,78) vezes maior para ação citotóxica em células tumorais comparadas as células não tumorais. O que o torna um promissor candidato a quimioterápico.

5.2. Influência das espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico

Buscando avaliar a relação que o complexo DRI-12 estabelece com as ROS, o ensaio de citotoxicidade em B16-F10 foi realizado também na presença de um antioxidante com o interesse de observar como o complexo atuaria e como o IC₅₀ iria se comportar. O antioxidante utilizado foi a N-acetilcisteína (NAC). O NAC é um sequestrador de ROS, que apresenta propriedades antioxidantes, sejam elas direta ou indiretamente (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; HALASI *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2020).

De acordo com Aldini *et al.* (2018), a capacidade antioxidante do NAC pode estar associada a mecanismos envolvendo a ação antioxidante direta, uma vez que o NAC é um tiol e fonte de grupos sulfidril na células, sendo capaz de sequestrar as ROS. Pode-se também atribuir ao NAC um efeito antioxidante, indireto, devido a capacidade de atuar como precursor no ciclo de síntese da glutathione – atividade antioxidante já conhecida – e à outras enzimas com características antioxidantes. Além de também auxiliar na regulação do estado de redução-oxidação (ZAFARULLAH *et al.*, 2003).

Foi possível perceber que o IC₅₀ dobrou na presença do NAC. Tal resultado mostra a influência das ROS, bem como sugere que o mecanismo de morte celular esteja possivelmente associado a ação oxidante do complexo, uma vez que na presença do antioxidante, o IC₅₀ do complexo sob a linhagem tumoral aumentou.

Em um estudo anterior com complexo de cobre(II) ([Cu(dox)(phen)]²⁺), o NAC também fez com que o IC₅₀ em B16-F10 fosse elevado de 1,4 para 4,7 μM (LOPES *et al.*, 2020). Segundo dados de Ng *et al.* (2014), os complexos de cobre(II) exibiram propriedades antiproliferativas e indução apoptótica, além disso, foi sugerido que uma das possibilidades de seletividade do complexo fosse devido à capacidade de gerar altos níveis de ROS nas células tumorais comparado as células normais.

Logo, é possível que o complexo DRI-12 atue por meio de atividade de redução-oxidação (redox), uma vez que seu potencial citotóxico foi diminuído na presença de um antioxidante. Além disso, ao realizar a quantificação de ROS por citometria de fluxo, foi observada uma redução de ROS à medida que a concentração de NAC aumentava. O que reafirma a correlação da produção de ROS com o efeito citotóxico do complexo DRI-12.

5.3. Interação e clivagem do DNA

Considerando o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular e a citotoxicidade expressiva do complexo DRI-12, foi levantado se o estresse oxidativo gerado pelo complexo poderia ocasionar danos na molécula de DNA. Os dados obtidos a partir do experimento de clivagem plasmidial expuseram que o complexo DRI-12 se mostrou efetivo em gerar danos ao DNA, tendo esse efeito potencializado em um ambiente rico em radicais livres. Desse modo, é possível que o complexo interaja com o DNA e cause quebras por meio de ROS, via mecanismos de redução-oxidação (redox), o que vai de encontro ao já descrito por vários outros autores (ARANDA *et al.*, 2020; DARAVATH *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2019; HEINRICH; STUBBE; KULAK, 2018; POLLONI *et al.*, 2019; ŞENEL *et al.*, 2019; SIMUNKOVA *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2020; ZEHRA; ROISNEL; ARJMAND, 2019).

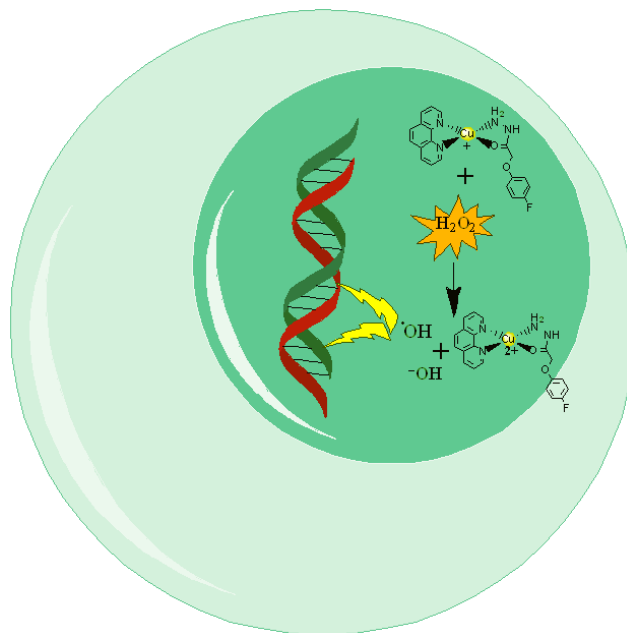
O Cobre associado a 1,10-fenantrolina descrito na literatura, exibe atividades dose-dependente e apresenta ter influência dos radicais livres, como as ROS, no seu possível mecanismo de ação. O que corrobora para que a via oxidativa seja responsável pelos danos ao DNA (POLLONI *et al.*, 2019). Souza *et al.* (2019) propõe que a capacidade de clivar o DNA por meio da via oxidativa seja controlada pelo tipo de N,N-doador ligado.

De acordo com Simunkova *et al.* (2019), complexos de cobre(II) associado a 1,10-fenantrolina demonstram atividade como nuclease – enzimas capazes de quebrar ligações entre nucleotídeos – química, isto é, gera danos ao DNA por meio da atividade redox. Essa atividade de nucleasse está relacionada com a capacidade dos complexos de cobre(II) atuarem por meio de um mecanismo de ciclagem redox que leva à geração de ROS, contribuindo assim para a indução de lesões ao DNA. Em ambientes oxidativos como na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (condições de estimulação da reação Fenton) os complexos de cobre(II) apresentaram dose-dependência na atividade nucleasse e total conversão da forma

superespiralada (forma I) para as formas linear (forma III) e circular (forma II). Além disso, corroborando com os nossos resultados, todos os complexos de cobre(II) estudados por esses autores também foram capazes de clivar o DNA plasmidial, mesmo na ausência de H_2O_2 . Neste caso, é sugerido que além da ciclagem redox, os complexos de cobre(II) associado a 1,10-fenantrolina também induzem quebras no DNA por mecanismo de intercalação, devido a presença do anel aromático planar na estrutura da fenantrolina.

Com base nessas informações, nós acreditamos que o complexo DRI-12 possui a ciclagem redox como possível mecanismo de ação relacionado aos danos no DNA, sendo a reação de Fenton uma das responsáveis pela geração de ROS, neste caso o radical hidroxil o qual desencadeia clivagem oxidativa ao DNA, podendo induzir quebras simples ou duplas as fitas do mesmo (**Figura 4**).

Figura 4. Representação esquemática do possível mecanismo de ação do complexo DRI-12 na molécula de DNA. A molécula de cobre em um ambiente contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por meio de uma reação do tipo Fenton, gera o radical hidroxila ($\cdot OH$) que desencadeia a clivagem oxidativa de fitas simples ou duplas da molécula de DNA (Fonte: autoria própria).



Experimentos conduzidos por Heinrich, Stubbe e Kulak (2018) também expõem a capacidade clivante de complexos de cobre(II) associado a fenantrolina sobre o DNA, mediada por mecanismo oxidativo ao usar ascorbato como agente redutor. Diversos complexos de

cobre(II) analisados por Singh *et al.* (2020) também exibiram efeitos quimioterápicos pela via oxidativa, hidrolítica, indução de alterações conformacionais na molécula de DNA e também pela indução de produção excessiva de ROS. Segundo os autores, estes mecanismos variam em virtude do comportamento redox flexível do cobre.

Şenel *et al.* (2019) utilizaram um meio contendo peróxido de hidrogênio como ativador dos complexos de cobre(II) testados em seus estudos e observaram indução de clivagem plasmidial, ao passo de que a adição de DMSO como um sequestrador de radicais hidroxil induziu a redução da atividade de nuclease dos complexos de cobre(II), sugerindo o envolvimento do radical hidroxil na via de danos ao DNA. Ressaltam também que a presença dos anéis aromáticos, como os exibidos na 1,10-fenantrolina, poderiam servir como parcial responsável pela interação entre o complexo e o plasmídeo. Dados que corroboram com os resultados obtidos em nosso trabalho com o complexo DRI-12.

Os complexos de cobre(II) fundamentados em base Schiff têm exibido dano oxidativo ao DNA e tem-se sugerido o mecanismo baseado em reação do tipo Fenton (ZEHRÁ; ROISNEL; ARJMAND, 2019). Segundo o estudo de Daravath *et al.* (2017), o complexo de cobre(II) de base schiff exibiu maior eficiência em causar quebras na forma I do plasmídeo pBR322 DNA comparado aos complexos de cobalto(II) e níquel(II).

6. CONCLUSÃO

O complexo $[\text{Cu}(4\text{-FH})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]$, genericamente chamado de DRI-12, apresentou atividade antitumoral *in vitro* satisfatória ($\text{IC}_{50} = 3,89\mu\text{M}$) e citotoxicidade seletiva para melanoma B16-F10 ($\text{IS} > 3$). Além disso, foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, o qual pode estar relacionado com possível mecanismo de ação citotóxica pelo fato do co-tratamento com N-acetilcisteína (NAC) exibir capacidade em reduzir o potencial citotóxico ($\text{IC}_{50} = 7,77\mu\text{M}$) e redução da produção de ROS intracelular do complexo DRI-12. O DRI-12 apresentou potencial intercalante/oxidante ao induzir quebra na fita simples

do DNA plasmidial na presença e ausência de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo visualizado predominantemente a forma circular (forma II) após tratamento com o mesmo. Desse modo, é possível que a via de redução-oxidação (redox) seja um dos mecanismos de ação do complexo metálico, porém o mesmo pode apresentar mecanismos de ação alternativos. Novos estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* poderão elucidar por completo os mecanismos de ação, mas os dados obtidos apontam que o DRI-12 é uma promissora pró-droga antitumoral.

7. REFERÊNCIAS

- ALDINI, G. et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free Radical Research**, v. 52, n. 7, p. 751–762, 3 jul. 2018.
- ALDOSSARY, S. A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 07–15, 28 mar. 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment Types**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. Acesso em: 23 set. 2021.
- ANDRADE, M. DE; SILVA, S. R. DA. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 3, p. 331–335, 2007.
- ANUPAMA, B. et al. Synthesis, Spectral Characterization, DNA/ Protein Binding, DNA Cleavage, Cytotoxicity, Antioxidative and Molecular Docking Studies of Cu(II) Complexes Containing Schiff Base-bpy/Phen Ligands. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 3, p. 953–965, maio 2017.
- ARANDA, E. E. et al. Heterobinuclear copper(II)-platinum(II) complexes with oxindolimine ligands: Interactions with DNA, and inhibition of kinase and alkaline phosphatase proteins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, p. 110863, fev. 2020.
- ASLANTÜRK, Ö. S. *In vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**. [s.l.] InTech, 2018.
- BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993–2996, ago. 2009.
- BAIRD, D. C.; MEYERS, G. J.; HU, J. S. Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 97, n. 4, p. 261–268, 15 fev. 2018.
- BJÖRNMALM, M. et al. Bridging Bio–Nano Science and Cancer Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, n. 10, p. 9594–9613, 24 out. 2017.
- BORGES, L. J. H. et al. *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, nov. 2016.
- CAIRES, A. C. F. et al. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 329–334, 1999.
- CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 1, p. 3.
- CHU, Edward. Cancer Chemotherapy: cancer treatment modalities. In: KATZUNG, Bertram G. et al (ed.). **Basic & Clinical Pharmacology**. 14. ed. New York, Chicago, San Francisco,

Athens, London, Madrid, Mexico, City Milan, New Delhi, Singapore, Sydney, Toronto: McGraw-Hill Education, 2018. p. 949-950. (A Lange medical book).

COLLINS, M. *et al.* Metal complexes as anticancer agents. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 3, n. 9, p. 453–457, set. 2000.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1–2, p. 49–72, jul. 2002.

DARAVATH, S. *et al.* Design, synthesis, spectral characterization, DNA interaction and biological activity studies of copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes of 6-amino benzothiazole derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1144, p. 147–158, set. 2017.

DE MEDEIROS, W. M. T. Q. *et al.* A vanillin-based copper(II) metal complex with a DNA-mediated apoptotic activity. **RSC Advances**, v. 8, n. 30, p. 16873–16886, 2018.

DE SOUZA, I. P. *et al.* Exploring the DNA binding, oxidative cleavage, and cytotoxic properties of new ternary copper(II) compounds containing 4-aminoantipyrine and N,N-heterocyclic co-ligands. **Journal of Molecular Structure**, v. 1178, p. 18–28, fev. 2019.

DEGEORGE, K. C.; HOLT, H. R.; HODGES, S. C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 96, n. 8, p. 507–514, 15 out. 2017.

DOMINGUES, B. *et al.* Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, jun. 2018.

EBRAHIMIPOUR, S. Y. *et al.* Synthesis and structure elucidation of novel salophen-based dioxouranium(VI) complexes: In-vitro and in-silico studies of their DNA/BSA-binding properties and anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 172–186, 2017.

EBRAHIMIPOUR, S. Y. *et al.* A novel cationic copper(II) Schiff base complex: Synthesis, characterization, crystal structure, electrochemical evaluation, anti-cancer activity, and preparation of its metal oxide nanoparticles. **Inorganica Chimica Acta**, v. 430, n. li, p. 245–252, 2015.

FLAVAHAN, W. A.; GASKELL, E.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science**, v. 357, n. 6348, p. eaal2380, 21 jul. 2017.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144–149, 1 maio 2008.

HAMMUD, H. H. *et al.* Structure, DFT studies, magnetism and biological activity of bis[(μ-azido)-chloro-(1,10-phenanthroline)-copper(II)] complex. **Inorganica Chimica Acta**, v. 506, p. 119533, jun. 2020.

HALASI, M. *et al.* ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 454, n. 2, p. 201–208, 1 set. 2013.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HEINRICH, J.; STUBBE, J.; KULAK, N. Cu(II) complexes with hydrazone-functionalized phenanthrolines as self-activating metallonucleases. **Inorganica Chimica Acta**, v. 481, p. 79–86, set. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Câncer e crescimento celular. *In: ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer* / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. ed. rev. atual. [Rio de Janeiro, RJ]: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/abc-do-cancer-abordagens-basicas-para-o-controle-do-cancer> Acesso em: 23 set. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [Rio de Janeiro, RJ]: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil> Acesso em: 23 set. 2021.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, Jose. Introdução: Visão Panorâmica sobre a Estrutura, as Funções e a Evolução das Células. In: JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; LAYKE, J. C.; LOPEZ, P. P. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. **American Family Physician**, v. 69, n. 5, p. 1133–1140, 1 mar. 2004.

LIU, H.; LV, L.; YANG, K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 3, p. 880–93, 2015.

LOPES, J. C. *et al.* In vitro and in vivo antitumoral activity of a ternary copper (II) complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 4, p. 1021–1026, dez. 2020.

MAHVI, D. A. *et al.* Local Cancer Recurrence: The Realities, Challenges, and Opportunities for New Therapies: XXXX. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 488–505, nov. 2018.

MALTA, T. M. *et al.* Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 338–354.e15, 2018.

MARTÍNEZ-CAMPA, C. *et al.* What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer. **Oncology Letters**, v. 13, n. 4, p. 2003–2014, 2017.

MARUOKA, H. *et al.* Synthesis and Biological Activity of Some New Pyrazole Copper(II) Complexes: Synthesis and Biological Activity of Some New Pyrazole Copper(II) Complexes. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 1218–1223, set. 2012.

MILLER, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, set. 2019.

MONTAGNER, D. *et al.* 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.

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

NG, C. H. *et al.* Selective anticancer copper(II)-mixed ligand complexes: targeting of ROS and proteasomes. **Metallomics**, v. 6, n. 4, p. 892–906, 2014.

PAGES, B. J. *et al.* Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505–3526, 2015.

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, p. 138–146, jul. 2017.

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 & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108586, abr. 2019.

RODRIGUES, J. A. O. *et al.* Copper(II):phenanthroline complexes with l-asparagine and l-methionine: Synthesis, crystal structure and in-vitro cytotoxic effects on prostate, breast and melanoma cancer cells. **Polyhedron**, v. 191, p. 114807, nov. 2020.

ROMA-RODRIGUES, C. *et al.* Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 840, 15 fev. 2019.

SANCHEZ-VEGA, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 321–337. e10, 2018.

SANDHAUS, S. *et al.* A novel copper(II) complex identified as a potent drug against colorectal and breast cancer cells and as a poison inhibitor for human topoisomerase II α . **Inorganic Chemistry Communications**, v. 64, p. 45–49, 2016.

SEMISCH, A. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: Role of solubility and intracellular bioavailability. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2014.

ŞENEL, P. *et al.* Methyl substituent effect on one-dimensional copper(II) coordination polymers containing biologically active ligands: Synthesis, characterization, DNA interactions and cytotoxicities. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 10, out. 2019.

SIMUNKOVA, M. *et al.* Redox-cycling and intercalating properties of novel mixed copper(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs tolfenamic, mefenamic and flufenamic acids and phenanthroline functionality: Structure, SOD-mimetic activity, interaction with albumin, DNA damage study and anticancer activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 194, p. 97–113, maio 2019.

SINGH, N. K. *et al.* Anticancer potency of copper(II) complexes of thiosemicarbazones. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 210, p. 111134, set. 2020.

The Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). **All cancers**. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 23 set. 2021.

The Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). **Brazil**. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>. Acesso em: 23 set. 2021.

WILSON, M. A.; SCHUCHTER, L. M. Chemotherapy for Melanoma. In: KAUFMAN, H. L.; MEHNERT, J. M. (Eds.). . **Melanoma**. Cancer Treatment and Research. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 167p. 209–229.

World Health Organization (WHO). **Cancer**: Overview. 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 23 set. 2021.

ZAFARULLAH, M. *et al.* Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 60, n. 1, p. 6–20, 1 jan. 2003.

ZEHRA, S.; ROISNEL, T.; ARJMAND, F. Enantiomeric Amino Acid Schiff Base Copper(II) Complexes as a New Class of RNA-Targeted Metallo-Intercalators: Single X-ray Crystal Structural Details, Comparative *in vitro* DNA/RNA Binding Profile, Cleavage, and Cytotoxicity. **ACS Omega**, v. 4, n. 4, p. 7691–7705, 30 abr. 2019.