

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DEYSSE CARLA TOLENTINO BARROS

**INTERAÇÕES MOLECULARES E EFEITOS CELULARES DE NOVOS
COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE SOBRE CÉLULAS TUMORAIS
PROSTÁTICAS**

PATOS DE MINAS

2021

DEYSSE CARLA TOLENTINO BARROS

**INTERAÇÕES MOLECULARES E EFEITOS CELULARES DE NOVOS
COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE SOBRE CÉLULAS TUMORAIS
PROSTÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS

2021

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

B277 2021	<p>Barros, Deysse Carla Tolentino, 1989- Interações moleculares e efeitos celulares de novos complexos metálicos de cobre sobre células tumorais prostáticas [recurso eletrônico] / Deysse Carla Tolentino Barros. - 2021.</p> <p>Orientador: Robson José de Oliveira Júnior. Coorientadora: Thaise Gonçalves de Araújo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.54 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biotecnologia. I. Júnior, Robson José de Oliveira ,1984-, (Orient.). II. Araújo, Thaise Gonçalves de,1984-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 60</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Av. Getúlio Vargas, 230, 3º andar, Sala 308 - Bairro Centro, Patos de Minas-MG,
CEP 38700-128
Telefone: (34) 3823-3714 - Ramal 39 - www.ppgbiotec.ibtec.ufu.br -
ppgbiotec@ibtec.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	28 de dezembro de 2021	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:40
Matrícula do Discente:	41912BTC008				
Nome do Discente:	Deysse Carla Tolentino Barros				
Título do Trabalho:	Interações moleculares e efeitos celulares de novos complexos metálicos de cobre sobre células tumorais prostáticas				
Área de concentração:	Biotecnologia				
Linha de pesquisa:	Prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização da atividade citotóxica e/ou genotóxica e antitumoral de moléculas biotivas naturais e sintéticas				

Reuniu-se por Webconferência, Campus Patos de Minas, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Dra. Luciana Machado Bastos, Dra. Emilia Rezende Vaz e Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior, orientador da candidata. A reunião aconteceu pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz 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.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robson José de Oliveira Junior, Presidente**, em 28/12/2021, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Machado Bastos, Membro de Comissão**, em 28/12/2021, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emília Rezende Vaz, Usuário Externo**, em 28/12/2021, às 16:46, 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 **3281252** e o código CRC **C905ACAA**.

Referência: Processo nº 23117.089400/2021-87

SEI nº 3281252

Aos meus pais, Dener e Cleuza, por todo amor, dedicação e ensinamentos. A minha filha amada, minha princesa, luz e alegria dos meus dias. E também ao meu esposo e companheiro de todas as horas que sempre me apoiou. Para que este trabalho pudesse ser realizado, tiveram que suportar minha ausência em tantos momentos.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida, por suas bênçãos, proteção, pela saúde, pela força e coragem para superar os obstáculos dessa longa jornada acadêmica. Sem Ele seria impossível alcançar esse objetivo e ao mesmo tempo executar meus deveres de mãe, esposa, filha, irmã e profissionais.

Aos meus pais, Dener e Cleuza, meu irmão Dener, minha filha Isabella, meu esposo José Wilton e aos familiares pelo apoio e paciência ao longo desses quase três anos.

Ao professor e orientador Dr. Robson José de Oliveira Júnior, obrigada pela oportunidade, confiança, competência profissional e ensinamentos.

À minha co-orientadora professora Dra. Thaise Gonçalves de Araújo pela sua experiência, paciência, ensinamentos e por ter me acompanhado desde o início dos experimentos. Sempre me lembrarei de uma frase dita por você: “Não existe mestrado sem choro”. Essas palavras me fizeram levantar após cada queda e obstáculo, para seguir em frente e chegar ao objetivo final deste trabalho. Que Deus te abençoe, te proteja, te ilumine e lhe conceda muita saúde, afinal, você possui muitos filhos na UFU.

À minha colega de laboratório e amiga Dayanne. Serei eternamente grata à sua amizade, a todos ensinamentos, paciência e compartilhamento de horas de trabalho em experimentos, angústias, histórias e objetivos. Admiro sua inteligência e dedicação em tudo que faz. Você merece tudo que há de melhor! Que Deus te abençoe, te proteja e te ilumine para concluir o mestrado e conquistar todos os objetivos de sua vida!

Aos colegas do grupo GBio pelo compartilhamento acadêmico, auxílio em experimentos, ensinamentos e por sanarem minhas dúvidas diversas vezes.

E a todas às pessoas que de alguma forma me apoiaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Minha sincera gratidão!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis” - José de Alencar.

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP), mundialmente e no Brasil, é a segunda causa de morte por câncer em homens. O tratamento dos casos avançados é baseado no uso de quimioterápicos, os quais carecem de especificidade, ao causarem efeitos colaterais indesejáveis, e de eficácia, devido aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais. Complexos de cobre são agentes terapêuticos antitumorais promissores, uma vez que suas propriedades farmacológicas podem ser ajustadas com a alteração da natureza dos átomos do ligante e do doador. Apresentam atividade antitumoral, intercalando no DNA, promovendo o estresse oxidativo e induzindo a apoptose. Nesse estudo, objetivamos avaliar os efeitos celulares de dois complexos metálicos de cobre sobre as linhagens prostáticas PNT-2 (não tumorigênica), LNCaP (CaP hormônio-responsiva) e PC-3 (CaP resistente a castração - CRPC). A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT e a capacidade de interação com o DNA foi predita *in silico* por *docking* molecular. O ensaio de degradação de DNA plasmidial foi usado para verificar a capacidade dos complexos de interagir e clivar o material genético. Em seguida, os níveis de expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e Ciclina D1 foram analisados por citometria de fluxo na linhagem LNCaP após o tratamento com os Complexos 1 e 2 no período de 48h. Os resultados indicaram que os complexos apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens tumorais sendo seletivos às células LNCaP. A análise *in silico* revelou a possibilidade de os complexos apresentarem afinidade com o DNA. Verificou-se preferência de ligação pelo sulco menor e a ordem crescente dos compostos ancorados com melhor pontuação foi 1>2. Estes clivaram o DNA plasmidial induzindo a forma II (circular) no gel. Contudo, na presença de H₂O₂, apenas o Complexo 1 promoveu clivagem nas duas fitas do DNA plasmidial (forma III ou linear). Além disso, os resultados obtidos demonstraram que o Complexo 1 foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de expressão de Ki-67 e Ciclina D1, inibindo a proliferação celular na linhagem tumoral hormônio-responsiva. Por outro lado, o Complexo 2 foi capaz de reduzir somente a expressão de Ciclina D1. Portanto, nossos resultados sugerem que os Complexo 1 e 2 possuem potencial quimioterapêutico, o que os tornam promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais para o tratamento do CaP.

Palavras-chave: Câncer de Próstata. Complexos de cobre. Quimioterapia. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Prostate Cancer (PCa) is the second leading cause of cancer death in men worldwide and in Brazil. The treatment of advanced cases is based on the use of chemotherapeutic drugs, which lack specificity, as they cause undesirable side effects, and efficacy, due to resistance mechanisms developed by tumor cells. Copper complexes are promising antitumor therapeutic agents, since their pharmacological properties can be optimized by changing the nature of the ligand and donor atoms. They exhibit antitumor activity by intercalating into DNA, promoting oxidative stress, and inducing apoptosis. In this study, we aimed to evaluate the cellular effects of two copper metal complexes on the prostatic lineages PNT-2 (non-tumorigenic), LNCaP (hormone-responsive PCa) and PC-3 (castration-resistant PCa - CRPC). Cell viability was assessed by MTT method and the ability to interact with DNA was predicted in silico by molecular docking. The plasmid DNA degradation assay was used to verify the ability of the complexes to interact and cleave the genetic material. Then, the expression levels of cell proliferation markers Ki-67 and Cyclin D1 were analyzed by flow cytometry in the LNCaP lineage, after treatment with Complexes 1 and 2 within 48h. The results indicated that the complexes showed cytotoxic activity against the tumor cell lines and were selective for LNCaP cells. The in silico analysis revealed the possibility that the complexes present affinity with DNA. Binding preference was found for the minor groove and the ascending order of the best scoring anchored compounds was 1>2. The complexes cleaved the plasmid DNA inducing form II (circular) on the gel. However, in the presence of H₂O₂, only Complex 1 promoted cleavage in both strands of plasmid DNA (form III or linear). Furthermore, the results obtained demonstrated that Complex 1 significantly reduced the expression levels of Ki-67 and Cyclin D1, inhibiting cell proliferation in the hormone-responsive tumor lineage. On the other hand, Complex 2 was able to reduce only the expression of Cyclin D1. Therefore, our results suggest that Complexes 1 and 2 have chemotherapeutic potential, which makes them promising for the development of new antitumor drugs for the treatment of PCa.

Keywords: Prostate Cancer. Copper complexes. Chemotherapy. Cytotoxicity.

Abreviaturas e Siglas

anti-IgG = Anticorpos do tipo imunoglobulina G

bipy = 2,2'bipiridina

°C = Graus Celsius

CaP = Câncer de Próstata

CDK = Proteínas quinases serina/treonina

CO₂ = Dióxido de Carbono

Complexo 1 = ácido 4-fluorofenoxiacético hidrazida(1,10-Fenantrolina)-bis(perclorato) cobre(II)

Complexo 2 = 4-nitrobenzidrazida(1,10-Fenantrolina)-bis(perclorato) cobre(II) monohidratado

CRPC = Câncer de Próstata resistente à castração

Cu = Cobre

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DMSO = Dimetilsulfóxido

DOC = Docetaxel

EGF = Fator de Crescimento Epidérmico

EROs = Espécies reativas de oxigênio

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

G1 = Fase do ciclo celular - síntese de pré-DNA,

G2 = Fase do ciclo celular - crescimento celular

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

HPB = Hiperplasia prostática benigna

IC₅₀ = concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle

INCA = Instituto Nacional do Câncer

IS = Índice de seletividade

Ki-67 = Nucleoproteína relacionada à síntese de RNA ribossômico

LNCaP = Linhagem Celular de Câncer de Próstata hormônio-responsiva

M = Fase do ciclo celular - mitose

mCRPC = Carcinoma de Próstata Metastático Resistente a Castração

μL = Microlitros

μM = Micro Molar

μg/mL = Micrograma por mililitro

mL = Mililitros

M.M = Massa Molar

MTT = teste de 3- (4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina

ng = Nanograma

NheI = Enzima de restrição

nm = Nanômetro

*OH = Radicais hidroxila

OMS = Organização Mundial da Saúde

PAP = Fosfatase Ácida Prostática

PBS = Solução Salina Tamponada de Fosfato

PC-3 = Linhagem Celular de Câncer de Próstata hormônio-refratária

PE = Fluorocromo

phen = 1,10-fenantrolina

PNT-2 = Linhagem Celular de Câncer de Próstata não tumorigênica

% = Porcentagem

PSA = Antígeno Prostático Específico

4-FH = 4-fluorofenoxiacético hidrazida

4-NH = 4-nitrobenzidrazida

rpm = Rotação por Minuto

S = Fase do ciclo celular - síntese de DNA

RPMI-1640 = Meio de Cultura Celular Roswell Park Memorial Institute medium

3D = Espaço Tridimensional

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	11
CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO	12
1. A glândula prostática.....	12
2. Câncer: definição e dados epidemiológicos	13
3. Câncer de Próstata (CaP)	15
3.1. Incidência	15
3.2. Fatores de risco	16
3.3. Diagnóstico, estadiamento e tratamento	17
4. Quimioterápicos e suas limitações	21
5. Complexos de cobre para o tratamento oncológico.....	22
6. Modelagem Molecular.....	26
7. Material e Métodos.....	27
7.1 Obtenção dos complexos metálicos.....	27
7.2. Cultivo celular	27
7.3 Ensaio de redução do MTT.....	28
7.4. Estudos de <i>Docking</i> Molecular.....	29
7.5. Ensaio de degradação de DNA plasmidial.....	30
7.6. Marcações em citometria de fluxo.....	30
8. Análises estatísticas.....	31
9. Resultados e discussão	31
9.1. Viabilidade celular, valores de IC50 e IS	31
9.2. <i>Docking</i> molecular com os complexos de cobre(II).....	35
9.3. Avaliação do potencial dos Complexos 1 e 2 em clivar DNA plasmidial	38
9.4. Marcadores de proliferação celular – Ki-67 e Ciclina D1	42
10. Conclusão.....	45
REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, responsável por mais de 9 milhões de óbitos em 2018 (OPAS/OMS, 2020). Nas Américas, conforme dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em fevereiro de 2020, 3,8 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer, com 1,4 milhão de mortes em 2018 (OPAS/OMS, 2020). No Brasil, em 2019, foram registrados 15.983 óbitos, por câncer de próstata (CaP), valor correspondente ao risco de 13,1% a cada 100 mil homens. Calcula-se, em média, mais de 600.000 casos novos de câncer em cada ano do triênio 2020-2022, sendo que o CaP será o segundo mais incidente, com 66.000 diagnósticos (INCA, 2021).

Os hormônios esteroides e seu metabólito ativo 5 α -Dihidrotestosterona são responsáveis por controlarem a progressão do CaP, estimulando a sinalização do receptor de andrógeno (AR) nas células transformadas, o qual controla a transcrição de genes que regulam diferentes vias de sinalização. A estratégia farmacológica utilizada na doença localmente avançada e metastática é a quimioterapia e a terapia de privação de andrógenos (ADT). Nesta são utilizados tratamentos no intuito de diminuir os níveis de hormônios por meio da castração cirúrgica ou química. A ADT controla a progressão da doença, porém, após 2 a 3 anos, os tumores podem resistir à terapia, o que caracteriza o CaP resistente à castração (CRPC) (MUNKLEY et al., 2019; LU et al., 2020; ONCOGUIA, 2020). De fato, cerca de 10% a 20% dos cânceres prostáticos refratam para CRPC e 84% dos recém diagnosticados com CRPC apresentam metástases. Assim, a sobrevida desses pacientes varia entre 15 a 36 meses (WADE; KYPRIANOU, 2018).

A quimioterapia desempenha papel crucial no tratamento do CaP, especialmente o metastático. Contudo, debilita os pacientes devido aos efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e imunodeficiência, comprometendo a eficácia terapêutica (ONCOGUIA, 2020). Além disso, a resistência à ADT e à quimioterapia se torna um grande desafio no tratamento dos pacientes (WADE; KYPRIANOU, 2018). Nesse quadro são descritos mecanismos intrínsecos ou adquiridos de resistência. No intrínseco, não há resposta a partir do primeiro ciclo, uma vez que os fatores que medeiam a resistência já se encontram presentes nas células tumorais (ALTSCHULER; STOCKERT; KYPRIANOU, 2021). Por outro lado,

quando adquirido, as células tumorais sofrem alterações moleculares para se adaptarem, evoluindo para uma doença grave e, em geral, letal (LIM; MA, 2019).

Portanto, o desenvolvimento de protótipos antitumorais seletivos e menos tóxicos é essencial para o tratamento de tumores, sendo imprescindível o desenvolvimento de novos medicamentos que possibilitem o tratamento efetivo dos pacientes. O cobre, um oligoelemento, é encontrado em todos os organismos vivos, participando de reações de oxirredução. Possui papel importante para a função de enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo energético, na respiração e síntese de DNA, como citocromo oxidase, superóxido dismutase, ascorbato oxidase e tirosinase (TISATO et al., 2010). Complexos de cobre vêm sendo explorados com o intuito de melhor caracterizar suas propriedades físicas, químicas e biológicas (SILVA et al., 2011; LOPES et al., 2018; RUTA et al., 2021). Seu uso é justificado pelo cobre ser um metal endógeno essencial ao organismo, o que pode reduzir os efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, como o metal é importante em diferentes vias metabólicas e estas encontram-se hiperativadas em células transformadas, seu influxo é favorecido em tumores, o que pode aumentar sua biodisponibilização (TISATO et al., 2010; CATER et al., 2013; SAFI et al., 2014). Complexos de cobre têm a capacidade de clivar a molécula de DNA, inibir a proliferação e o proteassoma, além de induzir a apoptose celular (CROSS et al., 2018; PELLEI et al., 2020).

Paixão e colaboradores (2017) sintetizaram, previamente, dois complexos ternários de cobre, quais sejam Complexo 1 e Complexo 2, a fim de serem avaliados quanto à sua atividade antitumoral. Considerando as atividades biológicas já descritas para protótipos de cobre por nosso grupo de pesquisa (POLLONI et al., 2019; LIMA, 2019; MACHADO, 2019; BONTEMPO, 2020;), hipotetizamos que estes complexos sejam citotóxicos e seletivos a linhagens celulares de CaP, sobretudo a do modelo de CRPC abrindo novos caminhos para o tratamento oncológico.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de dois complexos de cobre de interferirem em mecanismos tumorigênicos em linhagens celulares prostáticas e de interagirem com o DNA.

Objetivos Específicos

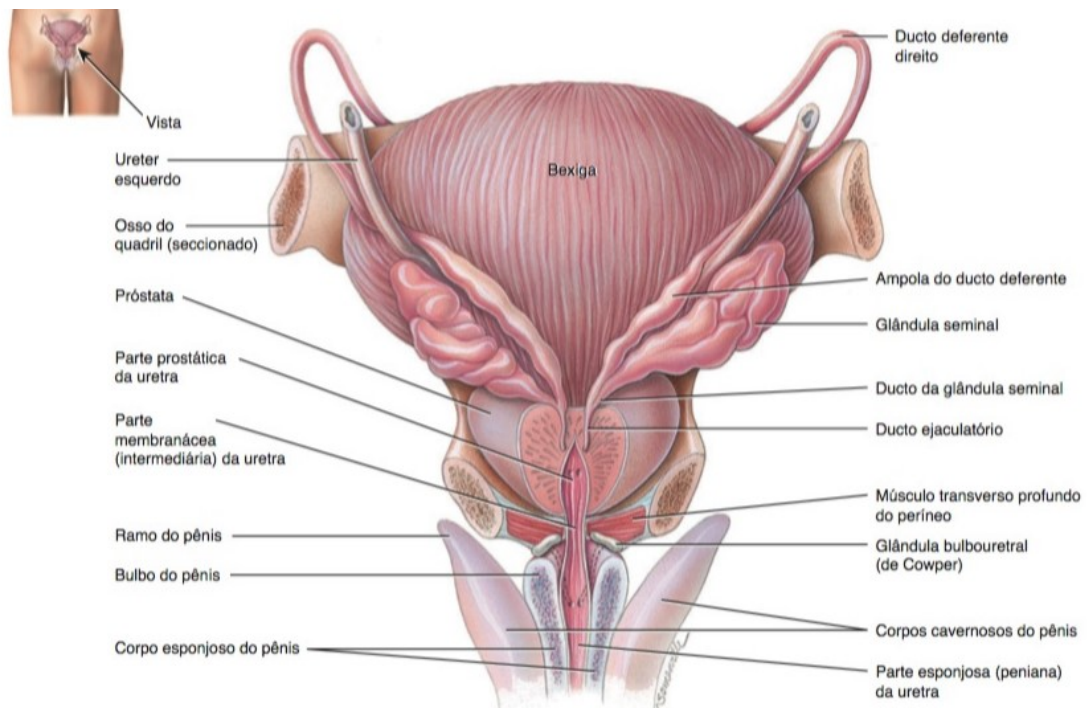
- Avaliar a viabilidade das linhagens celulares prostáticas PNT-2 (não tumorigênica), LNCaP (tumoral hormônio-responsiva) e PC-3 (tumoral resistente à castração) após tratamento com os complexos de cobre(II);
- Calcular os valores de IC50 (concentração que inibe 50% do crescimento celular) e índice de seletividade de cada complexo metálico de cobre (II) comparando-os;
- Predizer, por meio de análises *in silico*, a interação dos complexos de cobre(II) com o DNA;
- Avaliar a capacidade dos complexos de interagirem e clivarem o DNA;
- Avaliar a capacidade dos complexos de cobre(II) de alterarem a expressão de marcadores de proliferação em linhagem tumoral;

CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO

1. A glândula prostática

A próstata consiste em uma glândula acessória do sistema genital masculino, medindo aproximadamente 4 cm de largura, 3 cm de altura e 2 cm de profundidade. Encontra-se posicionada abaixo da bexiga circundando a parte prostática da uretra (Figura 1). Cresce lentamente desde o nascimento até a puberdade, expandindo-se com rapidez sob estímulo hormonal e permanecendo estável dos 30 até por volta dos 45 anos (TORTORA; NIELSEN, 2012). É responsável por secretar o líquido prostático, o qual neutraliza, durante a ejaculação, a acidez do sêmen e do canal vaginal, auxiliando na fertilização bem-sucedida do óvulo (GUYTON; HALL, 2006; SARRIS et al., 2018).

Figura 1: Representação da localização anatômica da Glândula Prostática.



Fonte: Tortora; Nielsen (2012).

Histologicamente, o órgão é composto por tecido glandular dividido em três zonas distintas: a periférica, a central e a de transição, além do estroma composto por músculo liso (CASTRO et al., 2011; LEE; PEEHL, 2004). Ademais, são definidos três tipos celulares no epitélio prostático, quais sejam: as células basais, neuroendócrinas

e luminais ou colunares (HUMPHREY, 2017). As células epiteliais da zona periférica produzem o antígeno específico da próstata (PSA). Este é uma serina protease que possui como principal função liquefazer o coágulo seminal, o que permite a liberação dos espermatozoides (CASTRO et al., 2011; PÉREZ-IBAVE; BURCIAGA-FLORES; ELIZONDO-RIOJAS, 2018).

Frequentemente, a próstata é acometida por três tipos de doenças: prostatites, hiperplasia prostática benigna (HPB) e o CaP (TANVEER et al., 2019). A prostatite consiste em um distúrbio inflamatório com aumento das células no parênquima prostático, podendo ser uma infecção bacteriana aguda ou crônica (OLIVEIRA; AMARAL; FERRAZ, 2005; XIONG et al., 2020). A HPB é considerada uma das doenças mais comuns em homens e sua incidência está diretamente relacionada com a idade, sendo frequente acima dos 50 anos (LIU et al., 2020). Caracteriza-se pelo aumento do volume da zona de transição glandular com obstrução no fluxo da urina. (LEE; PEEHL, 2004; FOO, 2017; FOO, 2019; CASTRO et al., 2011; LEE; PEEHL, 2004). Já a maioria dos CaP acontece na zona periférica representando cerca de 75% dos casos (WANG et al., 2018).

2. Câncer: definição e dados epidemiológicos

Caracterizado como uma doença genética, o câncer é resultado de modificações no DNA que culminam em células proliferativas progressivamente alteradas. Portanto, a carcinogênese é um processo lento, intimamente relacionado à instabilidade genômica, ampliações e mutações gênicas, mecanismos epigenéticos, quebras e perdas cromossômicas. Envolve, essencialmente, genes supressores de tumor (envolvidos com o reparo do DNA, controle do ciclo celular e apoptose), e proto-oncogenes (promotores da divisão celular) (DANTAS et al., 2009). Nesse contexto, neoplasias são inerentemente proliferativas classificadas em benignas e malignas. Nos tumores benignos, o crescimento celular é controlado, com o aumento local e auto delimitado de células nos tecidos acometidos. Apresentam características semelhantes à sua origem com algumas alterações em sua forma e função. Causam, em geral, compressão de órgãos e tecidos adjacentes (BABA; CÂTOI, 2007; INCA, 2011).

A distinção entre os tumores malignos e benignos é desafiadora e relevante na patologia do câncer (COOPER, 2000). Nos tumores malignos, a proliferação anormal

é potencialmente invasiva, infiltrando vasos linfáticos e sanguíneos e atingindo tecidos vizinhos, o que caracteriza as metástases. Em comparação com as células normais, as células cancerosas apresentam diferenças morfológicas, moleculares e funcionais como: polimorfismo; aneuploidias; citoesqueleto reduzido ou desorganizado; intensa síntese de biomoléculas como fatores de crescimento; estresse do retículo endoplasmático; inibição da apoptose e indiferenciação celular. Competem, com sucesso, por nutrientes e sinais de sobrevivência ao amplificarem, em sua superfície, diferentes receptores. Em geral, o grau de diferenciação dos tumores malignos está diretamente relacionado com seu ritmo de crescimento. Portanto, quanto mais indiferenciada a célula, maior será o grau de malignidade, impossibilitando, muitas vezes, a identificação do tecido do tumor primário (BABA; CÂTOI, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Ademais, no câncer há a geração de novos vasos sanguíneos ou angiogênese, a qual desempenha papel importante no crescimento, manutenção e metástase do tumor. Inicia-se a partir dos capilares pré-existentes e pode ser induzida através de um ou mais dos seguintes mecanismos: (i) brotações endoteliais gerando neovasos; (ii) angiogênese intussusceptiva em que um vaso preexistente se divide em dois; (iii) vasculogênese com o recrutamento de células progenitoras endoteliais ou de células hematopoiéticas provenientes da medula óssea; (iv) mimetismo vascular com a condução de nutrientes e oxigênio pelas células cancerosas) e (v) transdiferenciação de células-tronco cancerígenas em células endoteliais. Em tumores, esses processos ocorrem de forma desregulada, levando à formação de neovasos disfuncionais (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2020; OLLAURI-IBÁÑEZ et al., 2020).

Mundialmente, em 2020, ocorreram cerca de 19,3 milhões de casos novos de câncer e 9,96 milhões de óbitos. Estima-se, para o ano de 2040, um aumento de aproximadamente 10,9 milhões de casos (49,7%) e 6,2 milhões de óbitos (IARC, 2020). Nos Estados Unidos, foram diagnosticados, em 2020, em torno de 1,8 milhões de novos cânceres com 606 mil mortes (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

De acordo os dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), na população brasileira, dentre os 625 mil novos casos estimados para o triênio 2020-2022, o câncer de pele não melanoma acometerá 177 mil indivíduos. Os cânceres de mama e próstata representam o segundo e terceiro lugar respectivamente, com estimativa aproximada de 66 mil casos novos para cada um desses tumores. Demograficamente, a região Sudeste possui a maior taxa de

incidência (60%), seguida das Regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%). A Tabela 1 apresenta a distribuição dos dez tipos de cânceres mais incidentes no Brasil para o triênio 2020-2022, excetuando o câncer de pele não melanoma (INCA, 2019).

Tabela 1: Dados referentes à incidência de tumores na população brasileira estimados para o triênio 2020-2022.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2019).

Os valores demonstram números ainda crescentes e, portanto, evidenciam o câncer como problema de saúde pública mundial. Para essa doença, além dos gastos financeiros, destaca-se também a pressão física e emocional imposta aos pacientes (WHO, 2018), o que demanda o avanço das pesquisas dedicadas ao seu diagnóstico precoce e tratamento eficaz.

3. Câncer de Próstata (CaP)

3.1. Incidência

O CaP foi relatado pela primeira vez em 1853 pelo Dr. Adams, cirurgião do Hospital de Londres (ADAMS, 1853; NADER; EL AMM; ARAGON-CHING, 2018). Em 2018 foram quase 1,3 milhão de novos casos e 359.000 mortes no mundo. Nesse mesmo ano, o CaP foi o mais frequentemente diagnosticado no sexo masculino em mais da metade dos países do mundo, incluindo as Américas, Oeste da Europa, Austrália, África Subsaariana e Nova Zelândia (BRAY et al., 2018). Nos Estados Unidos, é a neoplasia visceral mais comumente diagnosticada (LUDWIG et al., 2016), sendo que em 2020 estimam-se, aproximadamente, 191,3 mil casos novos, correspondendo 1 em cada 5 novos diagnósticos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

É um tumor comum nos países desenvolvidos, particularmente devido à eficiente detecção da doença. Em locais que apresentam índice sociodemográfico baixo a médio, as chances de diagnóstico aos 79 anos são 1 em 47. Já em países com alto índice sociodemográfico as chances são 1 em 6 (Global Burden of Disease Cancer Collaboration, 2017).

No Brasil, o CaP é a segunda causa de morte relacionada por câncer em homens (LUDWIG et al., 2016). As estimativas indicam a ocorrência de 65.840 mil (29,2%) casos novos em cada ano do triênio 2020-2022, correspondendo a 62,95 casos novos a cada 100 mil homens. Demograficamente, está presente em todas regiões brasileiras. A Região Nordeste apresenta maior risco estimado, 72,35 a cada 100 mil homens (INCA, 2019).

3.2. Fatores de risco

Apesar de ser uma doença amplamente diagnosticada, sua etiologia permanece pouco compreendida. O principal fator de risco é a idade, sendo frequente em homens a partir dos 65 anos (RAWLA, 2019). Também se destacam histórico familiar, predisposição genética, etnia, tabagismo, obesidade, hipertensão e sedentarismo (GANN, 2002; MULLINS; LOEB, 2012; SARRIS et al., 2018; KAISER et al., 2019; LESLIE et al., 2020).

O histórico familiar é um fator de risco importante no desenvolvimento do CaP. Homens com parentes de primeiro grau (pai ou irmãos) diagnosticados com a doença têm um risco aumentado em até duas vezes de desenvolvê-la (HEMMINKI; CZENE, 2002; BRANT; SUNDQUIST; HEMMINKI, 2012; PENER et al., 2018). Além disso, a predisposição genética contribui fortemente para a ocorrência desse tumor, sendo que as mutações nos genes de reparo ao DNA, *BRCA1* (*breast cancer 1*) e *BRCA2* (*breast cancer 2*) são frequentemente associadas ao CaP (NIENTIEDT et al., 2017; NYBERG, et al., 2020).

As altas taxas de CaP entre homens de ascendência africana evidenciam a influência étnica (BRAY et al., 2018). Para esses homens a incidência é, em média, o dobro da registrada para caucasianos. Além disso, tendem a apresentar lesões mais avançadas com pior prognóstico (CRAWFORD, 2009). Ainda, não está claro o porquê dessas diferenças consideráveis, apesar de estudos apontarem que estejam

relacionados a combinação de variações genéticas, diferenças no estilo de vida dos pacientes e acesso à assistência médica (TOMS et al., 2016).

O tabagismo eleva o risco ao CaP, além de contribuir para sua progressão e para a mortalidade por essa doença. Embora os mecanismos biológicos subjacentes a essas associações não estejam estabelecidos, estudos demonstram que a alteração no comprimento dos telômeros das células prostáticas possivelmente pode ser influenciada pelo tabagismo, indicando maior instabilidade genética com a promoção de um fenótipo mais agressivo (JOSHU et al., 2018).

A obesidade e a hipertensão também se relacionam ao CaP, sobretudo a lesões avançadas. Por fim, países em que a população consome excessivamente gorduras apresentam maiores taxas de mortalidade por essa doença (FERRO et al., 2017; DI FRANCESCO et al., 2019). Nesse contexto, estudos epidemiológicos demonstraram que homens que praticam exercícios físicos, reduzindo o sedentarismo, apresentam menor risco de desenvolver tumores prostáticos. A atividade física atua em diferentes processos biológicos incluindo vias hormonais e anti-inflamatórias, as quais se relacionam diretamente à ocorrência do câncer (PENAR et al., 2019). Nesse cenário, é nítida a importância do fator comportamental no desenvolvimento do CaP, sendo que de 30% a 50% dos cânceres podem ser prevenidos. Além disso, a mortalidade pode ser reduzida por meio da detecção precoce da doença com maiores chances de cura quando tratada de forma adequada (WHO, 2018).

3.3. Diagnóstico, estadiamento e tratamento

Os sintomas do CaP, quando presentes, assemelham-se aos de outras patologias como micção frequente com dificuldades em iniciar e manter um fluxo urinário constante, noctúria, hematúria e disúria. Também pode causar compressão da medula espinhal, resultando em formigamento, dor, fraqueza nas pernas, incontinência urinária e fecal, disfunção sexual, dor durante a ejaculação ou impotência sexual. Quando metastático, são registradas dores ósseas nas costelas, quadris, vértebras e na parte proximal do fêmur (NIEDER et al., 2010; SUZMAN; BOIKOS; CARDUCCI, 2014; PARNHAM; SEREFOGLU, 2016; WANG et al., 2018; LESLIE et al., 2020).

O diagnóstico é realizado mediante a dosagem do PSA e toque retal, confirmado através da biópsia guiada pela ultrassonografia transretal (KHANDURI et al, 2017). O rastreamento periódico é de extrema importância para sua identificação precoce, quando a doença ainda é assintomática (ONCOGUIA, 2018). Estudos conduzidos entre os anos 2009 e 2015 demonstraram que aproximadamente 100% dos pacientes diagnosticados com CaP localizado apresentaram sobrevida média de 5 anos. Contudo, somente 31% dos pacientes diagnosticados já com metástases atingiram sobrevida global de 5 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O PSA é uma serina protease de 33 KDa codificado pelo gene *KLK3* (calicreína humana 3) localizado no cromossomo 19q 13.3–13.4, sendo regulado por andrógenos. O epitélio ductal e acinar da próstata é responsável pela sua produção e secreção. Inicialmente purificado e caracterizado pelo Dr. T. Ming Chu e seus colaboradores, o PSA se tornou uma das descobertas mais importantes do século XX. Foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1986 para avaliar a progressão do CaP em homens já diagnosticados com a doença. Posteriormente, em 1994, o FDA também aprovou a dosagem sérica do PSA combinada ao toque retal na detecção do CaP (KOHAAR; PETROVICS; SRIVASTAVA, 2019).

Na década de 90, a utilização do PSA revolucionou o panorama da doença, com um aumento no número de casos diagnosticados precocemente e das chances de cura nos Estados Unidos, Europa, Canadá, Austrália e em vários países nórdicos. A partir dos anos 2000, essa também se tornou uma realidade no Brasil (BRAY et al., 2018). Contudo, a dosagem de seus níveis séricos ainda é inespecífica, uma vez que também se encontra elevada em doenças não malignas como prostatites e HPB (LUDWIG et al., 2016). São considerados normais níveis de PSA abaixo de 4 ng/ml no sangue (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O toque retal é o exame complementar que analisa a consistência, tamanho e possíveis lesões palpáveis na glândula (ONCOGUIA, 2017). Embora seja o método mais utilizado, apresenta limitações. São acessíveis somente as porções posterior e lateral do órgão. Assim, cerca de 40% a 50% dos tumores permanecem indetectáveis (BRASIL, 2002). Quando os níveis séricos de PSA encontram-se alterados e há suspeitas durante o exame de toque retal, é indicada a biópsia, essencial para a confirmação da lesão (ONCOGUIA, 2017).

Após a retirada do tecido, é realizado o estudo histopatológico da peça, o qual também define o grau de diferenciação celular e a agressividade da doença. Para o

prognóstico do CaP são utilizados o sistema de estadiamento TNM (*tumor, node, metastasis*), o Escore de Gleason (COUÑAGO et al., 2020) e os níveis de PSA. O sistema TNM (Tabela 2) proposto pelo *American Joint Committee for Cancer (AJCC)* avalia o tamanho e extensão no tumor primário (T), a ocorrência ou não de metástase nos linfonodos próximos (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (LAWRANCE et al., 2019; ONCOGUIA, 2020).

Tabela 2: Sistema de classificação TNM (*Tumor Node Metastasis*) adotado para o Câncer de Próstata.

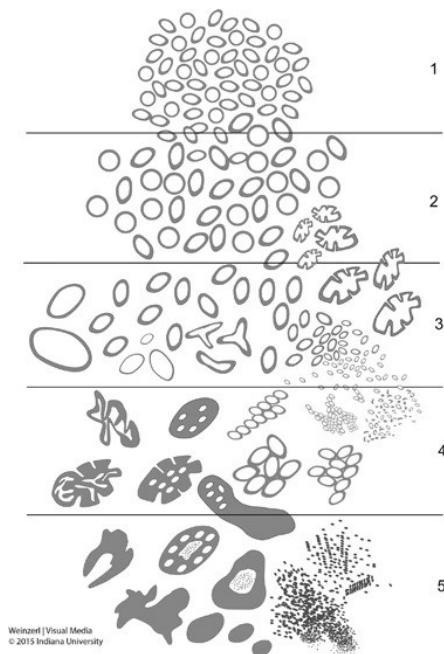
T- Tumor primário	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência do tumor primário
T1	Tumor clinicamente não palpável ou visível por método de imagem
T1a	Tumor incidental- achado histopatológico em $\leq 5\%$ do tecido de ressecção
T1b	Tumor incidental- achado histopatológico em $> 5\%$ do tecido de ressecção
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor engloba metade de um dos lobos ou menos
T2b	Tumor engloba mais da metade de um lobo, mas não os dois
T2c	Tumor engloba ambos os lobos
T3	Tumor além da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor envolve a vesícula seminal (uma ou ambas)
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes além das vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica
N- Envolvimento linfonodal regional	
Nx	Linfonodos regionais não avaliados
N0	Sem metástases para linfonodos regionais
N1	Metástases linfonodais regionais
M- Metástases a distância	
Mx	Metástases a distância não avaliadas
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Metástase a distância
M1a-	Linfonodos não regionais
M1b-	Ossos
M1c-	Outros órgãos

Fonte: Adaptado de Damião et al. (2015).

Já a pontuação de Gleason foi criada em 1966 por Donald F. Gleason e revisada em 2005 e em 2014 pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (EPSTEIN et al., 2016; HUMPHREY, 2017; EPSTEIN, 2018). A classificação (Figura 2) é realizada após a soma do padrão histológico primário (mais frequente) com o secundário (segundo padrão mais frequente), sendo que o escore total varia de 2 a 10. Conforme sua última atualização, são definidas 5 categorias: (i) escore 6 ou ≤ 6

(3+3) com lesão indolente e glândulas bem formadas e individuais; (ii) escore 7 (3+4) definindo tumores com melhor prognóstico, metástases raras com glândulas predominantemente bem formadas, com poucas difusas, fundidas e cribiformes; (iii) escore 7 (4+3) sinalizando um pior prognóstico com glândulas predominantemente mal formadas, fundidas e cribiformes; (iv) escore 8 com glândulas predominantemente bem formadas (3+5) ou somente glândulas mal formadas, fundidas e cribiformes (4+4) ou glândulas predominantemente ausentes (5+3); e (v) escore 9-10 para casos metastáticos, sem formação glandular ou com necrose (EPSTEIN, 2018).

Figura 2: Representação da pontuação de Gleason adotada no estadiamento do Câncer de Próstata.



Fonte: Adaptado de Epstein (2018).

O estágio em que o tumor se encontra reflete na escolha do tratamento, o qual também considera o estado clínico dos pacientes, incluindo a presença de comorbidades. Dentre os métodos terapêuticos adotados destacam-se a prostatectomia radical, radioterapia e hormonioterapia. Para os tumores em estágio avançado com a presença de metástases é empregada a quimioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A prostatectomia radical é um procedimento cirúrgico indicado como tratamento do CaP localizado com a remoção da próstata e vesículas seminais (IZIDORO et al., 2017). Na radioterapia, feixes de radiação são aplicados de maneira controlada e

direcionada, podendo incluir o implante de sementes radioativas na glândula (braquiterapia) (BOLADERAS et al., 2016; ZAORSKY et al., 2017).

Na hormonioterapia, o objetivo é reduzir os níveis de andrógenos e impedir o crescimento de células transformadas. Assim, a ADT pode incluir a castração química com a administração de agonistas do Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante (LHRH). Esses agonistas desregulam os receptores hipofisários e conseqüentemente a supressão da liberação de gonadotrofina (hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante), causando redução da produção de andrógenos (POPOVICS et al., 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Também são utilizados antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) os quais suprimem a produção de testosterona (SUN et al., 2020) e drogas que reduzem o nível dos andrógenos produzidos pelas glândulas suprarrenais como a Abiraterona e Cetoconazol, que inibem a enzima CYP17 do citocromo P450 (KEIZMAN et al., 2012; WERUTSKY et al., 2019). Ademais, destaca-se a enzalutamida, responsável por bloquear a ligação do hormônio ao seu receptor e a translocação nuclear do AR (LINDER et al., 2018). Outro método que pode ser adotado para a redução da testosterona é a orquiectomia, cirurgia em que há a remoção dos testículos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A ADT causa a regressão do CaP, pois a proliferação celular é dependente da via androgênica. Contudo, esse controle pode ser apenas temporário, pois as células malignas refratam ao tratamento. A falha bioquímica é indicada quando há um nível crescente de PSA sérico após a ADT e o paciente progride para o CRPC (IMAMURA; SADAR, 2016). Tumores avançados são tratados com a quimioterapia, em que fármacos são administrados sistemicamente. O tratamento também possui limitações preocupantes, pois os efeitos adversos associados e a resistência terapêutica têm evidenciado a necessidade de se desenvolver novas drogas menos tóxicas e mais eficazes (SOUSA et al., 2019).

4. Quimioterápicos e suas limitações

Atualmente, a quimioterapia é empregada no tratamento do CaP avançado, especialmente o CRPC metastático (mCRPC). As drogas utilizadas são administradas por via oral ou intravenosa, alvejando células tumorais circulantes. Geralmente o regime é cíclico, para que o corpo possa se recuperar durante os intervalos estabelecidos (ONCOGUIA, 2017; PATEL et al., 2018).

Os agentes quimioterápicos utilizados na clínica como tratamento padrão do CaP são o Docetaxel (DOC) e Cabazitaxel. Porém há também a Mitoxantrona e Estramustina. Na maioria dos casos, o tratamento é iniciado com o DOC e quando os tumores passam a desenvolver resistência a esse medicamento é empregado o cabazitaxel (CARBONETTI et al., 2020; ONCOGUIA, 2020).

O DOC é um taxano de segunda geração extraído da espécie *Taxus baccata*. Seu mecanismo de ação envolve a estabilização dos microtúbulos por meio da agregação das tubulinas, deixando-as não funcionais. Por conseguinte, há comprometimento da progressão mitótica, com a parada do ciclo celular e inibição da proliferação celular (RAUDENSKA et al., 2019). Além disso, possui caráter imunestimulador análogo às citocinas, conduzindo a uma melhora na resposta imunológica (SANCTIS et al., 2018). Em 2004, o DOC tornou-se o medicamento de primeira linha utilizado em mCRPC ao promover uma melhora no prognóstico dos pacientes. Diferentes estudos clínicos foram cruciais para sua validação, incluindo o TAX 327, com 1006 pacientes (TANNOCK et al., 2004; NADER; EL AMM; ARAGON-CHING, 2018).

Apesar dos benefícios ponderados, a quimioterapia ainda enfrenta problemas quanto à sua seletividade. Náusea, vômitos, problemas renais, supressão da medula óssea, perda de peso e cabelos, infecções, anemia são frequentemente relatos nos pacientes em tratamento (ITA, 2016; AYDIN; ONCOGUIA, 2018; KORMAZ, 2019; ZHANG et al., 2020). Além disso, as células tumorais desenvolvem intrincados mecanismos de resistência. São relatados a perda do funcionamento da proteína p53, responsável pelo reparo do DNA e apoptose; o aumento da expressão de isoformas da β -tubulina; a redução da expressão do *BRCA1* e o aumento da expressão da bomba de efluxo e da atividade da ATPase ABCB1 (LOMBARD et al., 2017). Estudos também sugerem que os mecanismos de resistência a taxanos estejam relacionados a quimiocinas e seus receptores e a citocinas capazes de controlar a resposta imune (NATSAGDORJ et al., 2019). Portanto, a busca por novos agentes quimioterápicos é imperativa na busca por métodos que sejam capazes de melhorar a sobrevida dos pacientes (NATSAGDORJ et al., 2019; LU et al., 2020).

5. Complexos de cobre para o tratamento oncológico

Complexos metálicos como antineoplásicos vêm sendo amplamente explorados (AYDIN; KORMAZ, 2019). No fim da década de 60, a descoberta da atividade antitumoral da cis-diaminodicloroplatina (II) (cisplatina) instigaram a pesquisa pela atividade farmacológica de compostos de coordenação. Nesses, o centro metálico é carregado positivamente, o que possibilita sua ligação a biomoléculas carregadas negativamente, como ácidos nucleicos e proteínas (BARRA; NETTO, 2015). Além disso, complexos metálicos com ligantes orgânicos se destacam por apresentarem propriedades antiproliferativas, antimicrobianas, antituberculose, antimaláricas, antifúngicas e anti-inflamatórias (AYDIN; KORMAZ, 2019; KRASNOVSKAYA et al., 2020)

O cobre é um metal essencial ao funcionamento de proteínas e enzimas que contribuem com a manutenção da homeostase celular. Contudo, seu estado de oxidação pode ser alterado facilmente para a forma de íon livre, podendo ser potencialmente tóxico às células. Por conseguinte, o íon cobre deve estar em concentrações adequadas intra e extracelularmente, para que as metaloproteínas cobre-dependentes possam desempenhar suas funções de forma regular (KOURY; OLIVEIRA; DONANGELO, 2007).

No organismo, a maior parte do cobre está localizada em órgãos com alta atividade metabólica como fígado, rins, coração e cérebro. Esse metal pode alternar entre seus estados de oxidação Cu^{+1} ou Cu^{+2} . Atua como cofator essencial no ciclo do oxigênio, tanto na respiração aeróbia quanto na formação de oxigênio molecular na via fotossintética. No ciclo do nitrogênio, é o principal cofator da enzima redutase do óxido nitroso (N_2O) (LLASES; MORGADA; VILA, 2019).

O cobre é essencial na formação e no funcionamento da citocromo C oxidase e da superóxido dismutase de Cu/Zn (cobre e zinco), relacionadas com os processos de respiração, metabolismo energético e síntese de DNA. Complexos de cobre(II) formam no meio celular adutos de glutathione, conduzindo à formação de um composto monovalente de cobre(I). O composto de cobre(I) gera um ânion superóxido, que ao ser degradado pela superóxido dismutase forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Sendo assim, os complexos de cobre sofrem reações do tipo Fenton a partir da decomposição do H_2O_2 em $\cdot\text{OH}$ induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANDRADE JUNIOR et al., 2005; FRIEDRICH et al., 2017; KRASNOVSKAYA et al., 2020).

Aproximadamente 95% do cobre da circulação sistêmica está ligado a ceruloplasmina (CP), proteína produzida no fígado. O cobre que não se liga a CP passa a se comportar como um potente oxidante, catalisando a formação de radicais hidroxila (*OH) que oxidam proteínas, lipídios e DNA. Nesse contexto, os mecanismos homeostáticos de absorção, excreção e biodisponibilidade do cobre devem estar finamente controlados (KAPLAN; MARYON, 2016; BALDARI; DI ROCCO; TOIETTA, 2020).

Tem sido relatado que agentes antitumorais à base de cobre são menos tóxicos ao organismo. Complexos cúpricos apresentam importante interesse farmacológico, pois agem através da inibição da atividade do proteassoma, da atividade da telomerase, degradação e intercalação de DNA, paraptose e formação de EROs (KRASNOVSKAYA et al., 2020). O estado redox intracelular é interrompido através do excesso de EROs, resultando em estresse oxidativo que culmina na modificação do DNA, lipídios, proteínas, causando disfunção da respiração mitocondrial, do dobramento de proteínas, do retículo endoplasmático e de processos de reparo de DNA (CHEN et al., 2018).

Complexos de cobre podem inibir seletivamente a proliferação celular induzindo à apoptose em células transformadas. Contudo, o espectro de atividades e funções varia entre esses complexos dependendo do ligante utilizado (ZHANG et al., 2012; NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017; SHI et al., 2019). De fato, complexos metálicos permitem a adição de grupamentos que podem ser ajustados para alvos moleculares definidos (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017). Estudos apontam que o ligante 1,10-fenantrolina, por exemplo, está relacionado com a indução do processo de apoptose por meio da inativação da atividade do proteassoma, facilitando a entrada dos complexos metálicos nas células tumorais (ZHANG et al., 2012). Já a bipyridina (bipy) é frequentemente utilizada como andaime na química supramolecular e metalossupramolecular, sendo a forma mais frequente a 2,2'-bipyridina, um quelante bidentado (CONSTABLE; HOUSECROFT, 2017; CONSTABLE; HOUSECROFT, 2019). Além de formar um complexo mais estável, a quelação direcionada à bipy representa uma estratégia específica de obtenção de locais para que os íons metálicos possam se incorporar na estrutura do DNA (WANG et al., 2019).

Recentemente, pesquisas envolvendo o complexo $[Cu(\text{phen})_2]^+$ + demonstraram sua atividade antitumoral por meio da intercalação no DNA. A partir desses resultados, uma série de complexos de cobre(II) contendo ligantes N, N-

heterocíclicos, como 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina, foram sintetizados para serem utilizados como nucleases sintéticas (PAIXÃO et al., 2017). As nucleases hidrolisam a ligação fosfodiéster de ácidos nucleicos, expondo-os à ação de desoxirribonucleases (DNases) e ribonucleases (RNases) (CASTRIGNANO, 2018). O meio pelo qual os compostos de cobre conduzem aos danos moleculares depende da natureza de sua interação, seja por intercalação, ligação ao sulco e ou ligação à superfície eletrostática (CHIKIRA; NG; PALANIANDAVAR, 2015), a qual pode ser predita por ferramentas de modelagem *in silico*. O complexo ternário de cobre(II) [Cu(bta) (1,10-fenantrolina) (ClO₄)], por exemplo, foi testado *in vitro* e os resultados foram bastante promissores. Demonstrou causar danos ao DNA por indução na fragmentação devido à presença da 1,10-fenantrolina na estrutura do composto. A exemplo do que já foi descrito, esse ligante, quando associado ao cobre(II), é considerado uma nuclease artificial e um agente intercalador do DNA. Esse complexo também conduziu à parada do ciclo celular na fase G₀/G₁, demonstrou atividade antiproliferativa e promoveu a geração de EROs (POLLONI et al., 2019).

Salienta-se ainda que as moléculas vinculadas ao complexo podem ser naturais, sintéticas ou semi-sintéticas, melhorando sua atividade antitumoral. A coordenação às tetraciclinas, dentre estas a doxiciclina (DOX) ao íon metálico [Cu(Dox)(Phen)]²⁺ demonstrou, *in vivo*, alto potencial quimioterápico ao reduzir o tamanho de tumores inoculados de sarcoma S180 e Ehrlich em modelos murinos. O complexo também induziu danos ao DNA a partir da interação direta com a molécula ou por formação de EROs (LOPES et al., 2018). Já outra classe promissora são as Casiopeínas®, família de complexos de cobre contendo ligantes N,N-doadores (1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina e derivados), N,O-doadores (aminoácido e peptídeo) ou O,O-doadores (acetilacetato ou salicilaldeidato) (BRAVO-GOMEZ; HERNANDEZ DE LA PAZ.; GRACIA-MORA, 2013; KRASNOVSKAYA et al., 2020). Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrada sua atividade antitumoral, confirmando sua capacidade de clivar o DNA por meio da geração de radicais livres além de promover alterações estruturais na tubulina, integrina e fibronectina (BECCO et al., 2012).

Neste contexto, o presente estudo se propôs a avaliar a capacidade de dois complexos de cobre de interferir em mecanismo tumorigênicos em linhagens celulares prostáticas, bem como compreender os mecanismos pelos quais interagem com a molécula de DNA a partir de análises *in silico*, a capacidade de clivarem o DNA

plasmidial e os níveis de expressão de marcadores de proliferação celular mediados pelos complexos metálicos.

6. Modelagem Molecular

Drogas anticâncer tem utilizado o DNA como principal alvo, afetando suas funções. As interações entre o DNA e pequenas moléculas podem ocorrer de forma covalente e não-covalente. No primeiro caso são descritas interações eletrostáticas, ligação em sulco e ligação intercalativa, as quais podem gerar adutos, resultando em transformações permanentes nos locais de ligação (HAMILTON; ARYA, 2012; REHMAN et al., 2015).

Compreender essas interações se mostra uma ferramenta relevante no desenho de regimes terapêuticos otimizados. Para caracterizá-las são utilizadas ferramentas de modelagem molecular, como o *docking* (BAYRAKTEPE, 2020). Nesta, a química computacional e técnicas de visualização gráfica permitem representar tridimensionalmente diferentes compostos. A idealização de fármacos utilizando esse recurso objetiva auxiliar a investigação das interações químicas de um determinado ligante com o seu receptor, explorando seus efeitos biológicos e componentes estruturais (CARVALHO et al., 2003).

Considerando o enorme volume de informações hoje armazenadas em banco de dados e a diversidade de resultados gerados acerca da estrutura e propriedades das moléculas, a análise *in silico* permite uma melhor compreensão de dados complexos, otimizando os ensaios biológicos (ABDEL-RAHMAN et al., 2018; KHAN et al., 2017). Nesse contexto, o CADD (*computer-aided drug design*), ou desenho de fármacos assistido por computador, foi criado a partir da necessidade de armazenar, gerenciar e analisar dados disponibilizados sobre novos medicamentos (SONG; LIM; TONG, 2009). Permite, portanto, simular a dinâmica molecular e orientar as experimentações laboratoriais (RICCI; NETZ, 2009).

Ensaio *in silico* são empregados para verificar como os complexos metálicos de cobre podem interagir com o DNA, (ANNARAJ; BALAKRISHNAN, NEELAKANTAN, 2016; KHAN et al., 2017; ROBERTAZZI et al., 2009). A ancoragem às cegas é realizada para avaliar a provável localização e conformação de melhor pontuação/score, associada a menor energia livre de ligação estimada entre os complexos e o DNA. Em um encaixe cego, toda a superfície da biomolécula é

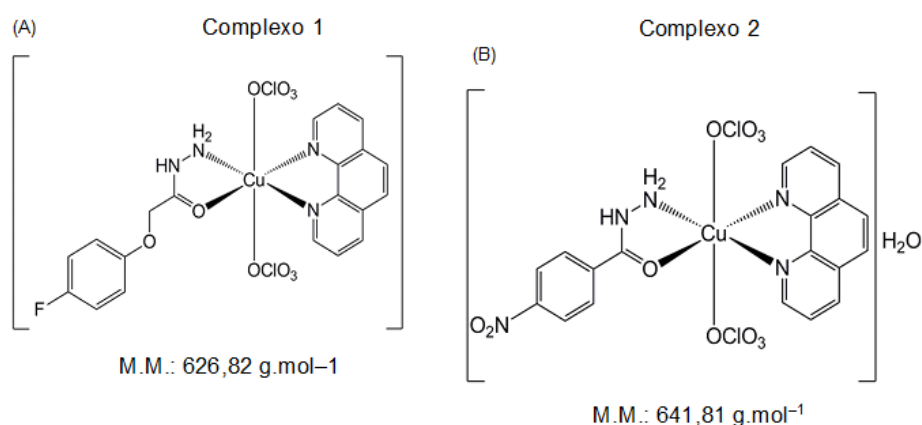
considerada na busca simultânea de sítios de ligação e possíveis conformações, permitindo resultados mais prováveis e significativos (KITCHEN et al., 2004; KHAN et al., 2017; REHMANI et al., 2017). Para a execução desses ensaios é utilizado o Autodock (<http://autodock.scripps.edu/>), um software desenvolvido para prever como pequenas moléculas se associam a um receptor de estrutura tridimensional conhecida.

7. Material e Métodos

7.1 Obtenção dos complexos metálicos.

Os complexos de cobre utilizados no presente estudo foram sintetizados e caracterizados no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo professor Dr. Wendell Guerra e colaboradores, de acordo o artigo de Paixão et al. (2017). A Figura 3 apresenta a estrutura dos compostos, sua massa molecular e seus ligantes.

Figura 3: Estrutura dos complexos de cobre avaliados no presente estudo. (A) Complexo ácido 4-fluorofenoxiacético hidrazida(1,10-Fenantrolina)-bis(perclorato) cobre(II) (Complexo 1) e (B) Complexo 4-nitrobenzidrazida(1,10-Fenantrolina)-bis(perclorato) cobre(II) monohidratado, (Complexo 2). Os compostos foram sintetizados por Paixão et al. (2017).



7.2. Cultivo celular

Para a realização dos experimentos *in vitro*, três linhagens celulares prostáticas foram mantidas em garrafas de cultura, incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Todas foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI-1640)

(Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco) e 50 ug/mL de gentamicina (Cultilab). Foram utilizadas a linhagem PNT-2 (não tumorigênica) e as linhagens tumorais LNCaP (hormônio-responsiva) e PC-3 (CRPC). O meio de cultura foi trocado em dias alternados ou quando necessário para se restabelecer o equilíbrio dos nutrientes. Ao atingirem 80% de confluência, as células foram semeadas para os ensaios subsequentes.

7.3 Ensaio de redução do MTT

A atividade citotóxica dos complexos de cobre foi avaliada nas linhagens prostáticas PNT-2, LNCaP e PC-3 a partir da redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) a cristais de formazan. Após atingirem 80% de confluência, as células de cada linhagem foram desagregadas enzimaticamente, centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm e ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo completo. As células foram contadas em Câmara de Neubauer pelo teste de exclusão do azul de tripano e semeadas conforme sua curva de crescimento: $2,0 \times 10^4$ para a linhagem PNT2 e $1,5 \times 10^4$ para as linhagens tumorais. As células foram distribuídas em placas de 96 poços com meio de cultura completo, mantidas a 37 °C e 5% CO₂.

No dia seguinte as células foram tratadas com os complexos metálicos em diferentes concentrações (1 µM, 5 µM, 10 µM, 12,5 µM, 25 µM, e 50 µM), diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%. O experimento foi conduzido em 24 e 48 horas. Poços com células não tratadas foram utilizadas como controle de viabilidade do experimento. Células tratadas apenas com DMSO foram incluídas como controle de diluente. Após o período de incubação, o meio com o tratamento foi retirado e depois foi adicionado 150 µl da solução de MTT a 5 mg/mL, mantida por 4 horas. Posteriormente, a solução foi descartada quando então foram adicionados 200 µl de solução de DMSO 0,5% em cada poço seguida de homogeneização. As placas foram lidas em espectrofotômetro (termo plate TP-Reader) a 560 nm. A viabilidade celular foi calculada conforme a Fórmula (F1).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{AT}-\text{AB}) / (\text{AC}-\text{AB}) \times 100$$

AT = absorbância das células tratadas

AC = absorbância do controle de viabilidade (células não tratadas)

AB= absorbância do branco (poços apenas com DMSO)

A IC50 (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) foi determinada por regressão não linear utilizando o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas, admitindo-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O IS (índice de seletividade) foi calculado a partir da razão entre os valores de IC50 da linhagem não tumorigênica pela tumorigênica considerado significativo os complexos com valor de $IS \geq 2$ (PEREIRA et al., 2015).

7.4. Estudos de *Docking* Molecular

Foi realizado o *docking* molecular do complexo com o dodecâmero de DNA duplex correspondente à sequência (CGCGAATTCGCG)₂ disponível no banco de dados do Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb - ID 1BNA) (ABDEL-RAHMAN et al., 2018; ZEHRA et al., 2019). Os dois complexos foram desenhados utilizando a ferramenta ChemDraw Professional 17.0 e Chem3D Pro (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) com output em formato PDB para o ensaio *in silico* de ancoragem às cegas. Para predizer a possível conformação, local e a afinidade de ligação de melhor pontuação, baseada na menor energia livre de ligação estimada (kcal mol^{-1}), foram utilizados os softwares AutoDockTools 1.5.6 (Instituto de Pesquisa Scripps, La Jolla, CA, EUA), AutoGrid 4 e Autodock 4.2 (RAJEBHOSALE et al., 2017; DHAHAGANIA et al., 2018; XU et al., 2018).

A molécula 1BNA determinada como alvo, teve as moléculas de água removidas, átomos de hidrogênio polares incorporados, além de computadas as energias Kollman e, em sequência, as cargas parciais Gasteiger. O cálculo do acoplamento foi executado usando uma grade mapeada (grid map) com x, y e z atribuídos como 70 x 78 x 126 e espaçamento de ponto de grade de 0,375 Å, de modo a cobrir todo o DNA na busca de possíveis conformações de interação entre a molécula e o alvo (KHAN et al., 2017; RAJEBHOSALE et al., 2017; REHMANI et al., 2017; MALEKSHAH et al., 2019).

O acoplamento ocorreu pelo algoritmo genético lamarckiano, disponível no programa, com um número de execuções de ancoragens independentes em cada simulação definido como 100, desse modo, o acoplamento da melhor pontuação (kcal mol^{-1}), referente a energia livre de ligação estimada, foi então selecionado. Para visualização da posição das melhores conformações da ancoragem foi utilizado

Chimera 14.4 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) e as interações entre 1BNA e os dois complexos foram analisadas usando o AutoDock Tools 1.5.6 (SHAKIR et al., 2017; MALEKSHAH et al., 2019).

7.5. Ensaio de degradação de DNA plasmidial

Esse ensaio objetivou avaliar a capacidade dos complexos de cobre(II) de induzirem danos e de clivar o DNA. Foram cultivadas bactérias eletrocompetentes em meio líquido LB e clonadas com o plasmídeo siSTRIKE™ U6 *Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP*. O DNA plasmidial (30 ng/μL) foi extraído de acordo com o protocolo presente no kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit e tratado com diferentes concentrações dos Complexos 1 e 2 (30 μM e 120 μM), diluídos em PBS (tampão fosfato salino) 1X. O ensaio foi conduzido com a presença e ausência de DMSO 0,05% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 15 mM ou com ambos. O DNA plasmidial também foi avaliado na presença da enzima de restrição *NheI*, utilizada como controle de quebra das duas fitas do DNA. As amostras foram incubadas a 37°C pelo período de 12 horas e, após esse tempo, foram adicionados 5μL do tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 30% de glicerol, 10 mM de EDTA). As amostras foram resolvidas em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,05% (10 μg/mL) em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM) 0,5X. A corrida eletroforética foi realizada a 80 volts por 3 horas e fotografado sob luz ultravioleta. O gel foi analisado e as intensidades das bandas foram quantificadas pelo software ImageJ versão 1.53k (Java 1.8.0_172).

7.6. Marcações em citometria de fluxo

Para analisar o perfil de expressão de marcadores de proliferação após o tratamento das células LNCaP com os Complexos 1 e 2 foi utilizada a citometria de fluxo. Esta é uma técnica capaz de analisar de forma simultânea e multiparamétrica células ou partículas suspensas em meio líquido. É um método que permite medir a intensidade de fluorescência emitida pelas células marcadas com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos, para detectar proteínas ou ligantes específicos (HIRAMATSU et al., 2019; KAGE et al., 2021).

Para analisar a expressão de Ki-67 e Ciclina D1, as células LNCaP foram tratadas por 48 horas com o Complexo 1 na concentração de 6,5 μM e Complexo 2 na concentração 0,5 μM (concentrações determinadas a partir dos resultados obtidos nos testes de MTT). Os ensaios foram conduzidos em triplicata utilizando garrafas T25 e, após o tratamento, as células foram lavadas com PBS, resuspendidas e fixadas utilizando o kit de solução BD Cytotfix / Cytoperm™ Fixação / Permeabilização (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante

Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos primários (1:100) anti-Ki-67 (catálogo nº 310250) e anti-Ciclina D1 [DSC-6] (ab10540, catálogo nº GR66211) por 1 hora em temperatura ambiente, seguido da adição por 1 hora do anticorpo secundário (1:50 μl) anti-IgG de coelho conjugado com o fluorocromo FITC (catálogo nº 101M6250) para Ki-67 e anti-IgG de camundongo conjugado com Atto 647N (catálogo nº 50185) para Ciclina D1. As análises foram realizadas em Citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) e os histogramas gerados pelo software FlowJo.

8. Análises estatísticas

Para o cálculo da significância estatística dos ensaios foi utilizando o software GraphPad Prism 8.0. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e as diferenças entre as linhagens submetidas ao mesmo tratamento foram calculadas pelo teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações para o ensaio de MTT e pelo teste de Dunnet para os experimentos de degradação de DNA plasmidial e de expressão de marcadores de proliferação. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

9. Resultados e discussão

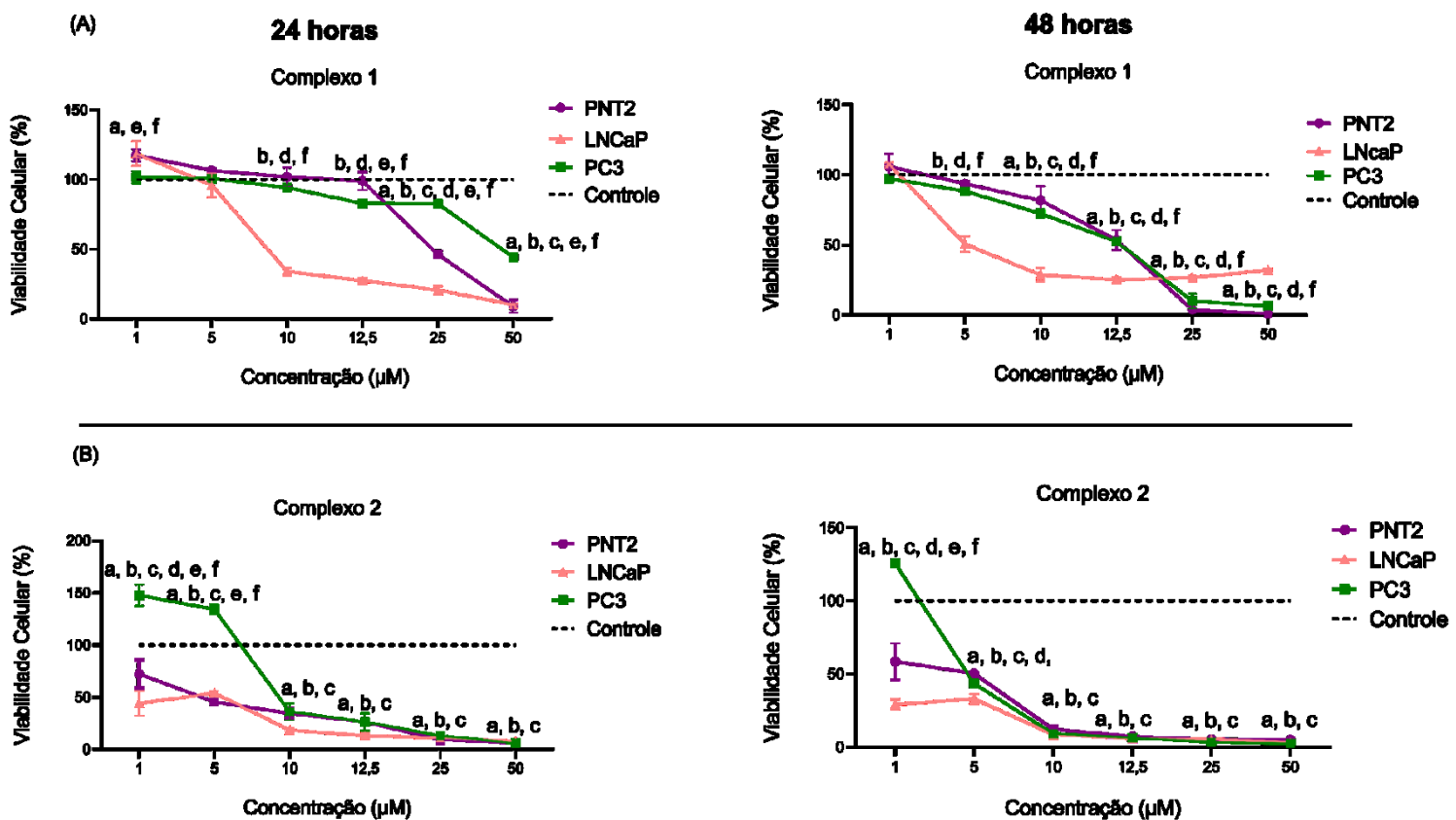
9.1. Viabilidade celular, valores de IC50 e IS

O CaP é um tumor frequente, de crescimento lento e assintomático, cujo número de casos diagnosticados em estágios já avançados vem aumentando mundialmente (FAN et al., 2020; WHITAKER et al., 2020). O tratamento inclui cirurgia, radioterapia e ADT, as quais, na maioria dos casos, não são curativas e os pacientes evoluem para o CRPC. Para pacientes com mCRPC, a quimioterapia com DOC é

empregada como estratégia de primeira linha e, apesar de alvejar células tumorais, possui limitações associadas à toxicidade e resistência adquirida ou intrínseca, comprometendo a eficácia terapêutica (DENOYER et al., 2016; LU et al., 2020). Complexos de cobre vêm sendo estudados como possíveis metalofármacos, uma vez que agem como compostos bioativos em ambientes de hipóxia e pouco vascularizados, promissores no tratamento de tumores (BADEA et al., 2020; BEZERRA et al., 2017; FONSECA, 2014; KRASNOVSKAYA et al., 2020; MOLINARO et al., 2020). No presente estudo foram avaliados os efeitos celulares e a interação com o DNA de dois novos compostos de cobre em células prostáticas, visando caracterizar novos protótipos no controle dessas lesões.

Inicialmente, foi realizado o ensaio de MTT para identificar alterações na viabilidade de células tumorais mediadas pelos dois complexos metálicos (Figura 4). Nas células LNCaP, o Complexo 1 (Figura 4A), no tempo de 24 horas de tratamento, apresentou efeito dose-dependente e, a partir de 25 μM , se mostrou citotóxico à PNT-2 (não tumorigênica). Após 48 horas, o composto também foi mais ativo contra a linhagem LNCaP até a concentração de 12,5 μM . Nas maiores concentrações diminuiu substancialmente a viabilidade da linhagem PC-3, contudo, também sendo citotóxico à PNT-2.

Figura 4: Atividade citotóxica de dois novos complexos metálicos de cobre em linhagens prostáticas. Em (A) tratamentos com o Complexo 1 e em (B) Tratamentos com o Complexo 2. Foram utilizadas a linhagem não tumorigênica PNT-2 e as linhagens tumorais LNCaP (hormônio-responsiva) e PC-3 (resistente à castração) em tratamentos por 24 e 48 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm DP e comparados entre as diferentes linhagens para o mesmo tratamento utilizando o teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para analisar múltiplas comparações. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. a: comparação entre a PNT-2 e o controle; b: comparação entre a LNCaP e o controle; c: comparação entre a PC-3 e o controle; d: comparação entre a PNT2 e LNCaP; e: comparação entre a PNT2 e PC-3; f: comparação entre a LNCaP e PC-3.



O Complexo 2 (Figura 4B), também com efeito dose-dependente, apresentou um perfil semelhante de citotoxicidade após 24 e 48 horas de tratamento. Já na menor concentração, a viabilidade das células PNT-2 reduziu em torno de 41% e as células tumorais LNCaP foram sensíveis ao tratamento em todas as concentrações. Na maior concentração, em ambos os ensaios, a viabilidade das linhagens PNT-2, LNCaP e PC-3 permaneceu em torno de 5%, 3% e 2%, respectivamente.

Os valores de IC50 para cada um dos tratamentos estão apresentados na Tabela 3. Observamos que o Complexo 2 foi mais citotóxico para LNCaP após 24 e 48 horas. Ambos complexos foram seletivos para a LNCaP, destacando-se o Complexo 2 com IS = 12,72 após 48 horas.

Tabela 3: Valores de IC50 e IS dos dois complexos de cobre sobre células tumorais prostáticas.

Complexos	24 horas					48 horas				
	IC50 (µM)			IS		IC50 (µM)			IS	
	PNT-2	LNCaP	PC-3	LNCaP	PC-3	PNT-2	LNCaP	PC-3	LNCaP	PC-3
1	24,5	9,038	46,58	2,71	0,52	12,94	6,484	13,21	1,99	0,97
2	3,630	1,632	9,634	2,22	0,37	5,225	0,4107	4,952	12,72	1,05

IC50=concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle.

IS= razão entre os valores de IC50 da linhagem não tumorigênica (PNT-2) pelas tumorais (LNCaP e PC-3).

De acordo com a literatura, pesquisas com complexos de cobre contendo ligantes N,N-doadores (1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina e derivados) têm apresentado resultados antitumorais promissores pois induzem citotoxicidade, demonstram expressiva atividade nucleásica e intercalam no DNA (PAIXÃO et al., 2017; FANTONI et al., 2018; PAIXÃO et al., 2020). Os complexos 1 e 2 apresentados nesse estudo possuem ligantes N,N-doadores, o que justifica a citotoxicidade observada. Nossos resultados são corroborados por dados já publicados com complexos de cobre contendo ligantes N,N-doadores, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Estudos já publicados em que foi demonstrada a citotoxicidade de complexos de cobre contendo ligantes N,N-doadores em diferentes linhagens tumorais.

Complexos	IC50	Linhagem celular	Referência
[Cu(doxiciclina)(phen)(H ₂ O)(ClO ₄)](ClO ₄)	1,93 µmol L ⁻¹	K562	SILVA et al., 2011
[Cu(tetraciclina)(phen)(H ₂ O)(ClO ₄)](ClO ₄)	2,59 µmol L ⁻¹	K562	
[CuCl (phen) µ-Cl] 2	0,639 µg/mL	MDA-MB-32	MROUEHA et al., 2015
[CuCl (phen) µ-Cl] 2	0,591 µg/mL	HT-29	
[CuCl (phen) µ-Cl] 2	0,803 µg/mL	A549	
[CuCl (phen) µ-Cl] 2	0,711 µg/mL	SF	
[CuCl (phen) µ-Cl] 2	0,903 µg/mL	B16F10	
Cu(4-FH)(phen)(ClO ₄) ₂	1,8 µmol L ⁻¹	K562	

Cu(4-NH)(phen)(ClO ₄) ₂ ·H ₂ O	1,6 μmol L ⁻¹	K562	
Cu(4-NH)(dmb)(ClO ₄) ₂ ·H ₂ O	15,0 μmol L ⁻¹	K562	
[Cu(OH-PIP)(Phe)Cl]	0,52 μM	CAL-51	
[Cu(OH-PIP)(Gly)(H ₂ O)]NO ₃ ·2H ₂ O	0,37 μM	CAL-51	
[Cu(OH-PIP)(Ala)Cl]·H ₂ O	0,08 μM	CAL-51	LI et al., 2019
[Cu(OH-PIP)(Met)](PF ₆)·2H ₂ O	0,69 μM	CAL-51	
[Cu(OH-PIP)(Gln)(H ₂ O)]Cl·3H ₂ O	0,27 μM	CAL-51	
[Cu(bta)(phen)(ClO ₄)	7,4 μM	Sarcoma 180	POLLONI et al., 2019
[Cu(dox)(phen)] ²⁺	13,3 μM	S180	
[Cu(dox)(phen)] ²⁺	6,2 μM	TG180	LOPES et al., 2020
[Cu(dox)(phen)] ²⁺	1,4 μM	B16F10	
[Cu (tdp) (fen)] (ClO ₄)	1,2 μM	MCF-7	
[Cu (tdp) (fen)] (ClO ₄)	1,0 μM	MDA-MB-231	PERIASAMY et al., 2020

K562: Leucemia Mielóide Crônica; MDA-MB-32: Adenocarcinoma da Mama; HT-29: Adenocarcinoma de Cólon Humano; A549: Adenocarcinoma da Mama; SF: Astrocitoma; B16F10: Melanoma; CAL-51: Células de Câncer de Mama triplo negativa; S180: Sarcoma; TG180: Sarcoma; MCF-7: Células de Câncer de Mama responsivas a estrogênio; MDA-MB-231: Células de Câncer de Mama triplo negativa.

Em próstata, Adsule et al. (2006) observaram que alguns complexos de cobre com base de Schiff induzem apoptose sem causar estresse oxidativo e inibem a proliferação de células LNCaP e PC-3, com IC₅₀ de 5 μM e 7 μM, respectivamente, após 72 horas de tratamento. Xie e Peng, (2017) também utilizaram complexos com essas características, os quais foram citotóxicos e inibiram a proliferação de células tumorais PC-3 e DU145. Os valores de IC₅₀, após 24 horas de tratamento, foram de 0,083 μM e 0,2 μM para a linhagem PC-3 e 0,7 μM e 0,36 μM para a linhagem DU145. Já dois complexos de cobre contendo fenantrolina (Cu (PHEN) (ASN) e Cu (PHEN) (MET)) foram testados por Rodrigues et al., (2020) e também apresentaram atividade contra a linhagem celular PC-3, com IC₅₀ de 5,7 μg/mL e 7,4 μg/mL, respectivamente em 24 horas de tratamento.

9.2. Docking molecular com os complexos de cobre(II)

As ancoragens moleculares *in silico* entre os complexos estudados e o dodecâmero de DNA duplex de sequência CGCGAATTCGCG (PDB ID: 1BNA) foram

realizadas para compreender as possíveis interações entre os complexos e o DNA, e para prever a energia de ligação. A interação com a sequência de DNA depende de diversos fatores como: ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, influência de cargas nas interações eletrostáticas (EL-DEEN; SHOAIR; EL-BINDARY, 2018; MALEKSHAH et al., 2019). Esses parâmetros foram avaliados no presente estudo.

A conformação do alvo-ligante atingida durante a simulação foi pontuada e a menor energia livre de ligação estimada, de modo que, quanto menor o valor, mais provável a interação (ABDEL-RAHMAN et al., 2018). Muitas drogas com propriedade antitumoral apresentam como molécula alvo o DNA. É descrito que complexos de cobre(II) apresentam capacidade de interações específicas com o DNA causando danos e conferindo atividade citotóxica/citostática que direcionam a morte celular (SANDHAUS et al., 2016). Desse modo, as investigações *in silico* das interações do DNA com complexos metálicos são importantes para o desenvolvimento de novos quimioterápicos e podem atuar como um complemento aos dados experimentais (SHAHABADI et al., 2017; MALEKSHAH et al., 2019).

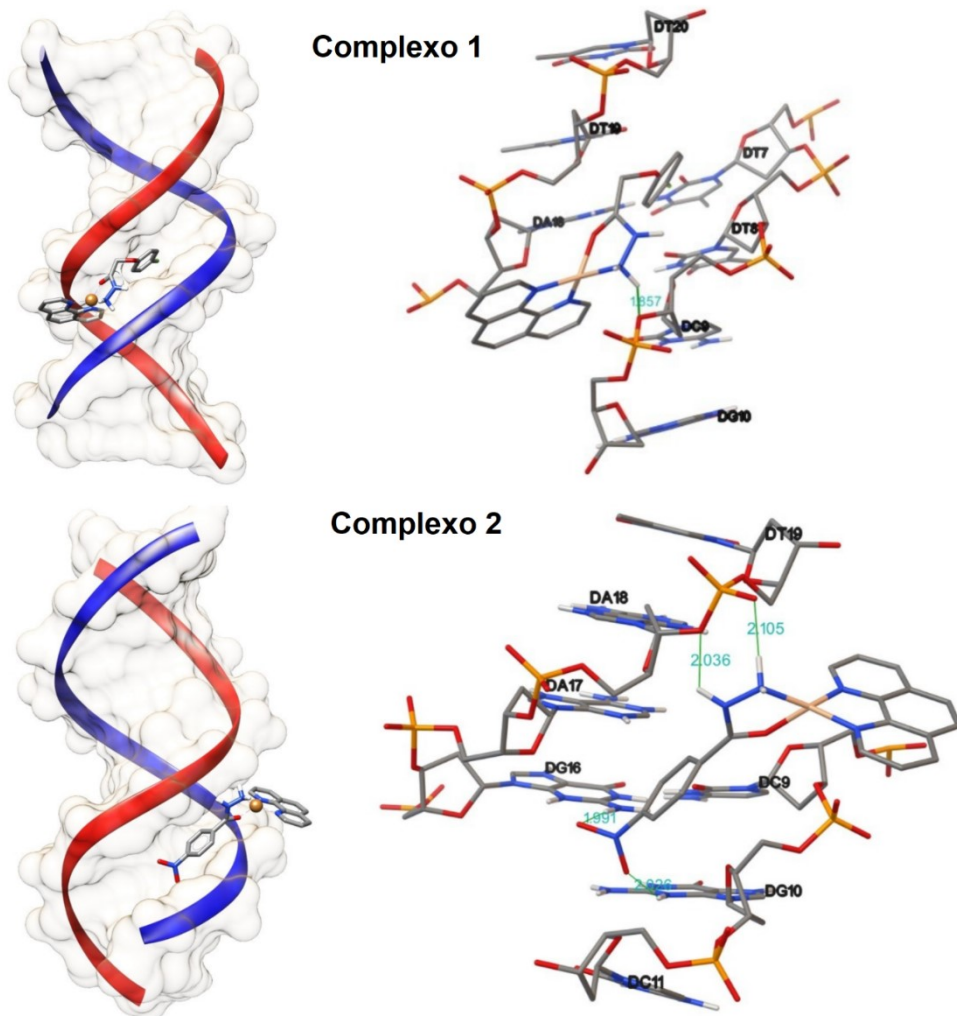
A Tabela 5 exibe as melhores pontuações dos complexos após 100 ancoragens independentes com o DNA. Foi perceptível que os dois complexos possuem predomínio de interação no sulco menor da molécula de DNA. As pontuações obtidas com as simulações *in silico* indicam uma alta probabilidade de interação com o DNA molde (Figura 5) (ABDEL-RAHMAN et al., 2018; EL-DEEN; SHOAIR; EL-BINDARY, 2018; FERREIDONNEZHAD et al., 2018; SURESHBABU et al., 2018; MALEKSHAH et al., 2019).

Tabela 5: Resultados comparativos das ligações e interações moleculares da ancoragem entre o DNA alvo e os Complexos 1 e 2.

<i>Conformação</i>	<i>Pontuação (kcal mol⁻¹)</i>	<i>Sulco de ligação</i>
Complexo 1	-11.95	Sulco Menor
Complexo 2	-11.40	Sulco Menor

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 5: *Docking* molecular para prever as possíveis conformações obtidas com simulações semiempíricas de acoplamento às cegas dos Complexos 1, e 2 com a molécula de DNA. Foi utilizado como molde para as simulações *in silico* o dodecâmero de DNA duplex disponível no banco de dados do Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb - ID 1BNA). As letras em preto referem-se aos nucleotídeos no DNA em relação as suas respectivas cadeias. Os números em azul claro/ciano expressam a distância em que ocorre a ligação de hidrogênio, em ângströms.



A partir dos valores obtidos para a ancoragem molecular, sugerimos que os complexos interagem com o DNA, sendo que a menor energia obtida indica o melhor encaixe. Sendo assim, a ordem crescente de probabilidade de ancoragem, baseada na melhor pontuação, foi Complexo 1>2. Os compostos foram avaliados por *docking* e apresentaram preferência para a intercalação pelo sulco menor do DNA molde. Não obstante, é necessário ressaltar que a ancoragem molecular auxilia na compreensão qualitativa acerca da atuação da molécula, não havendo, necessariamente, a identificação e mensuração quantitativa (RICCI; NETZ, 2009). Além disso, os

Complexos 1 e 2 possuem em sua estrutura a 1,10-fenantrolina, descrita como uma nuclease artificial, devido a sua aptidão em se ligar e clivar o DNA, fenômeno este que pode estar relacionado a sua estrutura planar (PAGES et al., 2015; ARTHI et al., 2018; LOPES et al., 2018).

9.3. Avaliação do potencial dos Complexos 1 e 2 em clivar DNA plasmidial

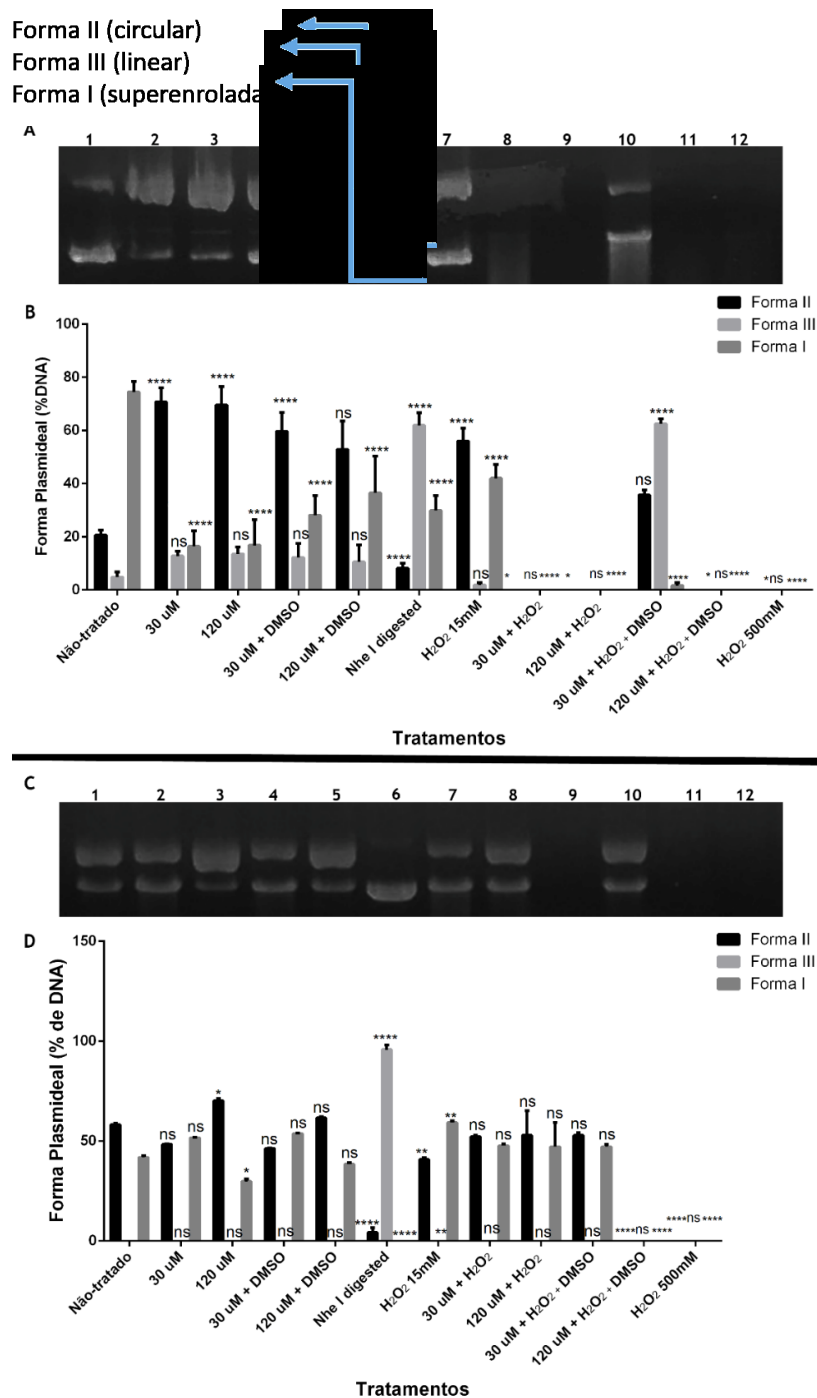
Considerando dados da literatura que demonstram que complexos cúpricos possuem atividade nucleásica devido ao seu potencial redox (CHEN et al., 2018; POLLONI et al., 2019; KRASNOVSKAYA et al., 2020), a capacidade de clivar DNA plasmidial também foi presentemente avaliada para os Complexos 1 e 2 (Figura 6). Após a eletroforese, foi detectada a presença de três padrões de bandas diferentes que correspondem às três topologias do DNA plasmidial (Figura 6A). A forma I circular superenrolada refere-se ao DNA intacto, o que torna sua forma molecular compacta, migrando mais rapidamente no gel e, portanto, identificada na parte inferior. A forma II circular cortada é indicada como a banda mais superior no gel, pois a quebra em uma das fitas, seja por ação enzimática ou química, tem como resultado um círculo relaxado que conduz a uma migração do plasmídeo mais lenta. Já a forma III linear, corresponde à quebra das duas fitas da molécula de DNA em uma mesma posição, como o observado para enzimas de restrição, com migração intermediária (LU et al., 2020; SOUSA et al., 2020).

Analisando os tratamentos do plasmídeo com diferentes concentrações do Complexo 1, é possível observar que o composto foi capaz de interagir e clivar o DNA (Figura 6A e B). Comparando ao controle negativo (não tratado), o Complexo 1 sozinho, nas concentrações testadas (30 μM e 120 μM), induziu quebras simples na molécula de DNA, potencializando a intensidade das bandas da forma II ou circular (Figura 6A, colunas 2 e 3). Por outro lado, quando combinado ao DMSO 0,05%, um sequestrador de radical hidroxila, nota-se uma inibição da clivagem do DNA, pois há redução da banda correspondente à forma II e aumento da forma I, que representa a forma intacta do plasmídeo (Figura 6A, colunas 4 e 5). Ressalta-se ainda que foi possível observar pequenas bandas de plasmídeos lineares (forma III) nos tratamentos com o complexo sozinho (Figura 6A, colunas 2 e 3) e no tratamento com o complexo na menor concentração associado ao DMSO 0,05% (Figura 6A, coluna 4).

A enzima de restrição *NheI* foi utilizada como controle positivo para indução de quebra na dupla fita da molécula de DNA e produção de plasmídeos de forma III ou lineares (Figura 6A, coluna 6). O tratamento com H₂O₂ foi introduzido no experimento como simulador de um ambiente oxidativo, demonstrando clivagem no DNA e aumento da banda da forma plasmidial II (Figura 6A, coluna 7).

Quando adicionamos H₂O₂ ao Complexo 1, podemos inferir que o complexo sofreu reação de Fenton induzindo a formação EROs, sendo capaz de degradar completamente o DNA plasmidial, confirmando, portanto, a ausência de bandas no gel (Figura 6A, colunas 8 e 9). Em contrapartida, o Complexo 1 em 30 µM (menor concentração utilizada), na presença de H₂O₂ e DMSO 0,05% teve sua atividade reduzida, uma vez que surgiram bandas nas formas II e III, não sendo, assim, o DNA completamente degradado como ocorreu na ausência do DMSO 0,05% (Figura 6A, coluna 10).

0Figura 6: Degradação de DNA do plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP) induzida pelos Complexos 1 e 2. A) Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados no tratamento com o Complexo 1. B) Gráfico representativo da porcentagem de DNA plasmidial nas diferentes formas após tratamento com o Complexo 1. C) Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados no tratamento com o Complexo 2. D) Gráfico representativo da porcentagem de DNA plasmidial nas diferentes formas após tratamento com o Complexo 2. Dados expressos a partir da média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes. Análise estatística feita por ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett, comparando com o controle não tratado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns não significativo. 1: Controle sem tratamento; 2: Complexo 1 ou 2 (30 μ M); 3: Complexo 1 ou 2 (120 μ M); 4: Complexo 1 ou 2 (30 μ M) + DMSO; 5: Complexo (120 μ M) + DMSO; 6: NheI; 7: H₂O₂ 15 mM; 8: Complexo 1 ou 2 (30 μ M) + H₂O₂ 15 mM; 9: Complexo (120 μ M) + H₂O₂ 15 mM; 10: Complexo 1 ou 2 (30 μ M) + H₂O₂ 15 mM + DMSO; 11: Complexo 1 ou 2 (120 μ M) + H₂O₂ 15 mM + DMSO; 12: 500mM H₂O₂.



Os resultados obtidos após os tratamentos com o Complexo 2 também mostram sua capacidade em clivar a molécula de DNA (Figura 6C e D). No entanto, comparando ao controle não tratado, somente na maior concentração testada (120 μ M), o complexo isolado induziu cortes na fita simples, potencializando o surgimento de banda na forma II no gel de agarose (Figura 6C, coluna 3). Ademais, na presença de DMSO 0,05%, também foi constatado a redução na quantidade de quebras de DNA e, portanto, redução da intensidade das bandas condizentes à forma II (Figura 6C, colunas 4 e 5).

Nas concentrações testadas (30 μ M e 120 μ M) na presença de H₂O₂ e na menor concentração (30 μ M) associado ao H₂O₂ e DMSO 0,05%, o Complexo 2 não foi capaz de clivar a fita simples e nem de induzir cortes na dupla fita do DNA (Figura 6C, colunas 8, 9 e 10). Não obstante, foi observado que na maior concentração testada (120 μ M), associado ao H₂O₂ e DMSO 0,05%, o Complexo 2 foi capaz de degradar completamente o DNA plasmidial, representado pela ausência de bandas no gel (Figura 6C, coluna 11).

Para esclarecer o mecanismo envolvido na reação de clivagem do DNA plasmidial, estudos anteriores foram realizados na presença de H₂O₂ como cofator redox dos complexos de cobre(II), sendo possível observar indução de quebras e dano ao DNA plasmidial. Por outro lado, quando os autores adicionaram o DMSO, conhecido como sequestrador de radicais livres, puderam observar um efeito protetor e, conseqüentemente, uma redução da atividade de clivagem do DNA dos complexos de cobre(II) (SENEL et al., 2019; SIMUNKOVA et al., 2019). Esses achados vêm ao encontro dos observados no presente estudo para o Complexo 1 e em parte para Complexo 2, uma vez que não foi capaz de clivar o DNA na presença do H₂O₂.

Nossos resultados indicam que o Complexo 1 possui maior capacidade em gerar danos, induzir cortes em fita simples, na presença de H₂O₂ e na fita dupla do DNA. Entretanto, os valores de IC₅₀ demonstrarem que o Complexo 2 foi mais citotóxico nas linhagens tumorais testadas. Como apontado por Paixão et al. (2017), a capacidade dos complexos em penetrar a membrana celular pode estar relacionada a diferenças em suas composições, o que determina suas ações em diferentes mecanismos moleculares.

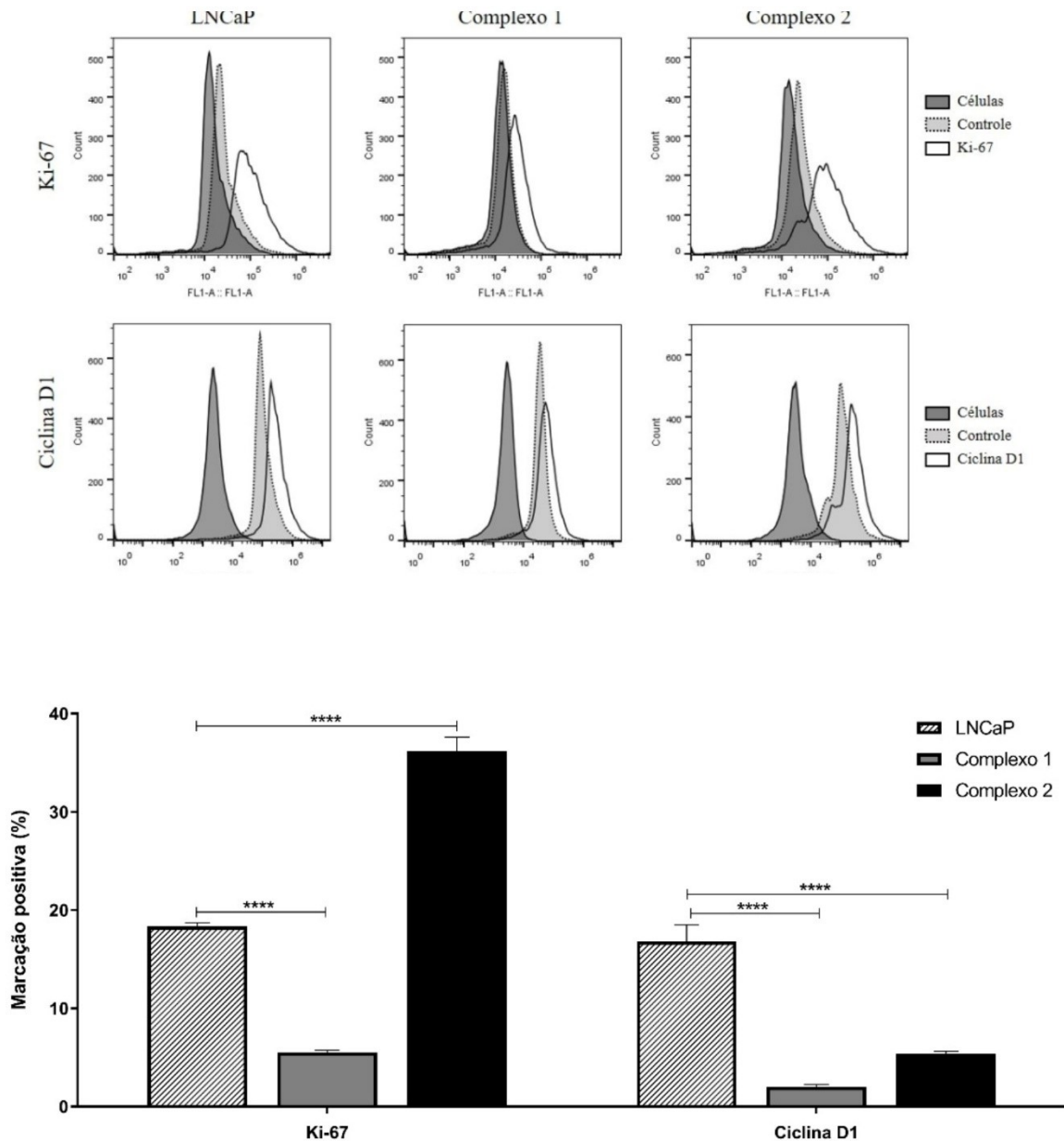
Fato é que os resultados externados sugerem que os Complexos 1 e 2 são capazes de clivar o DNA. Supõe-se que a funcionalidade do anel aromático planar presente na estrutura da 1,10-fenantrolina, associada a complexos de cobre(II), faz

com que os complexos deste estudo atuem como intercalador, sendo capazes de clivar o DNA por meio da quebra de fita simples. Na presença do H₂O₂, além da intercalação, a interação do Complexo 1 com o DNA foi causada por meio do mecanismo de dano oxidativo com a produção de EROs, demonstrando, portanto, atividade de nuclease por dose-dependência com a conversão da forma I (superenrolada) para as formas III (linear) e II (circular). Nesse cenário, outros estudos com complexos de cobre(II) demonstraram resultados que corroboram com os nossos aqui descritos (POLLONI et al., 2019; SHI et al., 2019; SIMUNKOVA et al., 2019; ARJMAND et al., 2020; ROSTAS et al., 2020; PEÑA et al., 2021; RUTA et al., 2021).

9.4. Marcadores de proliferação celular – Ki-67 e Ciclina D1

Finalmente, marcadores relacionados ao ciclo celular foram avaliados, com o intuito de definir as vias através das quais os Complexos agem nas células LNCaP (Figura 7). Pelo ensaio de MTT estas foram as mais sensíveis aos tratamentos. Essas são células hormônio-dependentes sensíveis aos andrógenos, advindas de metástases linfonodais e caracterizam o CaP no estágio inicial. Em cultura, essas células epiteliais aderem de forma isolada em uma monocamada ou agregadas formando *clusters*. Produzem fosfatase ácida prostática (PAP), PSA e fator de crescimento epidérmico (EGF) (SOUZA, 2015). Quando tratadas com o Complexo 1, após 48 horas, houve redução na expressão de Ki-67 e Ciclina D1 nas células LNCaP. Contudo, para o Complexo 2 verificou-se um aumento na expressão de ki-67 e uma redução de Ciclina D1, menos expressiva do que o composto anterior.

Figura 7: Expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e Ciclina D1 na linhagem celular prostática LNCaP, cultivadas por 48 h com os complexos de cobre(II) 1 e 2, (A) Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo. Em cinza escuro células não marcadas, em cinza claro a população de células marcadas apenas com o anticorpo secundário e em branco as células expressando os marcadores em estudo. Gráficos demonstrando a diferença das marcações analisadas. Os dados estão expressos a partir da média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes. Análise estatística feita por ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett, comparando com o controle não tratado. **** $p < 0,0001$.



A nucleoproteína Ki-67 é uma proteína relacionada à síntese de RNA ribossômico, utilizada como biomarcador de proliferação de células tumorais amplamente empregada para avaliar o comportamento biológico de diferentes lesões.

Estudos têm demonstrado que altos níveis de expressão desse biomarcador estão significativamente relacionados ao estágio do tumor e a um pior prognóstico dos pacientes (BYUN et al., 2019; WANG et al., 2020; ZHANG et al., 2021). É uma proteína expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0-1 (células quiescentes) estimando o número de células em proliferação (RICHARDSEN et al., 2017; LIU et al., 2021; ZHANG et al., 2021). No CaP, tem sido relacionada ao escore de Gleason, à sobrevida livre de doença, à invasão do tumor para as vesículas seminais, à recorrência bioquímica ou até mesmo à morte após prostatectomia radical (RICHARDSEN et al., 2017; LIU et al., 2021). Pisani et al. (2020), observaram que os valores de Ki-67 no CaP são extremamente heterogêneos variando em cerca de 1,1 e 10,1%, sendo maior entre os pacientes com a doença localmente avançada. Portanto, sugerimos que o Complexo 1 atue em células hormônio-responsivas de modo a impedir sua progressão. Em analogia aos dados apresentados pelo Complexo 1 nesta pesquisa, o complexo de cobre(II) [Cu (HL) Cl] foi avaliado *in vivo* em tumores sólidos de Ehrlich induzidos em camundongos e sua atividade antitumoral provou ser mediada pela inibição da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 (EL-AARAG et al., 2021). Outros estudos *in vivo* em xenoenxerto com tumores de mama, tratados com um complexo de cobre(II) contendo fenantrolina como ligante, demonstraram redução nos níveis de expressão de proteínas antiapoptóticas e Ki-67, sugerindo que o complexo foi capaz de reduzir a proliferação das células malignas (FAN et al., 2017).

As ciclinas são proteínas reguladoras do ciclo celular das células eucarióticas desempenhando papel importante no surgimento e progressão de tumores. Dentre os tipos conhecidos de ciclinas temos: A, B, C, D, E, F, G e H. A Ciclina D possui 3 subtipos (D1, D2 e D3). Durante o ciclo celular, cada fase é estritamente regulada por um complexo ciclina-CDK. Inicialmente, sinais mitogênicos induzem à síntese das Ciclinas D que se associam ao CDK 4 ou CDK 6 que, por sua vez, fosforilam e inativam a proteína retinoblastoma (pRb), conhecidamente supressora tumoral. (BAI; LI; ZHANG, 2017; ZOU; LIN, 2021). A expressão aberrante ou amplificação da Ciclina D1 promove a proliferação de células malignas, sendo também observada no CaP, o que a torna um marcador de prognóstico e um alvo terapêutico promissor (FU et al., 2004; YANG et al., 2017; ZOU; LIN, 2021).

Estudos preliminares sugerem que no CaP a via da ciclina desempenha um papel importante na evolução da doença para um estado resistente a castração, além

de demonstrar uma interação com os andrógenos (SCHEINBERG et al., 2020; JARDIM et al., 2021). Já foi previamente demonstrado que complexos de cobre(II) conduziram à parada do ciclo celular na fase G0/G1 e à inibição da progressão ao provocarem danos ao DNA (POLLONI et al., 2019). Segundo Chen et al. (2016), outro complexo metálico, o de rutênio(II) (Ru(II)/polipiridil), foi citotóxico a células A549 (carcinoma de pulmão humano), com bloqueio na transição G1/S e redução nos níveis de expressão de Ciclina D1.

Neste contexto, os resultados aqui apresentados, indicam que o Complexo 1 foi ativo à linhagem hormônio-responsiva. Conforme dados já publicados, o andrógeno induz a atividade da telomerase, causa progressão no ciclo celular, aumento da expressão de Ki-67 e Ciclina D1 (KRASNOVSKAYA et al., 2020; JARDIM et al., 2021). Sugerimos, portanto, que a ação do Complexo 1 seja mediada pelo receptor e que estudos adicionais sejam conduzidos para testar a hipótese aqui apresentada.

10. Conclusão

Os Complexos 1 e 2 apresentaram efeito dose-dependente sobre células tumorais prostáticas. Considerando os valores de IC50 e do IS, o Complexo 2 foi mais citotóxico e seletivo para a LNCaP em ambos os períodos de tratamento. As predições por *docking* molecular evidenciaram a possibilidade dos complexos apresentarem afinidade com o DNA e capacidade de interação ao sulco menor, destacando-se o Complexo 1. Além disso, os complexos exibiram atividade nucleásica, demonstrando capacidade de clivar a fita simples do DNA mesmo na ausência de H₂O₂. No entanto, apenas o Complexo 1, na presença de H₂O₂, foi capaz de clivar a fita dupla do DNA plasmidial. O Complexo 1 também reduziu significativamente os níveis de expressão de ki-67 e Ciclina D1, confirmando a redução da proliferação celular na linhagem tumoral LNCaP (hormônio-responsiva).

Novos estudos poderão mensurar os valores do coeficiente de partição dos complexos em estudos para avaliar a lipofilicidade, a capacidade de absorção e permeabilidade da membrana celular e, portanto, elucidar o fato do Complexo 2 apresentar valores de IC50 menores e maior IS no tratamento de 48 h nas linhagens celulares testadas, sendo que nos demais ensaios do presente estudo, o Complexo 1 modulou ativamente vias pró-tumorigênicas.

Por fim, os dados obtidos demonstram que o Complexo 1 obteve melhor resultado no processo de ancoragem por *docking* por uma pequena diferença de energia, demonstrou melhor atividade nucleásica e redução dos níveis de expressão de ki-67 e Ciclina D1. Por outro lado, o Complexo 2 apresentou melhores valores de IC50 e IS no tratamento de 48 h nas linhagens celulares testadas, sugerindo que os Complexos em estudo são candidatos promissores para desenvolvimento de novos fármacos antitumorais

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, L. H. et al. Synthesis, theoretical investigations, biocidal screening, DNA binding, in vitro cytotoxicity and molecular docking of novel Cu (II), Pd (II) and Ag (I) complexes of chlorobenzylidene Schiff base: Promising antibiotic and anticancer agents. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n.12, p. 1-21, 2018. <https://doi.org/10.1002/aoc.4527>

ADAMS, J. The case of scirrhus of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis. **Lancet**, v. 1, p. 393-394, 1853.

ADSULE, S. et al. Novel Schiff Base Copper Complexes of Quinoline-2 Carboxaldehyde as Proteasome Inhibitors in Human Prostate Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 7242-7246, 2006. <https://doi.org/10.1021/jm060712l>

ALTSCHULER, J.; STOCKERT, J. A.; KYPRIANOU, N. Non-Coding RNAs Set a New Phenotypic Frontier in Prostate Cancer Metastasis and Resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1-27, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22042100>

ANDRADE JUNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132005000100011>

AMERICAN CANCER SOCIETY. **CHEMOTHERAPY**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer.html>. Acesso em: 02 ago. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **EARLY DETECTION, DIAGNOSIS, AND STAGING**. 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>. Acesso em: 02 ago. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Hormone Therapy for Prostate Cancer**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating/hormone-therapy.html>. Acesso em: 19 jul. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Initial Treatment of Prostate Cancer, by Stage**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating/by-stage.html>. Acesso em: 19 jul. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Survival Rates for Prostate Cancer**. 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. Acesso em: 19 jul. 2020.

ANNARAJ, B.; BALAKRISHNAN, C.; NEELAKANTAN, M. A. Synthesis, structure information, DNA/BSA binding affinity and in vitro cytotoxic studies of mixed ligand

copper(II) complexes containing a phenylalanine derivative and diimine co-ligands. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 278-291, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.021>

ARJMAND, F. et al. Copper(ii) l/d-valine-(1,10-phen) complexes target human telomeric G-quadruplex motifs and promote site-specific DNA cleavage and cellular cytotoxicity. **Dalton transactions**, v. 49, n. 28, p. 9888-9899, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0DT01527J>

ARTHI, P. et al. Theoretical, biological and in silico studies of pendant-armed heteroleptic copper(II) phenolate complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1161, p. 306-319, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.02.025>

AYDIN, A.; KORKMAZ, Ş. A. Evaluation of Pharmacological Activity of Heterobimetallic Coordination Compounds Containing N, N-Bis (2-hydroxyethyl)-Ethylenediamine on HT29, HeLa, C6 and Vero cells. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 4, p. 2011-2027, 2019. [doi:10.22037/ijpr.2019.1100854](https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100854).

BABA, AI.; CĂTOI, C. **Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy**; 2007. Chapter 3, TUMOR CELL MORPHOLOGY. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>. Acesso em: 26 abr. 2020.

BADEA, M. et al. Improvement in the Pharmacological Profile of Copper Biological Active Complexes by Their Incorporation into Organic or Inorganic Matrix. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 1-27, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25245830>

BALDARI, S.; DI ROCCO, G.; TOIETTA, G. Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1-20, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21031069>

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química.**, v. 7, n. 6, p. 998-2016, 2015. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>

BAYRAKTEPE, D. E. A voltammetric study on drug-DNA interactions: Kinetic and thermodynamic aspects of the relations between the anticancer agent dasatinib and ds-DNA using a pencil lead graphite electrode. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 1-7, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104946>

BECCO, L. et al. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 109, p. 49-56, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010>

BEZERRA, G. B. et al. UM NOVO COMPLEXO HÍBRIDO FORMADO A PARTIR DE PIPLARTINA E O ÍON VANADILA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA

ATIVIDADE BIOLÓGICA. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 998-1002, 2017.
DOI: [10.21577/0100-4042.20170098](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170098)

BOLADERAS, A. et al. Localized prostate cancer treated with external beam radiation therapy: Long-term outcomes at a European comprehensive cancer centre. **Reports of practical oncology and radiotherapy**, v. 21, n. 3, p. 181-187, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.rpor.2015.12.002>

BONTEMPO, Nayara Júnia de Souza. Avaliação do complexo metálico ternário de cobre associado a 2-(4-fluorofenoxi), aceto-hidrazida, perclorato e 1,10 fenantrolina (DRI-12) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. 2020. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.269>.

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>

BRANT, A.; SUNDQUIST, J.; HEMMINKI, K. Risk for incident and fatal prostate cancer in men with a family history of any incident and fatal cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, N. 1, p. 251-256, 2012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr056>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BRAVO-GOMEZ, M. E.; HERNANDEZ DE LA PAZ, A. L.; GRACIA-MORA, I. Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopeínas®) in HCT-15 Xenograft Model. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 57, n. 3, p. 205-211, 2013. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v57i3.208>

BYUN, Seok-Soo et al. Elevated Ki-67 (MIB-1) expression as an independent predictor for unfavorable pathologic outcomes and biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with localized prostate cancer: A propensity score matched study. **PloS one**, v. 14, n. 11, p. 1-9, 2019.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224671>

CARBONETTI, G. et al. Docetaxel/cabazitaxel and fatty acid binding protein 5 inhibitors produce synergistic inhibition of prostate cancer growth. **The Prostate**, v. 80, n. 1, p. 88-98, 2020. <https://doi.org/10.1002/pros.23921>

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300023>

CASTRIGNANO, S. B. O papel das nucleases no laboratório de biologia molecular: vilãs ou aliadas? **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 77, p. 1-5, 2018.

CASTRO, H. A. S. et al. Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2,6 e 10,0 ng/ml. **Radiologia**

Brasileira, v. 44, n. 4, p. 205-209, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-39842011000400003>

CATER, M. A. et al. Increasing Intracellular Bioavailable Copper Selectively Targets Prostate Cancer Cells. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 1621-1631, 2013. <https://doi.org/10.1021/cb400198p>

CHEN, J. et al. Investigation of inducing apoptosis in human lung cancer A549 cells and related mechanism of a ruthenium(II) polypyridyl complex. **Inorganic Chemistry Communications**, Zhanjiang, p. 35–39, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2016.04.025>

CHEN, P. et al. Mechanisms and Disease Pathogenesis Underlying Metal-Induced Oxidative Stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 1-3, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7612172>

CHIKIRA, M.; NG, C. H.; PALANIANDAVAR, M. Interaction of DNA with Simple and Mixed Ligand Copper(II) Complexes of 1,10-Phenanthrolines as Studied by DNA-Fiber EPR Spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22754-22780, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160922754>

CONSTABLE, E. C.; HOUSECROFT, C. E. More hydra than Janus – Non-classical coordination modes in complexes of oligopyridine ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 350, p. 84-104, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.006>

CONSTABLE, E. C.; HOUSECROFT, C. E. The Early Years of 2,2'-Bipyridine-A Ligand in Its Own Lifetime. **Molecules**, v. 24, n. 21, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24213951>

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. Acesso em: 20 maio. 2020.

COUÑAGO, F. et al. Clinical Applications of Molecular Biomarkers in Prostate Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1-24, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12061550>

CRAWFORD, E. D. Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. **Urology**, v. 73, n. 5, p. 4-10, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.03.001>

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, n. 1, p. 69-78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.09.027>

DAMIÃO, R. et al. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.14, p. 80-86, 2015. <https://doi.org/10.12957/rhupe.2015.17931>

DANTAS, E. L. R. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2009v55n3.1619>

DENOYER, D. et al. Copper as a target for prostate cancer therapeutics: copper-ionophore pharmacology and altering systemic copper distribution. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, p. 37064-37080, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9245>

DHAHAGANIA, K. et al. Crystal structure, optical properties, DFT analysis of new morpholine based Schiff base ligands and their copper(II) complexes: DNA, protein docking analyses, antibacterial study and anticancer evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 90, p. 119-130, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.032>

DI FRANCESCO, S. et al. Metabolic Alterations, Aggressive Hormone-Naïve Prostate Cancer and Cardiovascular Disease: A Complex Relationship. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 55, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.3390/medicina55030062>

EL-AARAG, B. et al. New metal complexes derived from diacetylmonoxime-n(4)antipyrinylthiosemicarbazone: Synthesis, characterization and evaluation of antitumor activity against Ehrlich solid tumors induced in mice. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.102993>

EL-DEEN, I. M.; SHOAIR, A. F.; EL-BINDARY, M. A. Synthesis, structural characterization, molecular docking and DNA binding studies of copper complexes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, p. 533-545, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.072>

EPSTEIN, J. I. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. **Modern Pathology**, v. 31, p. 47-63, 2018. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.133>

EPSTEIN, J. I. et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 244-252, 2016. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>

FAN, H. et al. Long Non-Coding RNA DARS-AS1 Contributes to Prostate Cancer Progression Through Regulating the MicroRNA-628-5p/MTDH Axis. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 8363-8377, 2020. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S271021>

FAN, L. et al. Salicylate •phenanthroline copper (II) complex induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Oncotarget, Advance Publications**, v. 8, n. 18, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16161>

FANTONI, N. Z. et al. Polypyridyl-Based Copper Phenanthrene Complexes: A New Type of Stabilized Artificial Chemical Nuclease. **Chemistry A European Journal**, v. 25, n. 1, p. 221-237, 2018. <https://doi.org/10.1002/chem.201804084>

FEREIDOOONNEZHAD, M. et al. Synthesis, structural characterization, biological evaluation and molecular docking studies of new platinum(ii) complexes containing isocyanides. **New Journal Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 8681-8692, 2018. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04819J>

FERRO, M. et al. The emerging role of obesity, diet and lipid metabolism in prostate cancer. **Future Oncology**, v. 13, n. 3, p. 285-293, 2017. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0217>

FONSECA, Alexandra de Souza. **Síntese, caracterização e avaliação de citotoxicidade de novos ligantes não-simétricos e seus complexos mononucleares, homo e heterobinucleares**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. 71 p. 2014.

FOO, K. T. Pathophysiology of clinical benign prostatic hyperplasia. **Asian Journal of Urology**, v. 4, n. 3, p.152-157, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2017.06.003>

FOO, K. T. What is a disease? What is the disease clinical benign prostatic hyperplasia (BPH)? **World Journal of Urology**, v. 37, n. 7, p. 1293-1296, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02691-0>

FRIEDRICH, L. C. et al. Estudo mecanístico das reações Fenton e cupro-Fenton por análise voltamétrica *in situ*. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 7, p. 769-773, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170065>

GANN, P. H. Risk Factors for Prostate Cancer. **Reviews in Urology**, v.4, p. 3-10, 2002.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.

GUYTON, A.C.; HALL, R. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier, 2006.

HEMMINKI, K.; CZENE, K. Attributable Risks of Familial Cancer from the Family-Cancer Database. **Cancer Epidemiol. Biomarkers**, v. 11, n. 1, p. 1638-1644, 2002.

IMAMURA, Y.; SADAR, M. D. Androgen receptor targeted therapies in castration-resistant prostate cancer: Bench to clinic. **International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association**, v. 23, n.8, 2016. <https://doi.org/10.1111/iju.13137>

IZIDORO, L. C. de R. et al. Qualidade de vida em homens submetidos à prostatectomia: revisão integrativa. **Psicologia, Saúde & Doenças**, Lisboa, v. 18, n. 1, p. 186-202, 2017. <https://doi.org/10.15309/17psd180116>

HAMILTON, P. L.; ARYA, D. P. Natural product DNA major groove binders. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 2, p. 134-143, 2012.

<https://doi.org/10.1039/C1NP00054C>

HIRAMATSU, K. et al. High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry. **Science advances**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2019.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.aau0241>

HUMPHREY, P. A. Histopathology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, p. 1-21, 2017.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030411>

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128 p.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Câncer**. 2021. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 19 dez. 2021.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Diagnóstico do Câncer de Próstata**. 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/diagnostico/773/149/>. Acesso em: 25 mai. 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Efeitos Colaterais da Quimioterapia**. 2018. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/efeitos-colaterais-da-quimioterapia/3706/593/>. Acesso em: 05 fev. 2020.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Estadiamento do Câncer de Próstata**. 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estadiamento-do-cancer-de-prostata/1205/289/>. Acesso em: 18 jul. 2020.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Hormonioterapia para Câncer de Próstata**. 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/hormonioterapia-para-cancer-de-prostata/1211/290/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

INSTITUTO ONCOGUIA. **12 sinais de câncer de próstata em estágio avançado**. 2018. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/12-sinais-de-cancer-de-prostata-em-estagio-avancado/12328/7/>. Acesso em: 02 jun. 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Quimioterapia para Câncer de Próstata**. 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-de-prostata/1208/290/>. Acesso em: 18 ago. 2020.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Cancer Tomorrow**. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. Acesso em: 19 dez. 2021.

ITA, K. Percutaneous penetration of anticancer agents: Past, present and future. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1428-1439, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.098>

JARDIM, D. L. et al. Landscape of Cyclin Pathway Genomic Alterations Across 5,356 Prostate Cancers: Implications for Targeted Therapeutics. **The oncologist**, v. 26, n. 4, p. 715-718, 2021). <https://doi.org/10.1002/onco.13694>

JOSHU, C. E. et al. Current or recent smoking is associated with more variable telomere length in prostate stromal cells and prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 78, n. 3, p. 233-238, 2018. <https://doi.org/10.1002/pros.23462>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9ª edição. Santos: Editora Guanabara Koogan, 2012.

KAGE, D. et al. Multi-angle pulse shape detection of scattered light in flow cytometry for label-free cell cycle classification. **Communications biology**, v. 4, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02664-3>

KAISER, A. *et al.* The evolving role of diet in prostate cancer risk and progression. **Current Opinion in Oncology**, v. 31, n. 3, p. 222-229, 2019.

<https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000519>

KAPLAN, J. H.; MARYON, E. B. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. **Biophysical journal**, v. 110, n. 1, p. 7–13, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.025>

KEIZMAN, D. et al. Contemporary experience with ketoconazole in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: clinical factors associated with PSA response and disease progression. **The Prostate**, v. 72, n. 4 p. 461-467, 2012.

<https://doi.org/10.1002/pros.21447>

KHAN, S. et al. Synthesis of novel coumarin nucleus-based DPA drug-like molecular entity: In vitro DNA/Cu(II) binding, DNA cleavage and pro-oxidant mechanism for anticancer action. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. 1-26, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181783>

KHANDURI, S. et al. Evaluation of Prostatic Lesions by Transrectal Ultrasound, Color Doppler, and the Histopathological Correlation. **Cureus**, v. 9, n. 7, p.1-11, 2017.

<https://doi.org/10.7759/cureus.1422>

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, 2004.

<https://doi.org/10.1038/nrd1549>

KOHAAR, I.; PETROVICS, G.; SRIVASTAVA, S. A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1-19, 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20081813>

KOURY, J. C.; OLIVEIRA, C. F.; DONANGELO, C. M. Associação da concentração plasmática de cobre com metaloproteínas cobre-dependentes em atletas de elite. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 4, p. 259-262, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922007000400010>

KRASNOVSKAYA, O. et al. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1-37, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21113965>

LAWRANCE, S. et al. Assessing a modified-AJCC TNM staging system in the New South Wales Cancer Registry, Australia. **BMC cancer**, v. 19, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6062-x>

LEE, K. L.; PEEHL, D. M. Molecular and cellular pathogenesis of benign Prostatic hyperplasia. **The Journal of Urology**, v. 172, p. 1784-1791, 2004. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000133655.71782.14>

LESLIE, S. W. et al. **Prostate Cancer**. [Atualizado em 8 de outubro de 2019]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>.

LI, Dong-Dong et al. Novel Copper Complexes That Inhibit the Proteasome and Trigger Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 10, n. 9, p.1328-1335, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00284>

LIMA, P. Marynella Alves Pereira. Potencial recombinogênico e citotóxico de um complexo metálico ternário de cobre associado a β -Dicetona e 1,10 Fenantrolina (CuBTAPhenClO₄). 2019. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.348>.

LIM, Z. F.; MA, P. C. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. **Journal of Hematology e Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0818-2>

LINDER, S. et al. Enzalutamide therapy for advanced prostate cancer: efficacy, resistance and beyond. **Endocrine-related cancer**, v. 26, n. 1 p. 31-52, 2018. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0289>

LIU, D. et al. Integrative multiplatform molecular profiling of benign prostatic hyperplasia identifies distinct subtypes. **Nature Communications**, v. 11, n. 1987, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15913-6>

LIU, Q. et al. Prognostic and Clinicopathological Value of Ki-67 in Melanoma: A Meta-Analysis. **Frontiers in oncology**, v. 11, P. 1-8, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.737760>

LLASES, M. E.; MORGADA, M. N.; VILA, A. J. Biochemistry of Copper Site Assembly in Heme-Copper Oxidases: A Theme with Variations. **International**

Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 15, p. 1-18, 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20153830>

LOMBARD, A. P. et al. ABCB1 Mediates Cabazitaxel-Docetaxel Cross-Resistance in Advanced Prostate Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n.10, p. 2257-2266, 2017. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0179>

LOPES, J. C. et al. Recombinogenic Effect of the Ternary Complex of Copper(II) with Doxycycline and 1,10-Phenanthroline on Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 531-540, 2018.

<https://doi.org/10.17265/2328-2150/2018.05.014>

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, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.104>

LU, X. et al. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 7, p. 1121-1134, 2020. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41686>

LU, Xin-An et al. Production of lentiviral vectors in suspension cells using low proportion of supercoiled circular plasmid DNA. **Cytotechnology**, v. 72, n. 6, p. 897–905, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00433-4>

LUDWIG, G. D. et al. Modelo preditivo integrado para a presença de câncer de próstata utilizando dados clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 6, p. 430-437, 2016. DOI: [10.1590/0100-69912016006004](https://doi.org/10.1590/0100-69912016006004)

LUGANO, R.; RAMACHANDRAN, M.; DIMBERG, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 9, p. 1745-1770, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>

MACHADO, PEDRO HENRIQUE ALVES. Avaliação in vitro das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2093>.

MALEKSHAH, R. E. et al. Biological studies and computational modeling of two new copper complexes derived from β -diketones and their nano-complexes. **J Journal of Coordination Chemistry**, v. 72, n. 10, p. 1697-1714, 2019.

<https://doi.org/10.1080/00958972.2019.1606422>

MROUEHA, M. et al. Magnetic property, DFT calculation, and biological activity of bis[(μ -2-chloro)chloro(1,10-phenanthroline)copper(II)] complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 53-60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.023>

- MOLINARO, C. et al. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1-27, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12102863>
- MOMTAZMANESH, S. e REZAEI, N. Long Non-Coding RNAs in Diagnosis, Treatment, Prognosis, and Progression of Glioma: A State-of-the-Art Review. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 1-26, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.712786>
- MULLINS, J. K.; LOEB, S. Environmental exposures and prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 30, n. 2, p. 216-219, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.11.014>
- MUNKLEY, J. et al. Androgen-regulated transcription of ESRP2 drives alternative splicing patterns in prostate cancer. **ELife**, v. 8, 2019. <https://doi.org/10.7554/eLife.47678>
- NADER, R.; EL AMM, J., ARAGON-CHING, J. B. Role of chemotherapy in prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, v. 20, n. 3, p. 221-229, 2018. https://doi.org/10.4103/aja.aja_40_17
- NATSAGDORJ, A. et al. CCL2 induces resistance to the antiproliferative effect of cabazitaxel in prostate cancer cells. **Cancer science**, v. 110, n. 1, p. 279-288, 2019. <https://doi.org/10.1111/cas.13876>
- 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>
- NIEDER, et al. Pathologic fracture and metastatic spinal cord compression in patients with prostate cancer and bone metastases. **BMC Urology**, v. 10, n. 23, p. 1-7, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-10-23>
- NIENTIEDT, C. et al. Mutations in BRCA2 and taxane resistance in prostate cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04897-x>
- NYBERG, T. et al. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. **European Urology**, v. 77, n. 1, p. 24-35, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.025>
- OLLAURI-IBÁÑEZ, C. et al. Continuous endoglin (CD105) overexpression disrupts angiogenesis and facilitates tumor cell metastasis. **Angiogenesis**, v. 23, n. 2, p. 231-247, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09703-y>
- OLIVEIRA, V.; AMARAL, J.; FERRAZ, L. HBP e prostatite. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, n. 2, p. 201-207, 2005. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v21i2.10124>
- Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). **Folha informativa – Câncer**. 2020. Disponível em:

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094. Acesso em: 19 dez. 2021.

Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). **OMS propõe medidas para salvar 7 milhões de vidas ameaçadas pelo câncer**. 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6103:oms-propoe-medidas-para-salvar-7-milhoes-de-vidas-ameacadas-pelo-cancer&Itemid=839. Acesso em: 24 abr. 2020.

PAGES, B. J. et al. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4DT02700K>

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, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

PAIXÃO, D. A. et al. Crystal structure, anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of Cu(II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>

PARNHAM, A.: SEREFOGLU, E. C. Retrograde ejaculation, painful ejaculation and hematospermia. **Translational Andrology and Urology**, v. 5, n. 4, p. 592-601, 2016. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.06.05>

PATEL, R. et al. Sprouty2 loss-induced IL6 drives castration-resistant prostate cancer through scavenger receptor B1. **EMBO molecular medicine**, v. 10, n. 4, p. 1-19, 2018. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708347>

PELLEI, M. et al. Synthesis and Cytotoxic Activity Evaluation of New Cu(I) Complexes of Bis(pyrazol-1-yl) Acetate Ligands Functionalized with an NMDA Receptor Antagonist. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072616>

PEÑA, Q. et al. Copper(II) N,N,O-Chelating Complexes as Potential Anticancer Agents. **Inorganic chemistry**, v. 60, n. 5, p. 2939-2952, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02932>

PEREIRA, F. D. C. et al. Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF₆ complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene) **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 149, p. 91–101, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.011>

PERIASAMY, V. S. et al. Induction of Redox-Mediated Cell Death in ER-Positive and ER-Negative Breast Cancer Cells by a Copper(II)-Phenolate Complex: An In Vitro and In Silico Study. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 1-21, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25194504>

PÉREZ-IBAVE, D. C.; BURCIAGA-FLORES, C. H.; ELIZONDO-RIOJAS, M. A. Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. **Cancer Epidemiology**, v. 54, p. 48-55, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.03.009>

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 e Pharmacotherapy**, v. 112, p. 1-8, 2019.

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

POPOVICS, P. et al. Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), AEZS-108 (AN-152), inhibits the growth of DU-145 human castration-resistant prostate cancer in vivo and in vitro through elevating p21 and ROS levels. **Oncotarget**, v. 5, n.12, p. 4567-4578, 2014.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2146>

RAJEBHOSALE, B. S. et al. Aryl-1H-imidazole[4,5f][1,10]phenanthroline Cu(II) complexes: Electrochemical and DNA interaction studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 129-137, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.008>

RAUDENSKA, M. et al. Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in prostate cancer cells by actin accumulation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38199-7>

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63-89, 2019.

<https://doi.org/10.14740/wjon1191>

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49-60, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.024>

REHMANI, N. et al. Copper-mediated DNA damage by the neurotransmitter dopamine and L-DOPA: A pro-oxidant mechanism. **Toxicol in Vitro**, v. 40, p. 336-346, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.020>

RICCI, C. G.; NETZ, P. A. Docking Studies on DNA-Ligand Interactions: Building and Application of a Protocol To Identify the Binding Mode. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, 1925-1935, 2009.

<https://doi.org/10.1021/ci9001537>

RICHARDSEN, E. et al. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in a large prostatectomy cohort. *PloS one*, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186852>

ROBERTAZZI, A. et al. Copper–1,10-Phenanthroline Complexes Binding to DNA: Structural Predictions from Molecular Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 31, p. 10881-10890, 2009.

<https://doi.org/10.1021/jp901210g>

RODRIGUES, 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. 1-8, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114807>

ROSTAS, A. M. et al. Copper(II) Complexes with Mixed Heterocycle Ligands as Promising Antibacterial and Antitumor Species. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 1-22, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25173777>

RUTA, L. L. et al. Biological Activity of Triazolopyrimidine Copper(II) Complexes Modulated by an Auxiliary N-N-Chelating Heterocycle Ligands. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 1-25, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26226772>

SAFI, R. et al. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics. **Cancer research.**, v. 74, n. 20, p. 5819-5831, 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3527>

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 . **Drug Design, Development and Therapy**, v. 64, p. 45-49, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2015.12.013>

SANCTIS, F. et al. Hyperthermic treatment at 56° C induces tumour-specific immune protection in a mouse model of prostate cancer in both prophylactic and therapeutic immunization regimens. **Vaccine**, v. 36, n. 25, p. 3708-3716, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.010>

SARRIS, A. B. et al. Câncer de próstata: uma breve revisão atualizada. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.5380/acd.v19i1.57304>

SCHEINBERG, T. et al. Pharmacodynamics effects of CDK4/6 inhibitor LEE011 (ribociclib) in high-risk, localised prostate cancer: a study protocol for a randomised controlled phase II trial (LEEP study: LEE011 in high-risk, localised Prostate cancer). **BMJ open**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-033667>

SENEL, 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, 2019. <https://doi.org/10.1002/aoc.5122>

SHAHABADI, N. et al. DNA binding affinity of a macrocyclic copper(II) complex: Spectroscopic and molecular docking studies. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 36, n. 8, p. 497-510, 2017.

<https://doi.org/10.1080/15257770.2017.1332370>

SHAKIR, M. et al. Synthesis and characterization of pharmacologically active 18-membered tetraamide macrocyclic complexes of Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II): In vitro antimicrobial, anticancer screening, DNA interaction and docking

studies. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 576-590, 2017.
<https://doi.org/10.1080/15533174.2016.1186091>

SHI, X. et al. Anticancer copper complex with nucleus, mitochondrion and cyclooxygenase-2 as multiple targets. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 190, p. 38-44, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.10.003>

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n.1, p. 7-30, 2020. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>

SILVA, P. P. et al. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414–6424, 2011.
<https://doi.org/10.1021/ic101791r>

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, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.02.010>

SOUZA, G. R.. Estudo do potencial migratório de células tumorais prostáticas expostas à fibronectina. 2015. 1 CD-ROM. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2015.

SOUSA, L. M. et al. DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 511, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>

SOUSA, R. S. et al. Tratamento do câncer de próstata: radioterapia, quimioterapia e plantas medicinais como alternativa terapêutica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 9, p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.25248/reas.e537.2019>

SONG, C. M.; LIM, S. J.; TONG, J.C., Recent advances in computer-aided drug design. **Briefing in Bioinformatics**, v. 10, p. 579-591, 2009.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbp023>

SUN, Y. et al. Efficacy and safety of degarelix in patients with prostate cancer: Results from a phase III study in China. **Asian Journal of Urology**, v. 7, n. 3, p. 301-308, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2019.09.003>

SURESHBABU, P. et al. Phosphoester binding, DNA binding, DNA cleavage and in vitro cytotoxicity studies of simple heteroleptic copper(II) complexes with bidentate ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 71, n. 22, p. 3615-3638, 2018.
<https://doi.org/10.1080/00958972.2018.1527029>

SUZMAN, D. L.; BOIKOS, S. A.; CARDUCCI, M. A. Bone-targeting agents in prostate cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 33, p. 619-628, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s10555-013-9480-2>

TANNOCK, I. F. et al. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer **The new england journal of medicine**, v. 351, p. 1502-1512, 2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040720>

TANVEER, M. et al. Awareness and Self Care Practices of Elderly Men Regarding Prostate Diseases in Karachi, Pakistan. **Cureus**, v. 11, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.7759/cureus.4617>

TISATO, F. et al. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 708-749, 2010. [DOI: 10.1002/med.20174](https://doi.org/10.1002/med.20174)

TOMS, C. et al. Research engagement among black men with prostate cancer. **Ecancermedicalscience**, v. 10, 2016. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.695>

TORTORA, Gerard J.; NIELSEN, Mark T. **Princípios de Anatomia Humana**. 12^a edição. Santos: Editora Guanabara Koogan, 2012.

WADE, C. A.; KYPRIANOU, N. Profiling Prostate Cancer Therapeutic Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 1-19, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19030904>

WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes Development**, v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 2018. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>

WANG, R. et al. Construction and structure studies of DNA-bipyridine complexes as versatile scaffolds for site-specific incorporation of metal ions into DNA. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 37, n. 3, p. 551-561, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1441071>

WANG, Y, A. et al. Molecular tracing of prostate cancer lethality. **Oncogene**, v. 39, n. 50, p. 7225-7238, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01496-5>

WERUTSKY, G. et al. The LACOG-0415 phase II trial: abiraterone acetate and ADT versus apalutamide versus abiraterone acetate and apalutamide in patients with advanced prostate cancer with non-castration testosterone levels. **BMC cancer**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5709-y>

WHITAKER, H. et al. Prostate cancer biology & genomics. **Translational Andrology and Urology**, v. 9, n. 3, p.1481-1491, 2020. <https://doi.org/10.21037/tau.2019.07.17>

World Health Organization: WHO. **Health topics/Cancer**. 2018. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 01 jul. 2020.

XIE, Fang; PENG, Fangyu. Anti-Prostate Cancer Activity of 8-Hydroxyquinoline-2-Carboxaldehyde–Thiosemicarbazide Copper Complexes by Fluorescent Microscopic Imaging. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 6, p. 1937-194, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2133-z>

XIONG, S. et al. Pharmacological Interventions for Bacterial Prostatitis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1-18, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00504>

XU, L. et al. *In vitro* DNA binding studies of lenalidomide using spectroscopic in combination with molecular docking techniques. **Journal of Molecular Structure**, v. 1154, p. 9-18, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.10.029>

YANG, N. et al. Effects of metal ions on the structure and activity of a human anti-cyclin D1 single-chain variable fragment AD5. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 2, p. 1314-1320, 2017. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6756>

ZAORSKY, N. G. et al. The evolution of brachytherapy for prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 14, p. 415-439, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.76>

ZEHRA, S. et al. New tailored substituted benzothiazole Schiff base Cu(II)/Zn(II) antitumor drug entities: effect of substituents on DNA binding profile, antimicrobial and cytotoxic activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 7, p. 1863-1879, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1467794>

ZHANG, Z. et al. 1,10-Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity. **Journal of biological inorganic chemistry**, v. 17, n. 8, p. 1257-1267, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0940-x>

ZHANG, X., et al. Quercetin Enhanced Paclitaxel Therapeutic Effects Towards PC-3 Prostate Cancer Through ER Stress Induction and ROS Production. **OncoTargets and Therapy**, v 13, p. 513-523, 2020. <https://doi.org/10.2147/OTT.S228453>

ZHANG, Y. et al. Preoperative histogram parameters of dynamic contrast-enhanced MRI as a potential imaging biomarker for assessing the expression of Ki-67 in prostate cancer. **Cancer Medicina**, v. 10, n. 13, p. 4240-4249, 2021. <https://doi.org/10.1002/cam4.3912>

ZOU, T.; LIN, Z. The Involvement of Ubiquitination Machinery in Cell Cycle Regulation and Cancer Progression. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 11, p. 1-26, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22115754>