



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

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA E  
GENOTÓXICA DE METALOCOMPLEXOS À BASE DE RÊNIO**

**Aluna: Maria Henriqueta S. Teixeira**

**Orientador: Robson José de Oliveira Junior**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**



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

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA E  
GENOTÓXICA DE METALOCOMPLEXOS À BASE DE RÊNIO**

**Aluna: Maria Henriqueta S. Teixeira**

**Orientador: Robson José de Oliveira Junior**

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

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**

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

T266  
2023 Teixeira, Maria Henriqueta Silvestre, 1979-  
AVALIAÇÃO in vitro DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA E  
GENOTÓXICA DE METALOCOMPLEXOS À BASE DE RÊNIO [recurso  
eletrônico] / Maria Henriqueta Silvestre Teixeira. -  
2023.

Orientadora: Robson José Oliveira Júnior .  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.664>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

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

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Vinte e oito de dezembro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	09:40h	Hora de encerramento:	10:10h
Matrícula do Discente:	12122GBI008				
Nome do Discente:	Maria Henriqueta Silvestre Teixeira				
Título do Trabalho:	Avaliação da potencial atividade citotóxica e genotóxica de metalocomplexos à base de Rênio.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Estrutura, função, caracterização de biomoléculas e compostos bioativos e suas aplicações.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estratégia nanotecnológica para o preparo de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com peptídeos ligantes de células tumorais que direcionam a entrega de Complexos de Cobre (II) bioativos.				

Aos vinte e oito dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e três, às 09:40h, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, 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, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Robson José de Oliveira Júnior (Orientador), Anna Paula de Sá Borges e Alcione da Silva Arruda. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Robson José de Oliveira Júnior apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. 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 28/12/2023, às 11:12, 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 **Anna Paula de Sá Borges, Usuário Externo**, em 28/12/2023, às 11:14, 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 **Alcione da Silva Arruda, Usuário Externo**, em 28/12/2023, às 11:33, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5044470** e o código CRC **EF78309D**.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”.

Albert Einstein

Dedico esse trabalho à minha mãe, meus filhos, meu esposo, família e amigos que me apoiaram, entenderam minhas ausências, me fizeram chegar até aqui e me tornam forte o bastante, para ir mais além!

## **Agradecimentos**

Pela sabedoria Divina da Fé, agradeço a Deus que em sua sempre companhia me deu Laços, fortaleceu minha crença no próximo e em mim, me presenteou de vitórias e conquistas no tempo D'Ele e que todas as bênçãos foram maravilhosas em chegada humilde e de grande valor.

Tão importante em minha vida e trajetória, agradeço a minha Mãe Zita, mulher forte, resiliente e amável, que em sua sabedoria citou em momentos decisivos e de agradecimento Gonçalves Dias, de sua forma que, A VIDA É LUTA RENHIDA, mesmo agora em estado de progresso alzheimer, me estimula com seu olhar forte e fraterno, a ser hoje melhor que ontem e amanhã melhor que hoje e que todo aprendizado nos faz evoluir, te amo infinito Mãezinha. A meu Pai Silvestre que não conheci em físico, mas sinto que está em Luz me cuidando e fortalecendo. A meus filhos Beatriz e Davi que são a razão do meu acordar feliz, que são o meu melhor lado de afeto, que me encham de amor e me torna o amor que sou, que me orgulham pela luz que irradiam e me fazem sentir que tudo está valendo a pena. Ao meu Esposo e companheiro amado Ronei, que está sempre segurando minha mão, mesmo na distância criada nos dias de luta pelo nosso melhor, sinto, sua mão sobre a minha, sinto seu amor e reciprocidade, mesmo não sendo fácil minha família torna possível com sua força dada e é gratificante cada momento que compartilhamos, sempre amo mais.

Aos meus Irmãos Ricardo, Alexandre, Zita, meu genro João Pedro, minha Família e Amigos maravilhosos, meu muito obrigado pela força, incentivo e compreensão.

Ao meu orientador, mestre Professor Doutor Robson José de Oliveira Junior, que em sua grande doação ao saber e compartilhar, se mostra um ser de coração aberto para o ensino, com a generosidade estimulante de orientação, tornando a caminhada dos seus alunos uma brilhante jornada, nos tornando mais capazes a seguir a profissão escolhida com a dedicação que ele o faz, ao mestre com carinho.

Aos meus colegas de laboratório Ana Paula, Clara Maria, Mariana, Ricardo e Pedro, agradeço pela jornada compartilhada, pela compreensão e troca, e pela disposição em dividir. Gratidão.

## Resumo

O câncer é uma doença desafiadora na área da saúde, caracterizada pelo crescimento desordenado de células defeituosas. A busca por tratamentos eficazes é constante devido ao aumento global da incidência e mortalidade por câncer. Os tratamentos convencionais, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia biológica, enfrentam desafios como efeitos colaterais significativos e resistência tumoral. Nesse contexto, os complexos metálicos surgem como uma promissora abordagem terapêutica. A metodologia utilizada no estudo envolveu o cultivo de diferentes linhagens celulares, adenocarcinoma de colo de útero, tecido epitelial de próstata, melanoma murino e fibroblasto murino. Foram testados complexos metálicos para avaliar seu potencial citotóxico através do ensaio de redução da resazurina. O índice de seletividade, foi calculado para verificar a seletividade dos compostos em relação às células tumorais. Foi desenvolvido o ensaio de interação e clivagem de DNA por eletroforese, onde os complexos de rênio foram combinados com DNA plasmidial. O docking molecular analisou a interação dos complexos com macromoléculas de DNA e BSA. A progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo, e um ensaio de apoptose foi conduzido para verificar se os complexos induzem esse processo em células tumorais. O presente estudo investiga os potenciais terapêuticos de três complexos de rênio ( $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$ , e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ ) em células tumorais, com foco na linhagem de câncer cervical HeLa. A avaliação da citotoxicidade revelou que os complexos demonstram uma moderada toxicidade contra as células HeLa, com valores de IC50 inferiores a 50  $\mu\text{M}$ , posicionando-os como candidatos promissores. O Índice de Seletividade (IS) foi calculado para avaliar a capacidade dos complexos em distinguir entre células tumorais e não tumorais. Os resultados indicaram que os três complexos apresentaram IS inferior a dois, sugerindo a necessidade de estratégias adicionais, como entrega direcionada ou bioisosterismo, para aprimorar a seletividade. A abordagem de docking molecular foi empregada para investigar as interações dos complexos com a proteína BSA e com o DNA, considerando uma representação do ambiente biológico. Os resultados do docking revelaram interações favoráveis nos sítios de triptofano 134 e 213 da BSA e também com o sulco menor do DNA, fornecendo insights sobre os possíveis mecanismos de ação dos complexos. A interação com o DNA foi confirmada *in vitro*, uma vez que os complexos são capazes de clivar DNA Plasmidial. Foi observado também que todos os complexos interferem no ciclo celular e são capazes de induzir a apoptose. A comparação dos resultados obtidos com a revisão bibliográfica destacou a relevância dos complexos estudados, pois seus valores de IC50 foram inferiores aos de outros complexos de rênio previamente descritos. Este trabalho não apenas contribui para a avaliação de novos agentes antitumorais, mas também enriquece o conhecimento sobre a interação desses complexos com proteínas e DNA, fundamentando futuras investigações no campo da quimioterapia antitumoral. Em última análise, a pesquisa apresenta uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de compostos de rênio como candidatos terapêuticos inovadores no tratamento do câncer.

**Palavras-chave:** Metalocomplexos; rênio; citotoxicidade; quimiotrapia; câncer.

## Abstract

Cancer is a challenging disease in the healthcare field, characterized by the uncontrolled growth of defective cells. The search for effective treatments is constant due to the global increase in cancer incidence and mortality. Conventional treatments such as surgery, radiotherapy, chemotherapy, and biological therapy face challenges like significant side effects and tumor resistance. In this context, metal complexes emerge as a promising therapeutic approach. The methodology used in the study involved the cultivation of different cell lines, including cervical adenocarcinoma, prostate epithelial tissue, murine melanoma, and murine fibroblast. Metal complexes were tested to evaluate their cytotoxic potential through the resazurin reduction assay. The selectivity index was calculated to verify the compounds' selectivity towards tumor cells. The DNA interaction and cleavage assay by electrophoresis were developed, where rhenium complexes were combined with plasmid DNA. Molecular docking analyzed the interaction of complexes with DNA and BSA macromolecules. Cell cycle progression was evaluated by flow cytometry, and an apoptosis assay was conducted to verify if the complexes induce this process in tumor cells. This study investigates the therapeutic potentials of three rhenium complexes ( $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$ , and  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ ) in tumor cells, focusing on the cervical cancer HeLa lineage. Cytotoxicity assessment revealed that the complexes demonstrate moderate toxicity against HeLa cells, with  $\text{IC}_{50}$  values below  $50 \mu\text{M}$ , positioning them as promising candidates. The Selectivity Index (SI) was calculated to evaluate the complexes' ability to distinguish between tumor and non-tumor cells. The results indicated that all three complexes had an SI below two, suggesting the need for additional strategies such as targeted delivery or bioisosterism to enhance selectivity. Molecular docking was employed to investigate the complexes' interactions with BSA protein and DNA, considering a representation of the biological environment. Docking results revealed favorable interactions at tryptophan 134 and 213 sites of BSA and also with the DNA minor groove, providing insights into possible action mechanisms of the complexes. DNA interaction was confirmed in vitro, as the complexes could cleave Plasmid DNA. It was also observed that all complexes interfere with the cell cycle and induce apoptosis. Comparing the obtained results with the literature review highlighted the relevance of the studied complexes, as their  $\text{IC}_{50}$  values were lower than those of previously described rhenium complexes. This work not only contributes to the evaluation of new antitumor agents but also enriches the knowledge about the interaction of these complexes with proteins and DNA, laying the foundation for future investigations in the field of antitumor chemotherapy. Ultimately, the research presents a promising perspective for the development of rhenium compounds as innovative therapeutic candidates in cancer treatment.

**Keywords:** Metallocomplexes; rhenium; cytotoxicity; chemotherapy; cancer.

## Lista de Figuras e Tabelas

**Figura 1:** Fotomicrografia demonstrando a morfologia de células HeLa após tratamento com os complexos de rênio em diferentes concentrações.

**Figura 2:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 134 na proteína BSA (3V03).

**Figura 3:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 213 na proteína BSA (3V03)

**Figura 4:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 134 na proteína BSA (3V03)

**Figura 5:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 213 na proteína BSA (3V03)

**Figura 6:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 134 na proteína BSA (3V03)

**Figura 7:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 213 na proteína BSA (3V03)

**Figura 8:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e DNA e sua ampliação.

**Figura 9:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e DNA e sua ampliação.

**Figura 10:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  e DNA e sua ampliação.

**Figura 11:** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento.

**Figura 12:** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento.

**Figura 13:** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento.

**Figura 14:** Histograma representativo do tipo de morte celular na linhagem tumoral HeLa. Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 15:** Histograma representativo do tipo de morte celular na linhagem tumoral HeLa. Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 16:** Histograma representativo do tipo de morte celular na linhagem tumoral HeLa. Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 17:** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 18:** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 19:** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 1** –  $\text{IC}_{50}$  das linhagens tumorais e Índice de Seletividade.

**Tabela 2** – Energia das interações entre metalocomplexos e a molécula de BSA nos sítios do triptofano 134 e 213.

**Tabela 3** - Energia das interações entre metalocomplexos e a molécula de DNA e número de ligações de hidrogênio entre as interações.

## Lista de Abreviaturas

B16-F10: Melanoma murino

BAX: BCL-2 associado a proteína X

BSA: Albumina Sérica Bovina

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

Cu: Cobre

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

HeLa: adenocarcinoma humano de colo de útero

IC<sub>50</sub>: Concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IS: índice de seletividade MCF-10A

N: Nitrogênio

NCI-H460: Linhagem de carcinoma de células não pequenas de pulmão

NIH-3T3: Fibroblasto murino OFL

O: Oxigênio

OMS: Organização Mundial da Saúde

P53: Também conhecido como TP53 ou proteína de tumor

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PNT-2: Tecido epitelial de próstata

PPM: Parte Por Milhão

Re: Rênio

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute

S: Enxofre

SFB: Soro fetal bovino

TBE: Tampão tris borato

UICC: União Internacional Contra o Câncer

Xba: Enzimas de Restrição

## Sumário

1	Introdução .....	1
2	Fundamentação Teórica .....	1
2.1	Câncer: Alguns Conceitos .....	1
2.2	Metalocomplexos .....	3
2.3	Complexos de Rênio (I) .....	7
3	Justificativa .....	7
4	Objetivos .....	9
4.2	Objetivo Geral .....	9
4.3	Objetivos Específicos .....	9
5	Materiais e Métodos .....	10
5.1	Manutenção das Linhagens Celulares .....	10
5.2	Complexos Metálicos .....	10
5.3	Ensaio de Redução Da Resazurina .....	10
5.4	Índice de Seletividade (Is) .....	11
5.5	Ensaio de Interação e Clivagem de DNA por Eletroforese .....	12
5.6	Docking Molecular e Preparação Dos Ligantes .....	13
5.7	Análise da Progressão Do Ciclo Celular Por Citometria De Fluxo .....	14
5.8	Ensaio de Apoptose .....	15
6	Resultados e Discussões .....	17
6.1	Citotoxicidade e Índice de Seletividade .....	17
6.2	Docking Molecular .....	20
	<b>6.2.1 Interação com BSA</b> .....	20
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup></b> .....	20
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup></b> .....	22
	<b>[Re (CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup></b> .....	24
3.2.2	Interação com Dna .....	27

	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup></b> .....	27
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup></b> .....	28
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup></b> .....	28
6.3	Clivagem de DNA Plasmidial .....	30
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup></b> .....	30
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup></b> .....	31
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup></b> .....	33
6.4	Indução de Apoptose em Hela.....	35
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup></b> .....	36
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup></b> .....	37
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup></b> .....	38
6.5	Atividade Antiproliferativa em HeLa: Efeitos no Ciclo Celular .....	40
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup></b> .....	40
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup></b> .....	41
	<b>[Re(CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup></b> .....	42
7	Conclusão .....	44
8	Referências .....	46

## **1 INTRODUÇÃO**

A compreensão do câncer e a busca por tratamentos eficazes são desafios constantes na área da saúde. O câncer é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de células defeituosas que se multiplicam desordenadamente, capazes de invadir outras estruturas do organismo e causar uma série de consequências prejudiciais (UPADHYAY, 2021). A incidência e a mortalidade por câncer têm aumentado globalmente, tornando-se um problema de saúde pública

O tratamento do câncer envolve abordagens locais, como cirurgia e radioterapia, e abordagens sistêmicas, como quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica. No entanto, os tratamentos atuais possuem efeitos colaterais significativos e enfrentam o desafio da resistência tumoral (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019).

Nesse contexto, os complexos metálicos têm despertado interesse, pois apresentam propriedades farmacológicas promissoras. Os compostos utilizam-se de vários ligantes, que mostram-se capazes de interagir com diversas estruturas biológicas, incluindo o DNA. Além disso, os complexos metálicos têm demonstrado a capacidade de induzir a morte celular programada, a apoptose (SÁNCHEZ DELGADO *et al.*, 2020). A pesquisa e o desenvolvimento de complexos metálicos direcionados e específicos podem fornecer avanços significativos no tratamento do câncer, oferecendo terapias mais eficientes e mais seguras.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 CÂNCER: ALGUNS CONCEITOS**

O câncer trata-se essencialmente de uma doença associada ao desenvolvimento desordenado de células defeituosas, as quais acabam por inclusive serem capazes de invadir outras estruturas orgânicas do indivíduo que as possui, acarretando problemas funcionais no organismo (UPADHYAY, 2021).

O relato mais antigo sobre casos de câncer em humanos que se tem conhecimento está datado por volta de 3.000 a.C., sendo proveniente de papiros egípcios que ascendem a um livro de Cirurgia de Traumas. Estes relatos são tão antigos que a palavra câncer ainda não era utilizada para descrever o quadro desta

enfermidade, termo que foi adotado por Hipócrates (460-470 a.C.) para descrever essa doença, que costuma se espalhar sem uma forma bem definida, através de projeções que lembram patas de caranguejo que partem do seu torso (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

O câncer, apesar de ser uma patologia conhecida há séculos, tem ocupado posição de destaque nos estudos referentes à saúde por todo o mundo, pois se tornou um problema de saúde pública. Com caráter epidêmico, o câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (ALVES; MAGALHÃES; COELHO, 2017).

A incidência e a mortalidade por câncer, vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco para o câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico. As pesquisas na área oncológica têm aumentado substancialmente nas últimas décadas e esse grande investimento observado, se deve aos resultados de estimativas feitas pela *Union for International Cancer Control* (UICC), que prevê um aumento de 50% número de novos casos de câncer e o dobro do número de mortes (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019).

Além do crescente número de novos casos e mortes devido a tumores, os atuais quimioterápicos possuem fortes efeitos colaterais devidos a sua baixa seletividade, atingindo assim células normais do organismo. Outro fato que tem sido observado um crescente aumento de tumores resistentes aos atuais quimioterápicos. Em virtude desta complexidade associada a pluralidade do câncer o desenvolvimento de um tratamento único e individualizado que seja capaz de efetivamente parar esta replicação desordenada sem que cause maiores sequelas ao paciente, é extremamente importante (ALFAROUK *et al.*, 2015).

As técnicas terapêuticas mais utilizadas podem ser classificadas majoritariamente em dois grupos, o tratamento local, o qual consiste essencialmente em cirurgia e radioterapia, e o outro grupo como sendo o tratamento sistêmico, o qual contam em especial com o uso da quimioterapia (a qual engloba radiofármacos), hormonioterapia, terapia biológica dentre outras (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Em geral estes tratamentos têm como intuito, a remoção direta destas células tumorais do indivíduo, ou ainda, como no caso da radioterapia, realizar a destruição direta destas células com o objetivo de cessar a replicação descontrolada das células tumorais (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Devido a alta complexibilidade encontrada para tratar pessoas que sofrem de câncer, pesquisas por novas drogas, novas combinações de fármacos já existentes que possam garantir maior seletividade, diminuir o processo de resistência tumoral para proporcionar um amplo espectro de ação e aumentar as chances de cura do paciente são imprescindíveis (DEBELA *et al.*, 2021).

Existem diversos tipos de drogas antitumorais, dentre elas os quimioterápicos, capazes de causar quebras nas moléculas de DNA dos tumores, impedindo que as células se repliquem. Dentre estes agentes existem diversos compostos metálicos inorgânicos, como exemplo a cisplatina, cujo uso é amplamente difundido como agente antineoplásico para diversos tipos de tumores (DA SILVA; DA SILVA; BELIAN, 2018).

Sendo assim, pesquisas utilizando complexos metálicos são de extrema importância biotecnológica, pois a identificação de novos ligantes de DNA e de novas rotas de inibição mitótica, diferentes das conhecidas até o momento proporcionará um maior desenvolvimento para se alcançar maior longevidade populacional (KUMAR SINGH *et al.*, 2023).

Além disso, o aumento no surgimento de tumores resistentes à quimioterapia observado na atualidade torna indispensável o desenvolvimento de novas armas contra o câncer, uma vez que o tumor de cada paciente deve ser tratado com individualidade, pois pode responder diferentemente ao tratamento (DEBELA *et al.*, 2021).

## **2.2 METALOCOMPLEXOS**

Os metais têm tido sua aplicabilidade na medicina desde tempos primordiais, por mais que inicialmente não se fosse conhecido seus mecanismos de ação, toxicidade ou qualquer propriedade química inerente a estes compostos. É possível encontrar na literatura apontamentos que povos antigos como assírios, chineses e egípcios empregavam a utilização de compostos metálicos para tratamento de doenças, esses povos anciões utilizavam o cinábrio, um minério que é rico em sulfeto de mercúrio para tratar doentes. Com o avanço da ciência teórica observada

em civilizações como Grécia e Roma antiga, é possível encontrar registros da utilização do minério rico em sais de mercúrio para o tratamento de tracomas e doenças venéreas, evidenciando a importância dos metais para o tratamento da saúde humana (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

Estas interações biológicas derivadas do uso de metais têm incentivado o desenvolvimento de metalofármacos ao longo das últimas décadas. Entretanto, é válido destacar que os metais já vêm sendo utilizados para finalidades terapêuticas a tempos, como Rosenberg e seus colaboradores que ainda em 1965, descobriram a característica de atividade antitumoral do complexo cisplatina. Esta descoberta foi um grande marco e fomentou ainda mais a pesquisa da aplicabilidade de metalocomplexos com propriedades farmacológicas (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

A literatura descreve que moléculas ativas biologicamente, quando coordenadas a metais são capazes de originar complexos ainda mais potentes. Estes metais, em especial metais de transição, tem apresentado diversas vantagens quando comparados aos fármacos mais comuns baseados unicamente em compostos orgânicos (YADAV *et al.*, 2023). Os metais, por serem bons aceptores de elétrons, são capazes de interagir e se coordenar com moléculas ricas em elétrons, como proteínas e DNA (LIU; SADLER, 2011; PERMYAKOV, 2021).

Esta capacidade de troca entre o metal e o ligante, permite que este seja capaz de interagir e se coordenar com diferentes estruturas biológicas, o que por vezes condiciona um aumento significativo de lipofilicidade do fármaco quando este é coordenado com o metalocomplexos, este efeito por sua vez facilita a passagem destes compostos por membranas biológicas, potencializando sua efetividade, também podendo ser usados a formação de sais aumentando a solubilidade de compostos existentes (AINUROFIQ *et al.*, 2021).

Estudos demonstraram que metalocomplexos podem ser uma alternativa para tratamento de bacterioses, viroses e micoses resistentes à medicamentos de base orgânica, graças a configuração eletrônica dos metais é possível usá-los para melhorar moléculas terapêuticas, inclusive melhorar sua solubilidade em fluidos biológicos, aumentando a ação em microrganismos resistentes a tratamentos com antibióticos convencionais (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020).

Alguns metalocomplexos detêm um baixo peso molecular, apresentam uma carga neutra e solubilidade em água, característica que os torna solúveis em quase

todos os meios, sendo inclusive capazes de atravessar membranas biológicas por meio de difusão passiva (AINUROFIQ *et al.*, 2021). A literatura destaca ainda que, dentre as atividades biológicas que podem ser desempenhadas pelos compostos metalocomplexos estão: fungicida, bactericida e antiviral (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020).

Metalocomplexos como Cu II com hidrazida de ácido de 4-fluorofenoacético e fenantrolina tem sua funcionalidade tal qual nucleases e sintéticas, sendo assim, estes se mostram muito úteis para a manipulação no DNA (MACHADO *et al.*, 2021).

A compreensão das interações entre drogas e o DNA é de extrema importância, uma vez que substâncias genotóxicas podem causar danos ao material genético e desencadear consequências prejudiciais para a saúde. É essencial identificar se uma droga é capaz de interagir com o DNA, pois isso pode influenciar na eficácia do tratamento, na toxicidade e nos efeitos colaterais. Além disso, compreender o tipo de indução de morte por apoptose gerada por complexos metálicos é crucial para desenvolver terapias mais direcionadas e eficientes. Os complexos metálicos têm demonstrado a capacidade de induzir a morte celular programada por apoptose, um processo essencial para o equilíbrio e a renovação das células. O estudo de Thorp-Greenwood desenvolvido com foco na molécula de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{PyR})]^+$  ressalta a relevância de considerar a localização celular na concepção de sondas para aplicação *in vivo*, fornecendo indicativos valiosos para o desenvolvimento de terapias direcionadas e específicas para o tratamento de doenças relacionadas ao DNA e ao comportamento celular (THORP-GREENWOOD *et al.*, 2012).

Com relação a apoptose induzida é possível citar Machado (2019), que em seu trabalho afirma que é possível inferir que o cobre, quando em desequilíbrio no metabolismo celular, tem a capacidade de interagir com o DNA de forma não covalente, intercalando-se e ligando-se eletrostaticamente aos sulcos dessa molécula. Essa interação pode levar à clivagem do DNA, bloquear a replicação e interromper o ciclo celular, resultando na indução do apoptose (MACHADO *et al.*, 2021).

Neste caso, tem o cobre, que por ser um elemento naturalmente presente no organismo e apresentar menor toxicidade em comparação a outros metais, juntamente com sua capacidade de interagir com o DNA e potencial para clivar essa molécula, torna-se um alvo promissor no desenvolvimento de metalofármacos com

potencial antineoplásico. Além disso, os complexos de cobre da família das casiopeínas têm mostrado eficácia superior aos metalocomplexos atualmente utilizados na quimioterapia, o que ressalta a importância do estudo de novos metalocomplexos de cobre (II) como potenciais agentes terapêuticos contra o câncer (PAIXÃO *et al.*, 2017).

Voltando a perspectiva do rênio é possível retratar os compostos de óxido de rênio(V) envolvendo diversas tiossemicarbazonas de coordenação tridentada, sejam elas S,N,S- ou N,N,S tridentadas, com a fórmula geral  $[ReOCl(L)]$ , a qual demonstra uma notável inibição no crescimento das células de câncer de mama (MCF-7) em ensaios *in vitro*. Além disso, os complexos de óxido de rênio(V) contendo outros ligantes tridentados também apresentaram atividade contra as células de hepatoma de rato (MG-22A) (SHAHABADI; NEMATI; HOSSEINIDOUST, 2017).

Neste sentido é possível destacar ainda complexos de rênio(I) e tecnécio(I) apresentam notável semelhança em relação a propriedades físicas, como tamanho e hidrofobicidade, entre outras características (BAUER *et al.*, 2019). Pesquisas indicam que, devido a essa afinidade, compostos de rênio(I) não radioativos, que contêm o grupo fac- $[Re(CO)_3]^+$ , têm sido empregados como substitutos de tecnécio em estudos modelares (MOURA *et al.*, 2022).

Maia (2017) desenvolveu um estudo avaliando justamente a questão comparativa do nível de citotoxicidade do rênio (I) em comparação com o cobalto (III). Neste estudo foi identificada a potencial viabilidade da aplicação destes complexos mediante a sua atividade antiproliferativa frente as células de carcinoma pulmonar humano, NCI-H460, além da identificação da interferência direta deste no processo de angiogênese de células cancerígenas (VARGAS; MAIA, 2017)

Os complexos à base de rênio têm ganhado destaque graças a corrida para desenvolver novos antibióticos e quimioterápicos, algumas propriedades desse metal de transição tem colocado ele em destaque, por ser um metal mais barato que a platina, por possuir propriedades luminescentes que podem ser utilizados em processos na medicina teranóstica (complexos de rênio tricarbonil), além de serem termoestáveis, não se degradando facilmente. Essas propriedades são demonstradas em diversos estudos, inclusive contra células tumorais humanas de colo de útero e de mama (SCHINDLER; ZOBEL, 2022).

Mediante estes resultados é notado como existe uma relação direta da aplicabilidade do rênio dentro do processo de tratamento de células cancerígenas, o que deve ser estudado para possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos que induzem este processo. É importante ainda levantar o quão viável é a aplicação deste do ponto de vista da prática, ou seja, delimitar quais as condições ideais que propiciem a melhor eficácia do Rênio no tratamento. Neste sentido, os objetivos do presente trabalho se baseiam justamente nesta perspectiva, de identificar o quão efetivo é a aplicação de rênio no tratamento de câncer e ainda, quais as condições ideais para sua melhor efetividade neste tratamento.

### 2.3 COMPLEXOS DE RÊNIO (I)

O rênio, juntamente com o manganês e o tecnécio, faz parte do Grupo 7 da tabela periódica. O elemento rênio ( $Z = 75$ , configuração eletrônica  $[\text{Xe}]4f^{14}5d^56s^2$ ) é um metal extremamente escasso, com uma presença terrestre de apenas  $7 \times 10^{-8} \%$  (0,0007 ppm), geralmente associado ao molibdênio. O rênio é um metal que exhibe uma notável resistência à corrosão e uma elevada capacidade refratária.

Diferentemente do tecnécio, um elemento artificial cujo número atômico é dependente do isótopo produzido, o rênio possui dois isótopos de ocorrência natural, com proporções relativas em amostras terrestres de 37,40% para o  $^{185}\text{Re}$  e 62,60% para o  $^{187}\text{Re}$ . Existem complexos de rênio conhecidos nos quais o metal assume estados de oxidação que variam de 0 ( $d^5$ ) a +7 ( $d^0$ ), sendo que para os estados de oxidação mais elevados (+3 a +7), os complexos fluoro e oxo-rênio são predominantes (BAUER *et al.*, 2019).

Fernandes (2013) indicam como o rênio é um dos metais que exibem características nucleares de decaimento apropriadas para serem utilizadas em radioterapia. Os isótopos radioativos (emissores de partículas ionizantes  $\beta^-$ ) relevantes em medicina nuclear são o  $^{186}\text{Re}$  (com uma meia-vida de 90 horas) e o  $^{188}\text{Re}$  (com uma meia-vida de 17 horas) (ARAÚJO FERNANDES, 2013).

Alguns estudos sobre a síntese e caracterização de complexos de tricarbonilrênio(I) com bases de *Schiff* já foram desenvolvidos, e surgem como uma nova aposta devido a possibilidade de novas aplicações, graças a propriedades fotofísicas, que pode ajudar no diagnóstico e aumentar a toxicidade contra as

células tumorais frente a utilização destes complexos (HUANG; WILSON, 2021). Contudo, a eficácia antitumoral desses compostos foi pouco explorada. Complexos de tricarbonilrênio(I) contendo salicilaldeído semicarbazonas N,N-disubstituídas demonstraram uma atividade citotóxica significativa contra células de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4) e não apresentaram citotoxicidade contra células saudáveis de fibroblastos humanos, segundo o apontado no estudo desenvolvido por (HO *et al.*, 2013)

Os complexos de rênio são tecnicamente simples de serem sintetizados, possuem boa lipofiliabilidade o que ajuda em sua distribuição para células tumorais, também possuem interação com proteínas e DNA, sendo considerados bons candidatos a quimioterápicos contra células tumorais. Alguns trabalhos já demonstraram a sua utilização contra células de câncer de glioblastoma, próstata, câncer de mama entre outras, devido a suas propriedades de interesse e facilidade de trabalhar as posições dos ligantes, os complexos de rênio têm ganhado cada vez mais visibilidade e impulsionamento para a síntese e testes de novos complexos (HUANG; WILSON, 2021; KONKANKIT *et al.*, 2018; LIEW *et al.*, 2020; MKHATSHWA *et al.*, 2021).

### 3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento do presente trabalho é fundamentado na busca contínua por agentes terapêuticos eficazes e seletivos no tratamento do câncer, uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A necessidade premente de explorar novas moléculas com propriedades citotóxicas contra células tumorais, aliada à importância de compreender os mecanismos de ação dessas moléculas, motiva a investigação dos complexos de rênio  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ .

A linhagem de câncer cervical HeLa foi escolhida como alvo principal, considerando sua relevância clínica e a necessidade de novas abordagens terapêuticas para esse tipo específico de câncer. A determinação do  $\text{IC}_{50}$  nessas células fornece informações cruciais sobre a eficácia citotóxica dos complexos, sendo uma etapa essencial na avaliação de seu potencial como agentes anticancerígenos.

A análise do índice de seletividade, amplia a compreensão sobre a especificidade dos complexos, considerando não apenas a toxicidade para células cancerígenas, mas também a preservação das células não tumorais. A identificação de complexos que apresentam IS adequado é vital para direcionar pesquisas futuras e potencializar a eficácia terapêutica, minimizando efeitos adversos em células saudáveis.

A incorporação da técnica de docking molecular amplia significativamente a compreensão dos mecanismos de interação entre os complexos e a proteína BSA. A escolha da BSA como modelo se justifica pela sua participação crucial no transporte de ligantes no corpo, e a investigação dos sítios de triptofano 134 e 213 oferece insights valiosos sobre os pontos de interação mais relevantes.

Os resultados obtidos neste estudo não apenas contribuem para a avaliação do potencial terapêutico desses complexos específicos, mas também enriquecem o conhecimento científico sobre a relação estrutura-atividade de compostos de rênio em contextos antitumorais. Além disso, ao confrontar os resultados com a revisão bibliográfica, o trabalho proporciona uma perspectiva comparativa, auxiliando na contextualização e interpretação dos dados.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar atividade antitumoral *in silico* e *in vitro* de metalocomplexos à base de rênio.

### **4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a citotoxicidade dos complexos de rênio  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  em diferentes linhagens celulares, com foco na linhagem de câncer cervical HeLa, por meio da determinação do  $\text{IC}_{50}$ .
- Calcular o Índice de Seletividade (IS) para os complexos, avaliando sua seletividade entre células tumorais e não tumorais, e discutir as implicações terapêuticas desses índices.

- Realizar análises de docking molecular para investigar as interações entre os complexos e a proteína albumina sérica bovina (BSA), especificamente nos sítios de triptofano 134 e 213, e com o DNA, identificando padrões e correlações entre a estrutura dos complexos e a afinidade com as biomoléculas estudadas utilizando ensaios *in silico*.
- Testar a interação *in vitro* com a molécula de DNA plasmideal.
- Verificar a influência destes metalocomplexos no ciclo celular.
- Desvendar o mecanismo de morte celular disparado pelos complexos.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES**

Todas as linhagens celulares, PNT2, B16-F10 e NIH/3T3, foram cultivadas *in vitro*, utilizando garrafas de cultura com volume de 25 cm<sup>2</sup> contendo em seu interior meio RPMI-1640 (Gibco®, Paisley, UK) suplementado com 2 mM/L de glutamina, 25 mM HEPES, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina, (Sigma Chemical Co.®, St. Louis, USA), 10% de volume de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab®, Campinas, Brasil). Todas as garrafas foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% em temperatura de 37°C.

### **5.2 COMPLEXOS METÁLICOS**

Os metalocomplexos de rênio, foram sintetizados pelo laboratório do Prof. Dr. Antônio Otávio Patrocínio do Instituto de Química (IQ), da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica.

### **5.3 ENSAIO DE REDUÇÃO DA RESAZURINA**

Para estimar o potencial citotóxico dos metalocomplexos foram realizados testes de viabilidade pela redução da resazurina à resorufina. Em uma microplaca estéril de 96 poços, as diversas linhagens celulares na concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço. Foram cultivadas em 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% soro fetal bovino soro fetal bovino (SFB). Os complexos

metálicos foram diluídos, em concentrações de 1 a 100 µM, e foram testados nas linhagens celulares.

Armazenou-se as microplacas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37 °C por 24 horas. Após 20 horas de tratamento, a cada poço da microplaca foi adicionado 20 µL de reagente colorimétrico, Alamar Blue, com intuito de realizar a leitura em um espectrofotômetro de microplaca, ao completar 24 horas, e foi utilizado os comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{(O_2 \times A1)(O1 \times A2)}{(O2 \times P1)(O1 \times P2)} \times 100$$

Na qual: A1 = absorbância das células tratadas à 570nm; A2 = absorbância das células tratadas à 600nm; O1 = coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 570nm (pré-determinado em 117216); O<sub>2</sub> = valor de coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 600nm (pré-determinado em 80586); P1 = valores de absorbância do controle negativo à 570nm; P2 = valores de absorbância do controle negativo à 600nm. Foram utilizados para este ensaio as linhagens PNT2, B16-F10 e NIH/3T3.

#### 5.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Para verificar a seletividade da formulação frente às células tumorais, foi necessário calcular o índice de seletividade (IS), que é dado pela relação entre as concentrações necessárias para reduzir 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) das células não tumorais em relação as tumorais. Utilizou-se a seguinte fórmula (PAIXÃO *et al.*, 2020):

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

Onde, IS ≥ 2 qualificam o composto como mais seletivo para as linhagens tumorais, ou seja, mata o dobro de células neoplásicas frente às células saudáveis e serão considerados promissores.

No que tange às análises do IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad

Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA), a partir de uma regressão não linear, em que a porcentagem da viabilidade celular foi determinada como uma função logarítmica de base 10 das concentrações testadas, assumindo um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5.5 ENSAIO DE INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR ELETROFORESE

A clivagem plasmidial permite identificar qual a forma que o DNA passa a assumir após o tratamento com o composto estudado, o que permite identificar se este de alguma forma é capaz de realizar um processo de desnaturação, convertendo a estrutura do DNA de uma célula que antes tinha uma forma predominante para uma forma diferente. Machado *et al.* (2021) que desenvolveram seu trabalho com o uso de complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  com ácido 4fluorophenoxyacetic para o tratamento de células cancerígenas, indica como este processo permite determinar uma das possíveis formas de ação do complexo na eliminação de células cancerígenas.

No presente estudo a clivagem é aplicada para determinar uma das possíveis formas de ação dos metalocomplexos a base de rênio, identificando se a desnaturação da molécula de DNA é a forma com que este efetivamente elimina as células cancerígenas. Os tópicos abaixo apresentam os resultados obtidos dos diferentes tratamentos adotados.

Para avaliar a interação do complexo com o DNA, os complexos de Rênio ( $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  foram combinados com DNA plasmidial. O plasmídeo extraído foi utilizado de modo que foram preparadas 13 conjunto de misturas (volume total de  $20\mu\text{L}$ ) contendo  $30\text{ng}/\mu\text{L}$  do plasmídeo, o tratamento em concentrações de  $40\mu\text{M}$  e  $80\mu\text{M}$  em PBS 1X, para os complexos ( $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $10\mu\text{M}$  e  $20\mu\text{M}$ , para o complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , contendo ou não dimetilsulfóxido (DMSO – 0,5%), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  – 15mM) e ambos juntos.

O plasmídeo também foi avaliado na presença dos controles, isto é, sem o tratamento, na presença da enzima de restrição adequada (Nhe I) e na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As misturas das reações foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 12 horas e

posteriormente foram adicionados 3 $\mu$ L do tampão de carga (loader - 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 30% de glicerol, 10 mM de EDTA).

As amostras foram submetidas a eletroforese, em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,05% (10  $\mu$ g/mL) em tampão Tris-borato 90mM, pH 8,0, EDTA 20 mM (0,5X TBE). O gel foi submetido a 80 volts por três horas e fotografado sob luz ultravioleta. A quantificação das bandas foi realizada pelo software ImageJ versão 1.53k (Java 1.8.0\_172).

A clivagem foi realizada considerando três formas distintas, sendo a Forma I super enrolada, Forma II circular e a Forma III linear.

## 5.6 DOCKING MOLECULAR E PREPARAÇÃO DOS LIGANTES

O docking molecular é utilizado para identificar como ocorre a interação de ligação entre as moléculas de compostos distintos. Sua aplicabilidade está relacionada a identificar como o composto estudado interage com um outro composto de interesse. Schindler (2022) indica como a aplicação do método possibilita identificar se há ou não uma interação que torne possível uma aplicabilidade prática do composto antes que se dê continuidade aos testes.

Uma vez identificada esta interação e o nível de interação que há entre os compostos, é enfim possível desenvolver testes mais robustos para traçar as vias de interação bem como o real efeito derivado da interação destes compostos, tal qual reforça Tarai et al. (2023), que em seu trabalho desenvolveu o docking molecular para atestar o comportamento citotóxico da tiossemicarbazonas baseadas em complexos de Ni(II). No caso do presente trabalho foi desenvolvido de forma semelhante, mas buscando identificar este processo com metalocomplexos de rênio.

Os ligantes foram desenhados no software Avogadro versão 1.1.1 e salvos no formato. mol2, após otimização estrutural. Os arquivos foram posteriormente configurados no software Avogadro, por meio da ferramenta Extensions, para obter uma geometria otimizada no campo de força UFF (Universal Force Field). No software Auto Dock 1.5.7 os ligantes foram preparados, deletando possíveis moléculas de água e foram adicionados hidrogênios polares e carga de Gasteiger.

O estudo de *docking* molecular dos complexos de rênio foram realizados usando o software Auto Dock 1.5.7 com macromoléculas de DNA e BSA. A estrutura

cristalina do DNA (126D), na sequência CATGGCCATG, com resolução de 2 Å e BSA (3V03), com resolução de 2,7 Å, foram obtidas a partir da Protein Data Bank (www.rcsb.org). Todas as moléculas de água ao redor do DNA/BSA foram removidas e os átomos de hidrogênio polares adicionados na estrutura assim como as cargas de Kollman.

Para estudar o estado de ligação, em um *docking* as cegas, o DNA foi analisado em uma caixa de varredura (grid box) medindo 62x58x96 para os três complexos. Já a BSA foi analisada levando em conta a localização de dois possíveis sítios de ligação, na região do triptofano 134, de coordenadas  $x = 45.989286$ ,  $y = 36.667143$  e  $z = 25.500143$  e do triptofano 213, de coordenadas  $x = 101.169786$ ,  $y = 28.225500$  e  $z = 19.778429$ .

Para o estudo de acoplagem do BSA foi analisado em todos os dois sítios em uma caixa de varredura medindo 70x76x78. Para realização dos cálculos de ligações, entre ligante e receptor, foram utilizados algoritmos genéticos lamarkianos, e o número de algoritmos genéticos executados foi definido para 100 e o número de avaliações foi definido para 2,5 milhões (KHEIRDOOSH *et al.*, 2020). As imagens das interações DNA/BSA foram produzidas pelo Discovery Studio Visualizer (Biovia, 2021) e pelo software Maestro Schrödinger, versão 13.6.122.

## 5.7 ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A fim de investigar se os metalocomplexos de rênio detinham atividade antiproliferativa na linhagem tumoral HeLA ( $2 \times 10^5$  células/mL) foi incubada em 1000  $\mu$ L de meio RPMI-1640 suplementado em uma placa estéril de 6 poços. Foram analisadas as seguintes concentrações das metalodroga,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$ : 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 40  $\mu$ M; e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ : 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M. As células foram incubadas com o tratamento por 24h.

Dado o tempo de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm, gerando um pellet, que foi lavado em PBS1x (procedimento repetido duas vezes), e fixado em solução de etanol (70% em PBS 1x). As amostras foram armazenadas a 4°C overnight. Após esta etapa, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm e o pellet foi ressuspendido em PBS 1x contendo 10  $\mu$ g/mL de iodeto de propídeo e 100  $\mu$ g/mL de RNase (afim de remover a contaminação por

RNA e não interferir no experimento, permitindo que apenas o DNA fosse corado). As células foram incubadas no escuro por 45 minutos a 37°C e logo após esta etapa as amostras foram levadas para análise por citometro de fluxo ACCURI (BD). A leitura foi realizada no canal FL2. Os dados resultantes da citometria foram analisados pelo software FloJo (versão 10).

## 5.8 ENSAIO DE APOPTOSE

A indução do apoptose representa um mecanismo fundamental no tratamento do câncer. A utilização de compostos que promovem a morte celular por apoptose é uma estratégia desejável, uma vez que esta abordagem assegura que, com a ocorrência da morte celular, a célula comprometida não exerça mais atividade nociva no organismo, como o processo inflamatório induzido pela necrose, destacando-se como uma medida eficaz no contexto terapêutico (SCHINDLER *et al.*, 2022).

Algo válido a salientar, é a existência de estudos que apontam a efetividade do rênio no tratamento de câncer por indução a apoptose, tal qual o apontado no estudo desenvolvido por Bauer *et al.* (2019). Este estudo buscou identificar o potencial terapêutico de organometálicos e complexos de rênio no tratamento de câncer. O estudo demonstrou o elevado potencial do rênio em induzir a apoptose, o que demonstra a aplicabilidade de complexos deste metal de transição no tratamento do câncer.

Para verificar se os metalocomplexos de rênio induzem apoptose, a linhagem HeLa ( $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) foi adicionado em 1000 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 6 poços. As concentrações utilizadas no tratamento dos complexos  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  foram 10 µM 20 µM e 40 µM, e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ : foram 5 µM, 10 µM e 20 µM. As células foram tratadas por 24 horas. Após o tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm e o pellet foi lavado em PBS 1x e centrifugado.

O pellet foi novamente ressuspendido em 100 µL da solução de tampão de ligação de anexina V (Kit I de Detecção de Apoptose PE Anexina V - BD) na proporção 1:10 de água destilada e em seguida foi adicionado 5 ul de anexina V PE e 5 uL de 7-AAD (Kit de Detecção de Apoptose Anexina V PE - BD). As amostras

foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Logo após, as amostras foram analisadas no citômetro ACURRI C6 (BD) nos canais FITC e PE.

Os dados obtidos foram analisados a partir do software Kaluza. A indução de apoptose pelos complexos na linhagem HeLa também foram observadas através de imagens capturadas no microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A viabilidade celular das linhagens celulares HeLa, PNT2, B16F10 e NIH-3T3 após tratamento com os complexos de rênio foi avaliada pelo método de redução da resazurina à resafurina. A resazurina é um indicador de viabilidade celular frequentemente utilizado em ensaios para avaliar a atividade metabólica e a viabilidade de células. A redução da resazurina é um processo bioquímico que ocorre em células metabolicamente ativas, indicando a presença de células vivas e viáveis.

O método de redução da resazurina é comumente empregado em ensaios de citotoxicidade, testes de viabilidade celular e avaliação do crescimento celular. O princípio básico do método de redução da resazurina envolve a capacidade das células metabolicamente ativas de converter a resazurina, que é uma substância não fluorescente e incolor, em resorufina, um produto fluorescente de coloração vermelha.

A reação de redução ocorre principalmente nas mitocôndrias das células, onde a resazurina é transformada em resorufina pela ação das enzimas redutases presentes no interior das células. Os três complexos avaliados apresentaram citotoxicidade moderada para a linhagem de câncer cervical HeLa, com  $IC_{50}$  inferior a 50  $\mu M$  e a morfologia desta linhagem após o tratamento é apresentada na figura 1.

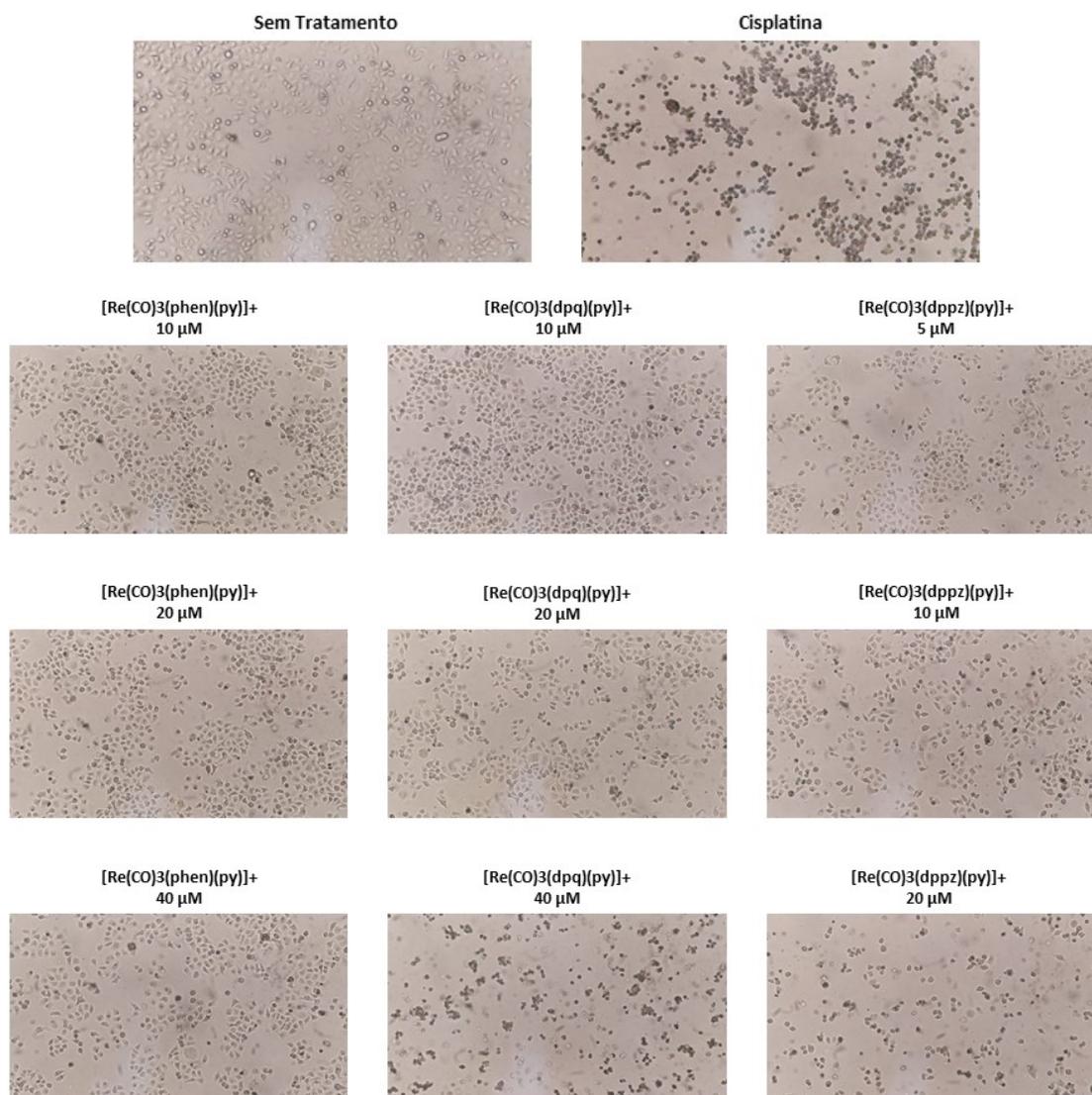
No entanto, o complexo  $[Re(CO)_3(phen)(py)]^+$  apresentou  $IC_{50}$  inferior a 100  $\mu M$  para todas as demais linhagens celulares testadas, não sendo possível calcular seu índice de seletividade. O complexo  $[Re(CO)_3(dpq)(py)]^+$  apresentou  $IC_{50}$  de 22,68  $\mu M$  para a linhagem HeLa com índice de seletividade de 1,84, enquanto que para a linhagem B16F10 o  $IC_{50}$  foi de 43,61  $\mu M$  com Índice de Seletividade de 1,44. Já o complexo  $[Re(CO)_3(dppz)(py)]^+$  apresentou  $IC_{50}$  de 8,94  $\mu M$  para HeLa com Índice de seletividade de 1,82, enquanto que para a linhagem B16F10 o  $IC_{50}$  foi de 11,51  $\mu M$  e índice de seletividade 1,62 (Tabela 1).

Dentre os três complexos estudados o  $[Re(CO)_3(dppz)(py)]^+$  apresentou maior potencial citotóxico para as quatro linhagens celulares estudadas, uma vez que obteve os menores  $IC_{50}$ . O índice de seletividade (IS) foi calculado para avaliar

a seletividade dos compostos em relação às células tumorais e saudáveis. O IS é a relação entre as concentrações necessárias para reduzir a viabilidade celular em 50% nas células não tumorais e nas células tumorais.

Um IS maior ou igual a 2 indica que o composto é mais seletivo para as células tumorais, sendo potencialmente promissor para terapia. Esse cálculo permite determinar a eficácia seletiva dos compostos em alvejar as células tumorais (PEREIRA *et al.*, 2015). A análise do IS é crucial para entender a seletividade dos compostos em direção às células tumorais versus células normais. Os IS obtidos para os 3 complexos foram inferiores a dois, o que indica que estratégias de entrega direcionada ou de bioisosterismo devem ser trabalhadas para a melhoria da seletividade do complexo.

De acordo com Bauer *et al.* (2019), compostos cujos valores de IC<sub>50</sub> são superiores a 100 µM são designados como “não tóxicos”. Compostos com valores de IC<sub>50</sub> situados na faixa entre 5 e 100 µM recebem a classificação de 'moderadamente citotóxicos', enquanto compostos citotóxicos apresentam valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 5 µM. Neste contexto, os complexos metálicos estudados no presente trabalho podem ser considerados moderadamente tóxicos para a linhagem HeLa, uma vez que todos os IC<sub>50</sub> encontrados foram inferiores a 50 µM, conforme demonstrado na Figura 1. Na revisão realizada por Pete *et al.*, (2022) foram descritos IC<sub>50</sub> para complexos de rênio testados por vários autores em HeLa, sendo que estes variavam entre 36 e 371 µM. Esses dados corroboram com a faixa de valores de IC<sub>50</sub> encontrados no presente trabalho, sendo que [Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup> e [Re(CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup> tiveram IC<sub>50</sub> inferiores aos já descritos para esses outros complexos, demonstrando uma maior citotoxicidade quando comparados aos complexos descritos pela revisão bibliográfica.



**Figura 1:** Fotomicrografia demonstrando a morfologia de células HeLa após tratamento com os complexos de rênio em diferentes concentrações.

**Tabela 1 – IC<sub>50</sub> das linhagens tumorais e Índice de Seletividade.**

Composto	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IS	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IS
	HeLa	PNT2		B16F10	NIH/3T3	
[Re(CO) <sub>3</sub> (phen)(py)] <sup>+</sup>	49,04 ± 2,92*	>100	IND	>100	>100	IND
[Re(CO) <sub>3</sub> (dpq)(py)] <sup>+</sup>	22,68 ± 17,42*	41,77 ± 4,5	1,84	43,61 ± 3,26	62,66 ± 2,3	1,44
[Re(CO) <sub>3</sub> (dppz)(py)] <sup>+</sup>	8,94	16,23	1,82	11,51	18,63	1,62

---

$\pm 1,64^*$      $\pm 0,97$                        $\pm 0,61$      $\pm 0,86$

---

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

IND = indefinido

## 6.2 DOCKING MOLECULAR

### 6.2.1 INTERAÇÃO COM BSA

O *docking* molecular mostrou que os três complexos interagem com a macromolécula BSA nos sítios de ativação analisados, com energias de ligação baixas, o que mostra que a ligação é favorável. De acordo com a Tabela 2, o complexo com menor número de anéis aromáticos se liga com um valor maior e à medida que se aumenta os anéis aromáticos nos complexos a energia de ligação diminui, mostrando ser mais favorável.

**Tabela 2** – Energia das interações entre metalocomplexos e a molécula de BSA nos sítios do triptofano 134 e 213.

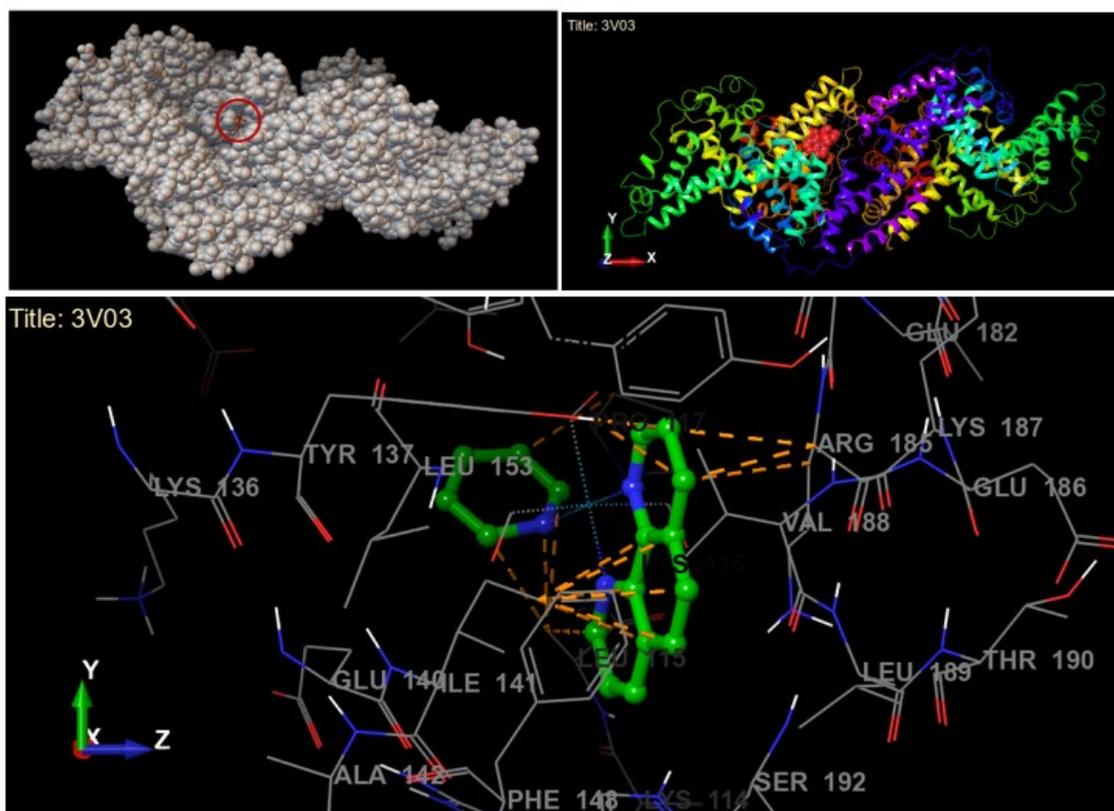
Metalocomplexos	Energia da ligação* Triptofano 134	Energia da ligação* Triptofano 213
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$	- 6,72	-6,70
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$	-7,13	-6,51
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$	- 8,97	-8,70

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

\*Kcal/mol

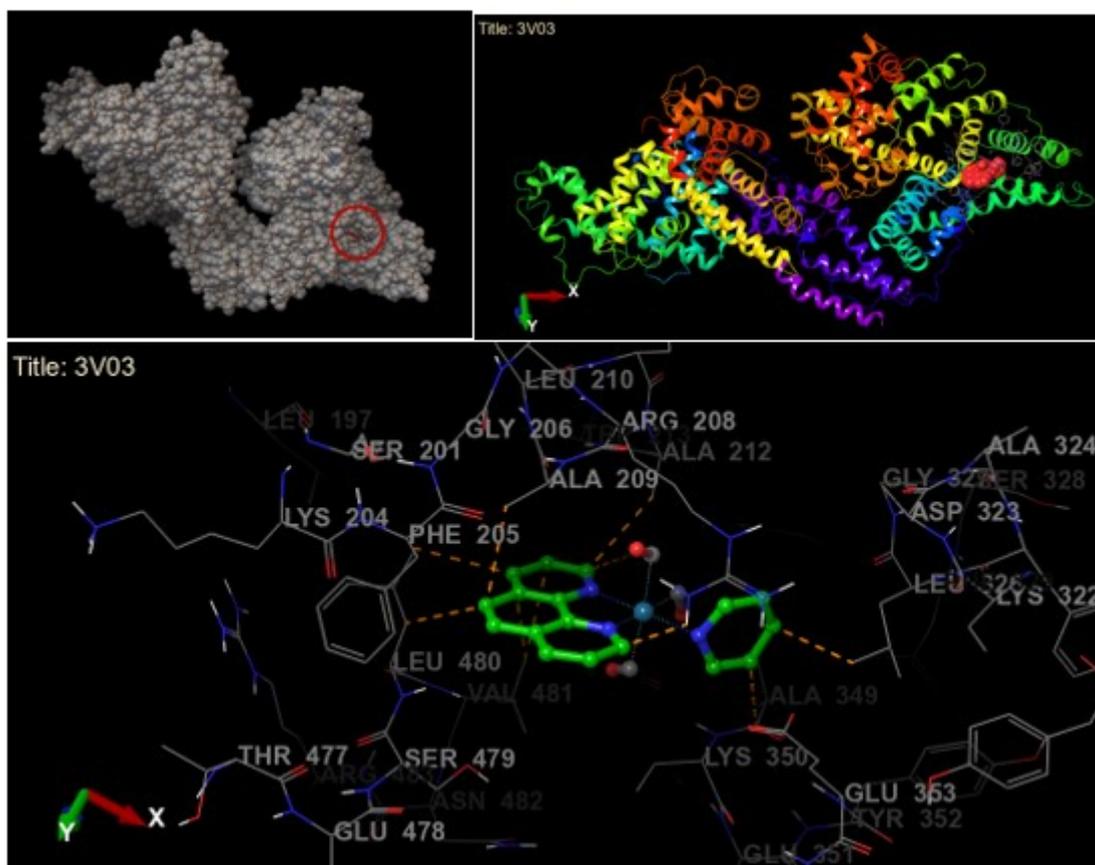
#### **$[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{PHEN})(\text{PY})]^+$**

Conforme mostrado na Figura 2, o complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  interage com o BSA, na cadeia A, próximo ao sítio do triptofano 134, demonstrando interações entre o mono anel aromático e a prolina 117 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil, e com a leucina 115 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -sigma. O triplo anel de sua estrutura também interage com isoleucina 141, leucina 115, arginina 185 e tirosina 137 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil. Apresenta também uma ligação de hidrogênio entre a uma de suas carbonilas e a arginina 185.



**Figura 2:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 134 na proteína BSA (3V03).

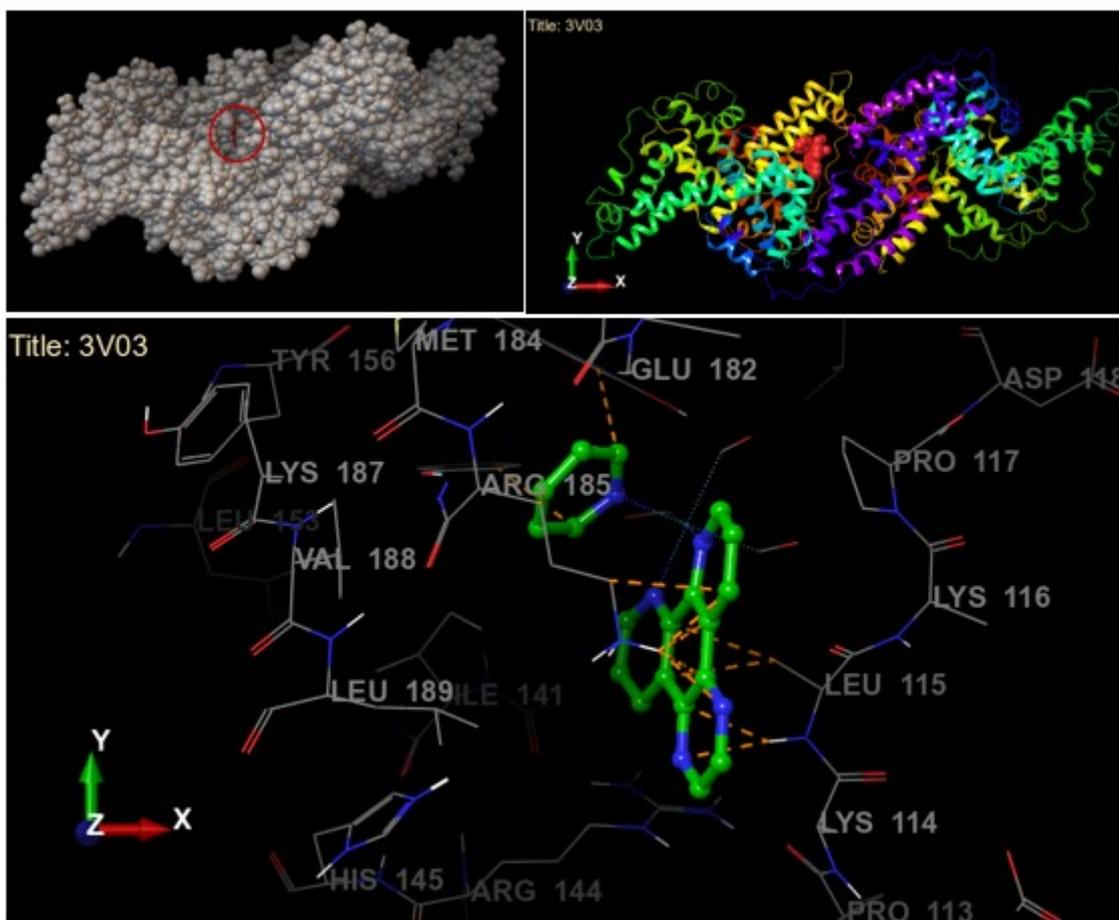
O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado em Figura 3, também interage com a BSA, em sua cadeia B, próximo a sítio do triptofano 213, o anel menor interage com leucina 326 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil, glutamina 353, por meio de interações do tipo ânion- $\pi$  e alanina 349 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -sigma. O triplo anel de sua estrutura também interagem com leucina 346 e 480, valina 481 e alanina 212, por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil, com alanina 209, por meio de interações tipo  $\pi$ -sigma e  $\pi$ -alquil e com e arginina 208, por meio de ligações de hidrogênio com uma de suas carbonilas.



**Figura 3:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 213 na proteína BSA (3V03)

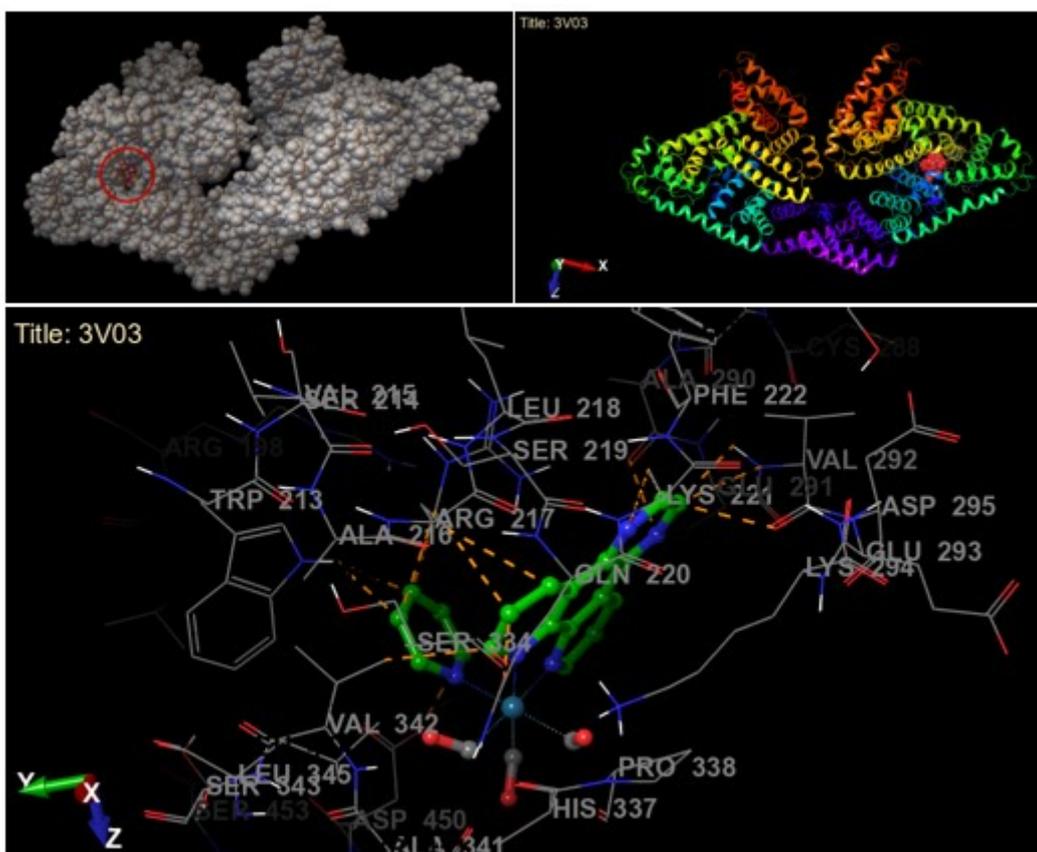
### $[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPQ})(\text{PY})]^+$

O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  interage com a BSA, conforme mostrado na Figura 4, na cadeia A, próximo a sítio do triptofano 134, demonstrando interações entre o anel menor e interleucina 181, tirosina 137 e arginina 185 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil. O anel maior composto por quatro estruturas cíclicas, interage com prolina 117, leucina 115, lisina 114 e arginina 185 por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil. O complexo ainda forma ligações de hidrogênio entre nitrogênio da leucina 115 com hidrogênio do tetra-anel aromático.



**Figura 4:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 134 na proteína BSA (3V03)

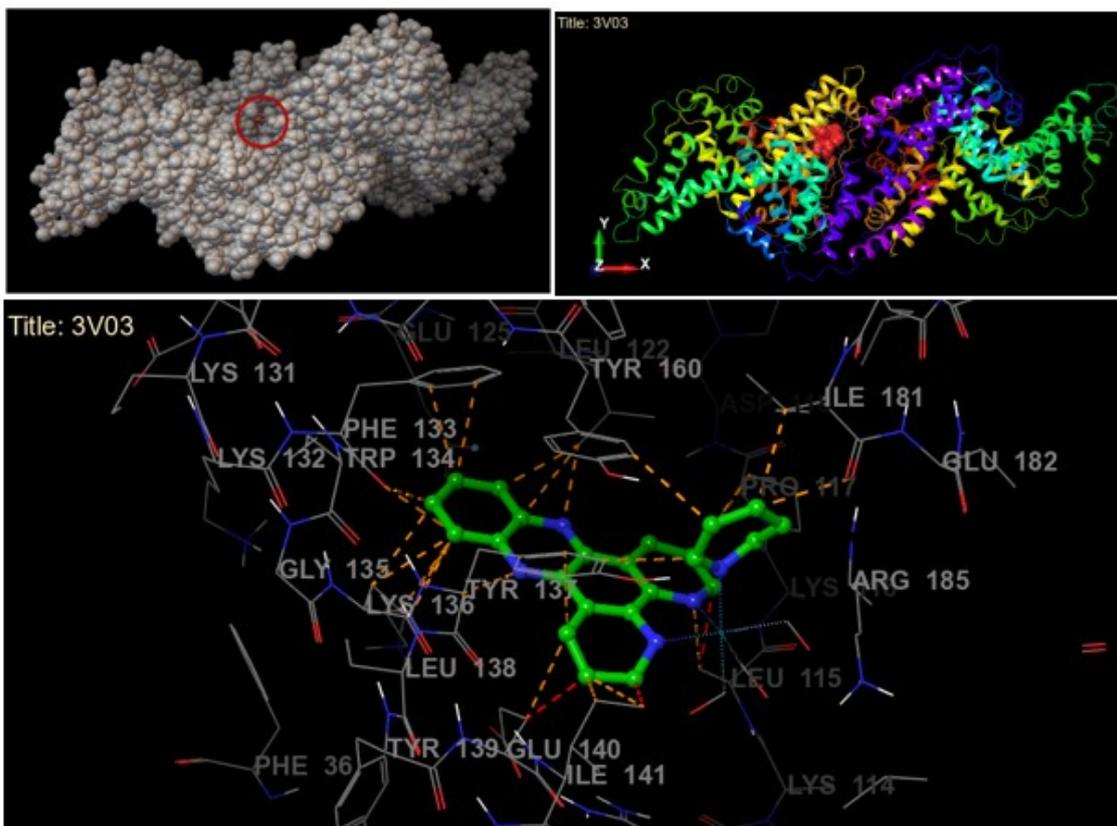
O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado na Figura 5, também interage com a BSA, na cadeia B, próximo a sítio do triptofano 213, demonstrando interações entre o anel isolado dos demais e o aspartato 450, por meio de interações do tipo ânion- $\pi$ , triptofano 213, por meio de interações hidrofóbicas  $\pi$ -alquil, e arginina 217, por meio do tipo cátion- $\pi$ . Seus quatro anéis aromáticos também interagem com arginina 217, por meio de interações do tipo cátion- $\pi$ , lisina 221 por meio de interações do tipo cátion- $\pi$ , e com glutamina 291, por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil. O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  também interagem na forma de ligações de hidrogênio entre os quatro anéis aromáticos fusionados e alanina 290, e entre suas carbonilas e lisina 294 e valina 342.



**Figura 5:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 213 na proteína BSA (3V03)

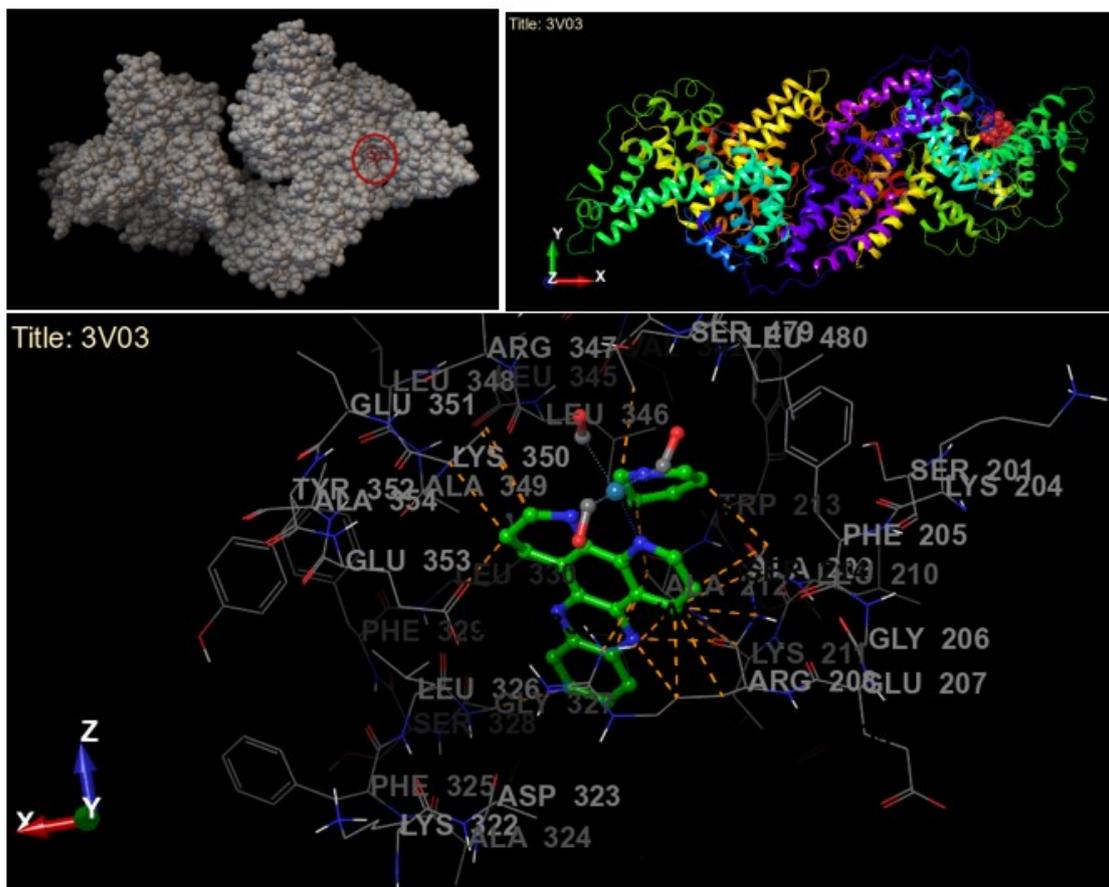
### **[RE (CO)<sub>3</sub>(DPPZ)(PY)] +**

O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado na Figura 6, interage com a cadeia A da BSA, próximo ao sítio do triptofano 134, demonstrando interação entre o anel menor e interleucina 181 e tirosina 160, por meio de interações do tipo  $\pi$ -alquil. Seus cinco anéis fusionados interagem com triptofano 134, leucina 115 e 122, tirosina 137, interleucina 141, lisina 136, e prolina 117, por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil. Interagem também com tirosina 160, por meio de ligações  $\pi$  t-shaped, e ainda apresentam ligações de hidrogênio entre dois de seus grupos C=O e arginina 185.



**Figura 6:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 134 na proteína BSA (3V03)

O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado na Figura 7, também interage com a cadeia B da BSA, próximo ao sítio do triptofano 213, demonstrando interação entre o anel menor e valina 481, alanina 209 e 212, por meio de interações hidrofóbicas  $\pi$ -alquil. Os cinco anéis fusionados também interagem com arginina 208, por meio de interações hidrofóbicas cátion- $\pi$  e  $\pi$ -alquil. Interage também com Alanina 212, por meio de interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -alquil e  $\pi$ -sigma. Ainda interagem com alanina 209, glicina 327, alanina 349, leucina 346, lisina 350 e valina 481, por meio de interações hidrofóbicas  $\pi$ -alquil. O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  também apresenta ligações de hidrogênio entre dois dos grupamentos C=O e leucina 480 e serina 479.



**Figura 7:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  e sítio de interação próximo ao triptofano 213 na proteína BSA (3V03)

A análise de *docking* molecular é uma ferramenta valiosa na pesquisa das interações entre complexos metálicos e moléculas biológicas, como a albumina sérica bovina (BSA), que desempenha um papel essencial no transporte de ligantes no corpo tal qual cita Magalhães *et al.* (2022). A partir dos resultados apresentados na seção 2.2, é possível notar melhor as interações dos complexos de metal com a BSA e suas implicações.

Balakrishnan *et al.*, (2019), estudaram quatro complexos de rênio do tipo fac- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-diimina})\{4\text{-C}_{11}\text{py}\}]\text{CF}_3\text{SO}_3$ . Segundo os autores, a análise da estrutura cristalina da BSA indica que o mesmo possui sítios de ligação localizados em cavidades hidrofóbicas encontradas nos subdomínios IIA e IIIA, que correspondem aos sítios I e II, respectivamente. Também foram identificados dois resíduos de aminoácidos (Trp-134 e Trp213) na BSA, todos localizados no subdomínio IIA, envolvidos na interação complexos/proteína. É importante destacar a existência de uma cavidade hidrofóbica de tamanho considerável no subdomínio IIA, a qual possui a capacidade de se ligar a diversas substâncias medicamentosas.

Coincidentemente os três complexos analisados no presente trabalho demonstraram a capacidade de se ligarem a esses mesmos resíduos de aminoácidos localizados no subdomínio IIA.

### 3.2.2 INTERAÇÃO COM DNA

Com o resultado do *docking* molecular é notado o nível de interação entre os compostos e a macromolécula. Segundo Varma *et al.* (2021) esta etapa é fundamental para o desenvolvimento de um método de tratamento, em especial pelo fato de demonstrar que o composto aplicado interage de forma direta na célula alvo, e assim, uma vez que a interação tenha um índice de seletividade maior que 1, é possível identificar este como um método de tratamento em potencial.

O *docking* molecular mostrou que os três complexos interagem com a macromolécula de DNA, com energias de ligação baixas, o que mostra que a ligação é favorável. De acordo com a Tabela 3, o complexo com menor número de anéis aromáticos se liga com um valor maior e à medida que se aumenta os anéis aromáticos nos complexos a energia de ligação diminui, mostrando ser mais favorável.

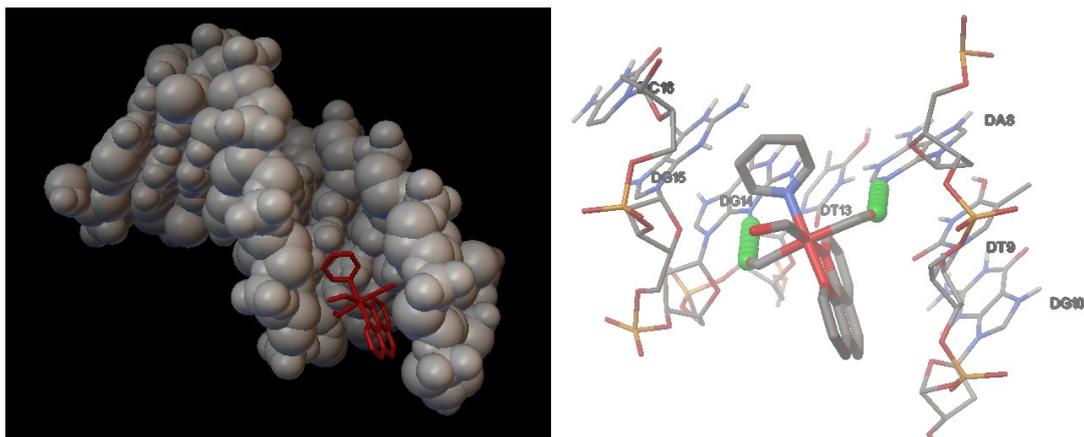
**Tabela 3** - Energia das interações entre metalocomplexos e a molécula de DNA e número de ligações de hidrogênio entre as interações.

Metalocomplexos	Energia da ligação (Kcal/mol)	Ligações de hidrogênio
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$	- 6,78	2
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$	- 6,97	1
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$	- 7,83	1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

#### **$[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{PHEN})(\text{PY})]^+$**

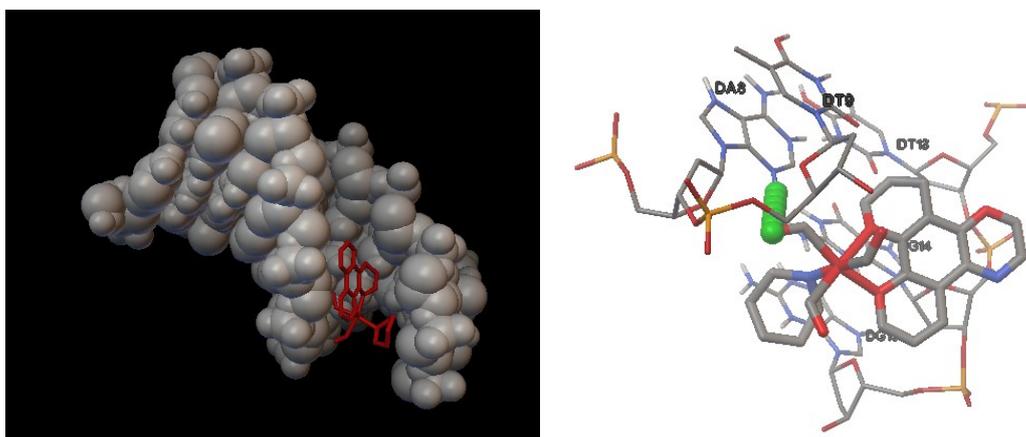
Em sua conformação mais estável o complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado na Figura 8, interage com o DNA em dupla fita, principalmente no sulco menor, formando ligações de hidrogênio, representadas na ampliação da Figura 1 por esferas verdes, com a adenina 8 da cadeia A e com a guanina 14 da cadeia B. Além das ligações de hidrogênio também apresenta interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$  cátion e outras interações eletrostáticas como de Van der Waals.



**Figura 8:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  e DNA e sua ampliação.

### $[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPQ})(\text{PY})]^+$

O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado na Figura 9, interage com o DNA em fita simples, em sua conformação de menor gasto energético, mostrando também afinidade pelo sulco menor, formando ligações de hidrogênio com a adenina 8 da cadeia A, representadas na ampliação da Figura 2 por esferas verdes. Assim como o complexo anterior, o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  apresenta interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$  cátion e outras interações eletrostáticas como de Van der Waals. O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  também apresentou capacidade de interagir com o DNA por intercalação em uma pose menos estável.

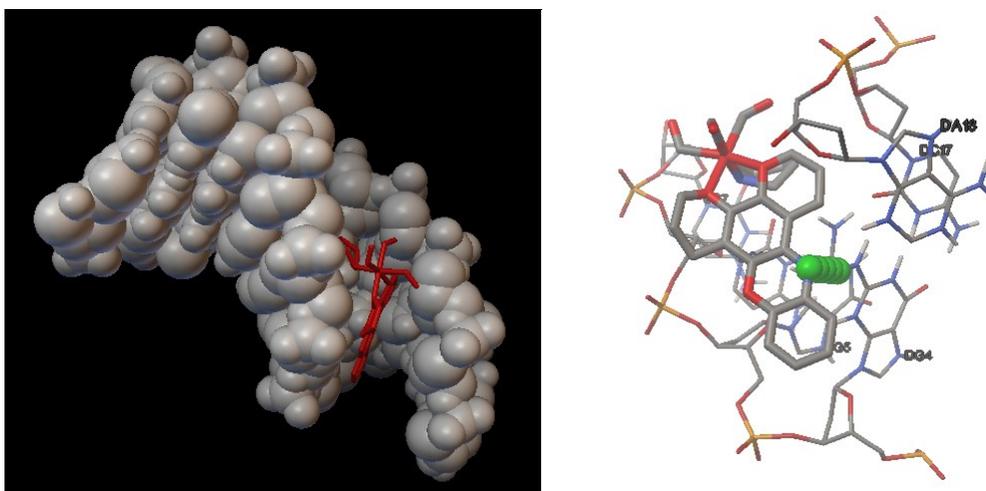


**Figura 9:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e DNA e sua ampliação.

### $[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPPZ})(\text{PY})]^+$

O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , conforme mostrado na Figura 10, interage em sua conformação menos energética, principalmente no sulco menor da fita simples do DNA, formando ligações de hidrogênio com a guanina 4 da cadeia A,

como representado pelas esferas verdes na ampliação da Figura 10. Apresenta também como os complexos anteriores outras interações intermoleculares.



**Figura 10:** Interação entre  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  e DNA e sua ampliação.

Varma *et al.*, (2021), sintetizaram complexos de Rênio com ligantes da classe molecular heterocíclica e complexos heteromononucleares de rênio(I), analisando a interação desses complexos com o DNA por meio de diversas técnicas espectroanalíticas e de eletroforese. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todos os complexos analisados se ligaram aos sulcos do DNA e induziram quebras em suas fitas, corroborando com os dados obtidos pelo *docking* molecular dos três complexos analisados no presente trabalho, que mostraram afinidade ao sulco menor desta biomolécula. Ghosh *et al.*, (2014) também observaram por meio de *docking* molecular que complexos de rênio(II) dinitrosila e mononitrosila eram capazes de se ligar ao DNA, com orientação preferencial ao sulco menor da molécula.

### 6.3 CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL

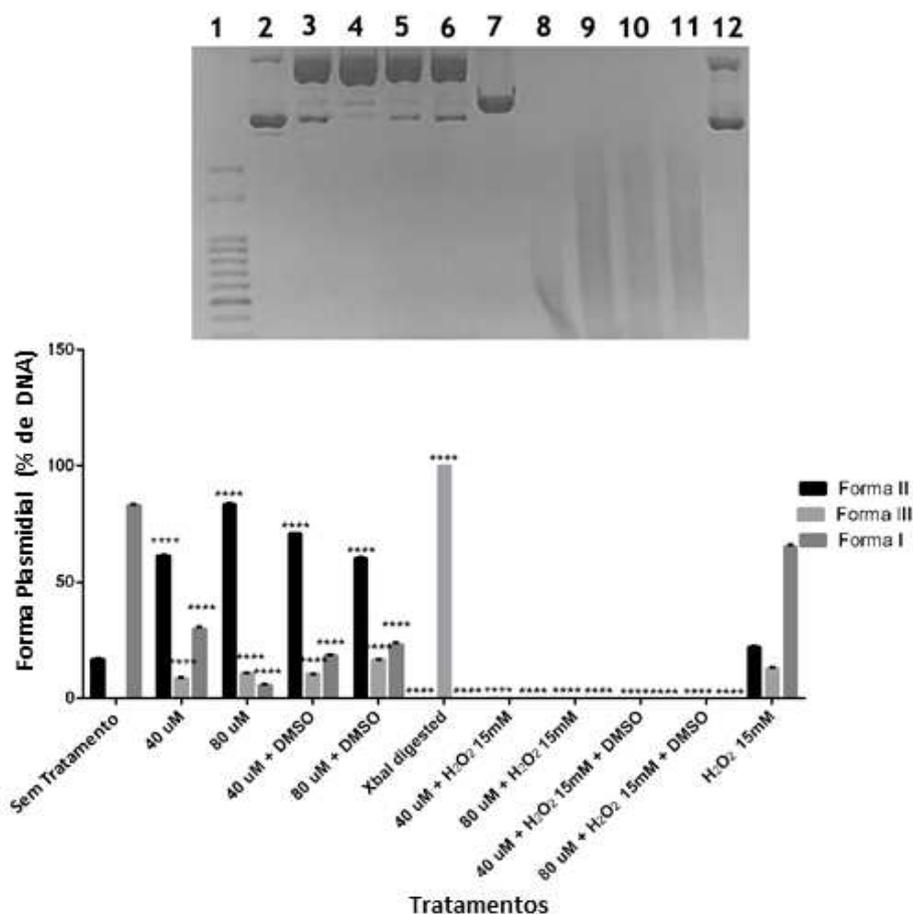
#### **[RE(CO)<sub>3</sub>(PHEN)(PY)]<sup>+</sup>**

O complexo [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup> foi capaz de induzir alterações estruturais em plasmídeos tratados com o mesmo em diferentes concentrações. O DNA plasmidial não tratado, conforme Figura 11 (coluna 2 no gel), quando submetido a eletroforese em gel de agarose se apresentava majoritariamente sob sua forma superenovelada intacta (forma I com 83,07%) e circular com quebras em fita simples (forma II com 16,93%), não apresentando forma linear resultante de quebras em fita dupla (forma III).

Ao ser tratado com o [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup>, o perfil das bandas no gel foi alterado, demonstrando a indução de quebras de fita simples e duplas (colunas 3 e 4 no gel). No tratamento com concentração de 80 µM (coluna 3 no gel) em condição não oxidante foi observado um aumento na porcentagem de quebras em fita simples (forma II com 83,47%), diminuição na porcentagem da forma superenovelada intacta (Forma I com 5,68%) e aparecimento de quebras em fita dupla (forma III com 10,86 %).

Quando os plasmídeos mantidos em condição não oxidante foram tratados com DMSO que é sequestrador ou neutralizador de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), (colunas 5 e 6 no gel), observou-se uma diminuição na porcentagem de DNA sob a forma II que foi para 60,12 % e um aumento na forma I, que foi para 23,24%.

Em uma condição pró-oxidante representada pela introdução de peróxido de hidrogênio no sistema, foi observado uma intensa degradação plasmidial, formando um arraste de DNA em todas as condições, não sendo possível a observação de bandas específicas (colunas 8, 9, 10 e 11 no gel). A coluna 7 representa o controle positivo para quebra de fita dupla, uma vez que o DNA plasmidial foi tratado com a enzima de restrição de sítio único Xba I, a coluna 1 representa os marcadores de peso molecular e a coluna 7 representa o plasmídeo não tratado com complexo, porém submetido a condição pró-oxidante.



**Figura 11:** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento, onde: 1: Marcador; 2: Controle sem tratamento; 3:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ); 4:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ); 5:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ) + DMSO; 6:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ) + DMSO (0,05%); 7: Xba I; 8:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); 9:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); 10:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM) + DMSO (0,05%); 11:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM) + DMSO (0,05%); 12:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); Gráficos dos dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP). Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose. Dados expressos a partir da média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios. Análise estatística feita por 2way ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns não significativo comparando com o controle sem tratamento.

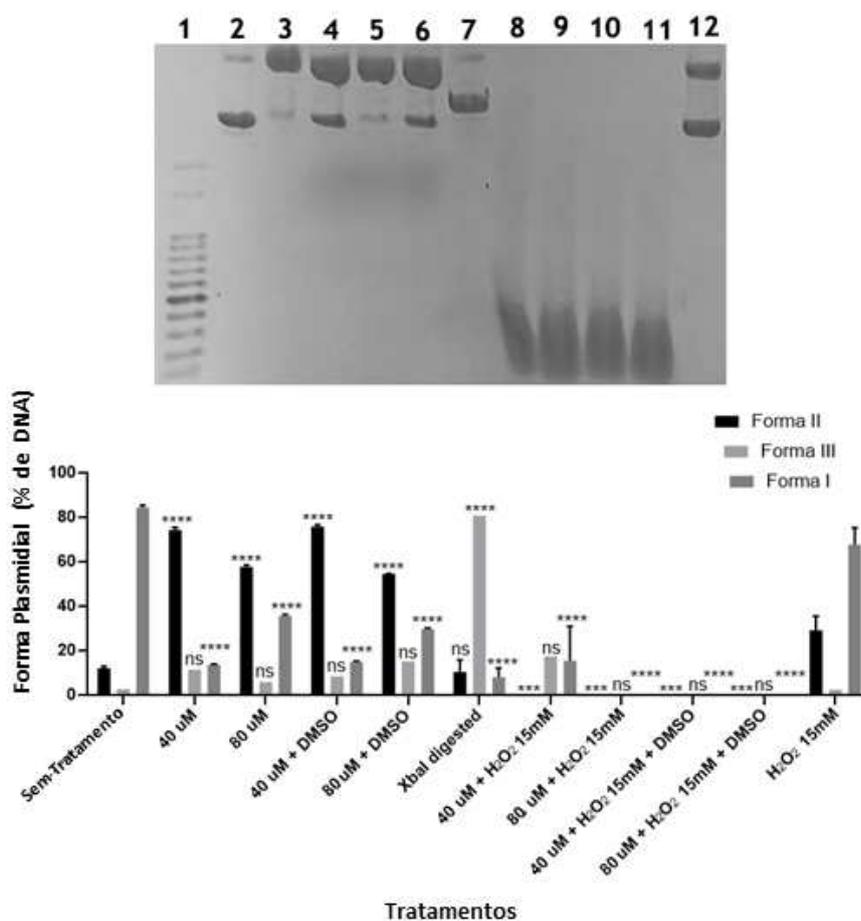
### $[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPQ})(\text{PY})]^+$

O complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  também foi capaz de induzir alterações estruturais em plasmídeos. O DNA plasmidial não tratado como demonstrado na figura 12 (coluna 2 no gel), quando submetido a eletroforese em gel de agarose se apresentava majoritariamente sob sua forma superenovelada intacta (forma I com 84,69%), circular com quebras em fita simples (forma II com 12,27%) e uma

pequena porcentagem sob a forma linear resultante de quebras em fita dupla (forma II).

Ao ser tratado com o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  o perfil das bandas no gel foi alterado, demonstrando a indução de quebras de fita simples (colunas 3, 4, 5 e 6 no gel). Nas amostras tratadas em condição não oxidante foi observado um aumento na porcentagem de quebras em fita simples (forma II) e uma acentuada diminuição na porcentagem da forma superenovelada intacta (Forma I).

Em uma condição pró-oxidante representada pela introdução de peróxido de hidrogênio no sistema, assim como no complexo anterior, foi observado uma intensa degradação plasmidial, formando um arraste de DNA em todas as condições, não sendo possível a observação de bandas específicas (colunas 8,9,10 e 11 no gel). A coluna 7 representa o controle positivo para quebra de fita dupla, uma vez que o DNA plasmidial foi tratado com a enzima de restrição de sítio único Xba I, a coluna 1 representa os marcadores de peso molecular e a coluna 7 representa o plasmídeo não tratado com complexo, porém submetido a condição pró-oxidante.



**Figura 12:** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento, onde: 1: Marcador; 2: Controle sem tratamento; 3:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ); 4:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ); 5:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ) + DMSO; 6:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ) + DMSO (0,05%); 7: Xba I; 8: DPQ (40  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); 9: DPQ (80  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); 10:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (40  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM) + DMSO (0,05%); 11:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (80  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM) + DMSO (0,05%); 12:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); Gráficos dos dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP). Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose. Dados expressos a partir da média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios. Análise estatística feita por 2way ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001; ns não significativo comparando com o controle sem tratamento.

### **$[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPPZ})(\text{PY})]^+$**

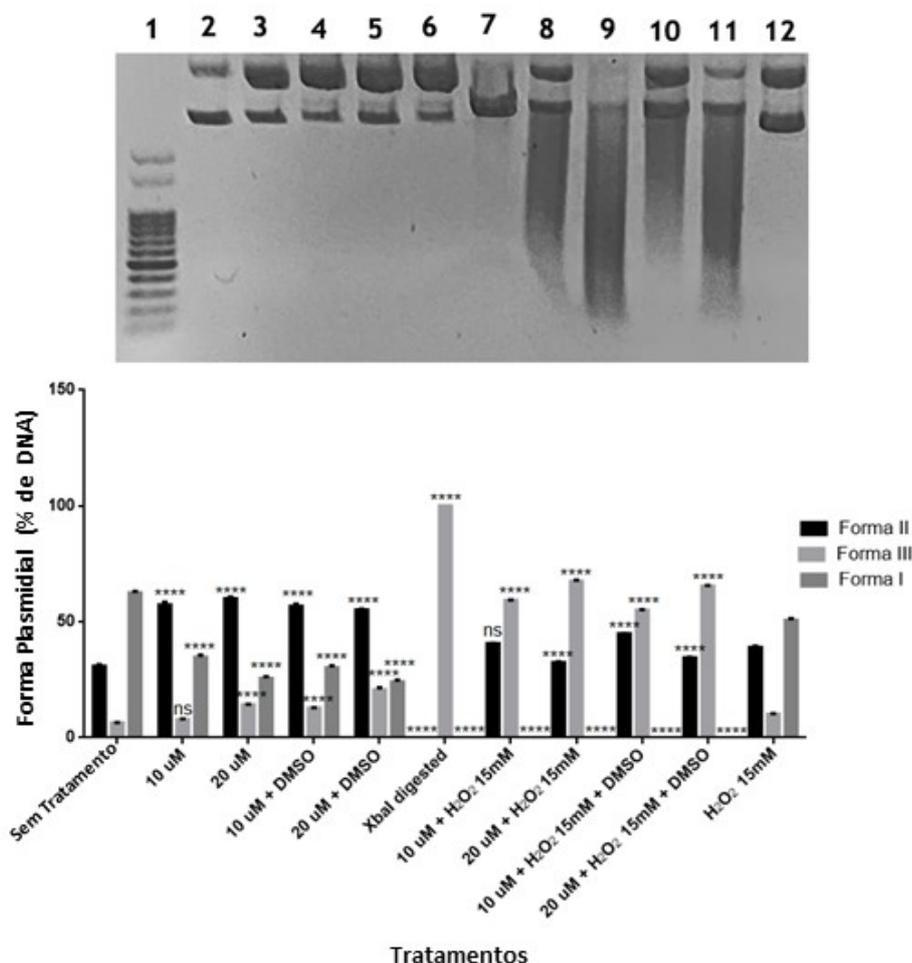
Assim como os dois complexos anteriores,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  também foi capaz de induzir alterações estruturais em plasmídeos. O DNA plasmidial não tratado, conforme demonstrado na Figura 13 (coluna 2 no gel), quando submetido a eletroforese em gel de agarose se apresentava majoritariamente sob sua forma superenovelada intacta (forma I com 62,6%), circular com quebras em fita simples (forma II com 30,9%) e uma pequena porcentagem sob a forma linear resultante de quebras em fita dupla (forma III).

Ao ser tratado com o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  o perfil das bandas no gel foi alterado, demonstrando a indução de quebras de fita simples (colunas 3, 4, 5 e 6 no gel). Nas amostras tratadas em condição não oxidante foi observado um aumento na porcentagem de quebras em fita simples (forma II), uma acentuada diminuição na porcentagem da forma superenovelada intacta (Forma I) e um aumento notório nas bandas referentes a quebras em fita dupla (forma III).

Em uma condição pró-oxidante representada pela introdução de peróxido de hidrogênio no sistema, assim como nos dois complexos anteriores, foi observado uma intensa degradação plasmidial, formando um arraste de DNA em todas as condições (colunas 8,9,10 e 11 no gel). No caso do  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , foi possível observar a formação de bandas específica e este fato pode ser explicado pela menor concentração utilizada no tratamento dos plasmídeos, uma vez que essas concentrações estão relacionadas ao  $\text{IC}_{50}$  definido para cada complexo metálico e o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  apresentou um  $\text{IC}_{50}$  em concentração inferior aos demais.

A coluna 7 representa o controle positivo para quebra de fita dupla, uma vez que o DNA plasmidial foi tratado com a enzima de restrição de sítio único Xba I, a

coluna 1 representa os marcadores de peso molecular e a coluna 7 representa o plasmídeo não tratado com complexo, porém submetido a condição pró-oxidante.



**Figura 13:** Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento, onde: 1: Marcador; 2: Controle sem tratamento; 3:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ ); 4:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (20  $\mu\text{M}$ ); 5:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ ) + DMSO; 6:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (20  $\mu\text{M}$ ) + DMSO (0,05%); 7: Xba I; 8:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); 9:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (20  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); 10:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM) + DMSO (0,05%); 11:  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (20  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM) + DMSO (0,05%); 12:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 mM); Gráficos dos dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP). Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose. Dados expressos a partir da média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios. Análise estatística feita por 2way ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns não significativo comparando com o controle sem tratamento.

Todos os complexos de rênio avaliados no presente trabalho demonstraram a capacidade de induzirem clivagem do DNA plasmidial, corroborando com os dados observados por outros autores. Varma *et al.*, (2021) demonstraram por meio de análises de eletroforese em gel de agarose que complexos

heteromononucleares de rênio (I) são capazes de induzir clivagem no DNA de *Sacharomyces cerevisiae*. Zeleniuk *et al.*, (2020) demonstraram atividade nucleásica em plasmídeos pUC18 tratados com complexos dirênio(III) e observaram que assim como os complexos avaliados no presente trabalho, a atividade era aumentada na presença de peróxido de hidrogênio, concluindo que o DNA é o possível alvo em células vivas.

Os autores indicam que o mecanismo subjacente à reação de clivagem do DNA em complexos de dirênio(III) é multifacetado, e é essencial levar em consideração os efeitos de doação ou retirada de elétrons dos ligantes, bem como a influência da atividade catalítica do núcleo metálico. Tais resultados corroboram com os dados obtidos, uma vez que a ação dos complexos de rênio foi variável e essas diferenças provavelmente se devem aos diferentes ligantes presentes em cada complexo.

Ghosh *et al.*, (2014) avaliaram a ação de complexos de rênio (II) dinitrosila e mononitrosila sobre plasmídeos SC (pUC19) e assim como o presente trabalho, verificaram uma eficaz atividade nucleásica na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, clivando o DNA do em uma forma circular com quebras de fita simples. Segundo os autores, a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante favorece reações do tipo Fenton, nas quais ocorre a oxidação do complexo metálico, levando à formação de espécies de oxigênio mais acessíveis e reativas, os radicais hidroxilas (OH•) que atacam a molécula de DNA. Acreditamos que esse mesmo mecanismo é o responsável pelas quebras induzidas pelos metalocomplexos [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup>, [Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup> e [Re(CO)<sub>3</sub>(dppz)(py)]<sup>+</sup>. Na presença de DMSO a intensidade de bandas resultantes de quebras foi diminuída em alguns dos tratamentos, fato que corrobora com essa hipótese, uma vez que esse agente é um sequestrador de radicais livres e ao neutralizar as espécies reativas geradas diminui os danos ao DNA.

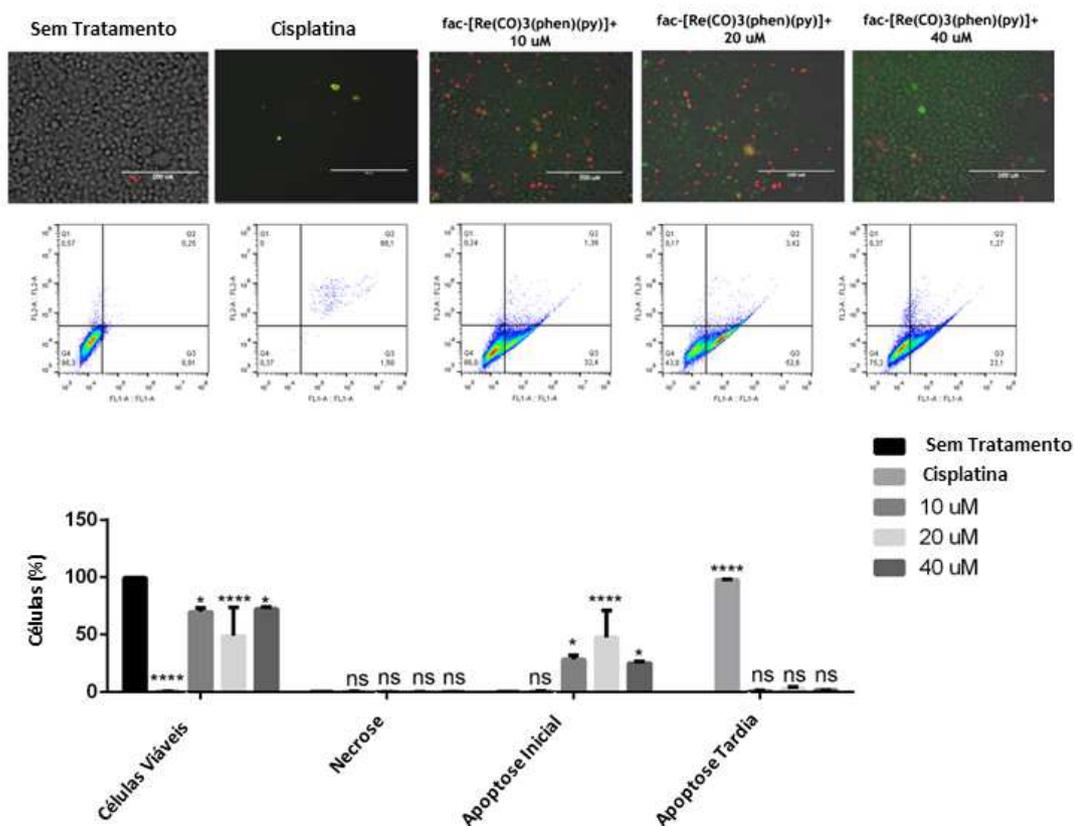
#### **6.4 INDUÇÃO DE APOPTOSE EM HeLa**

No presente estudo, foi empregado o teste de indução à apoptose em células da linhagem HeLa com o objetivo de avaliar o potencial indutor dos metalocomplexos de rênio. Além disso, foi estabelecido um comparativo, que não apenas destaque a eficácia desses compostos, mas também identifique a

abordagem mais eficiente para o tratamento do câncer utilizando tais metalocomplexos. Este enfoque experimental não apenas contribui para elucidar os mecanismos de ação dos metalocomplexos de rênio no contexto da indução à apoptose, mas também oferece insights valiosos para aprimorar estratégias terapêuticas direcionadas ao tratamento de neoplasias.

### **[RE(CO)<sub>3</sub>(PHEN)(PY)]<sup>+</sup>**

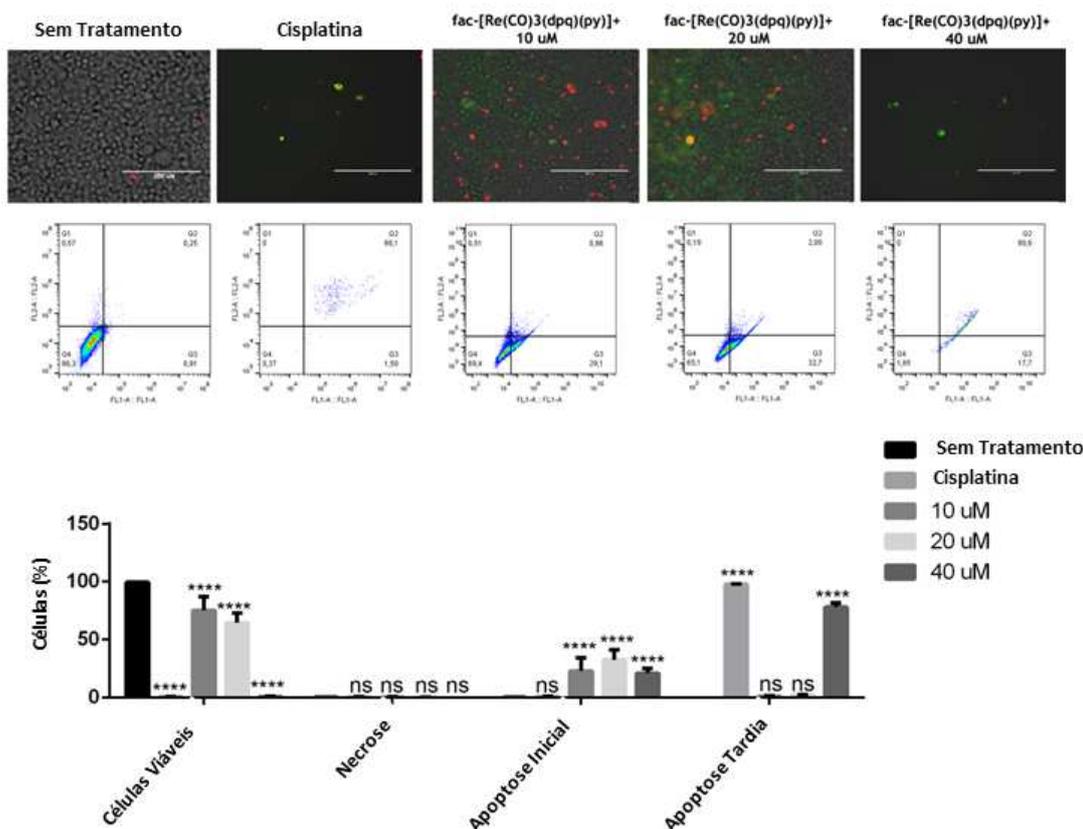
O ensaio conduzido utilizando [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup> revelou uma notável diminuição na viabilidade celular, sendo a concentração mais eficaz para essa redução a dosagem de 20 μM, chegando a aproximadamente 52,6% de apoptose inicial e 3,42% de apoptose tardia, conforme demonstrado na Figura 14. Vale destacar as distintas vias pelas quais ocorre essa diminuição na viabilidade celular. Enquanto a administração de Cisplatina age induzindo a apoptose tardia (98,1%), o tratamento com [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup> resulta em uma apoptose inicial, sendo de tal diferença provavelmente se deve à diferenças de concentrações utilizadas para os dois complexos. Essa variação nos mecanismos apoptóticos apresenta implicações significativas e pode influenciar nas estratégias terapêuticas a serem consideradas.



**Figura14:** Histograma representativo do tipo de morte celular na linhagem tumoral HeLa. Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup> (10 μM, 20 μM e 40 μM). Para o gráfico de barras, os dados representam a média ± o erro padrão. \* p < 0,05. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 e \*\*\*\* p < 0.0001 (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

### [RE(CO)<sub>3</sub>(DPQ)(PY)]<sup>+</sup>

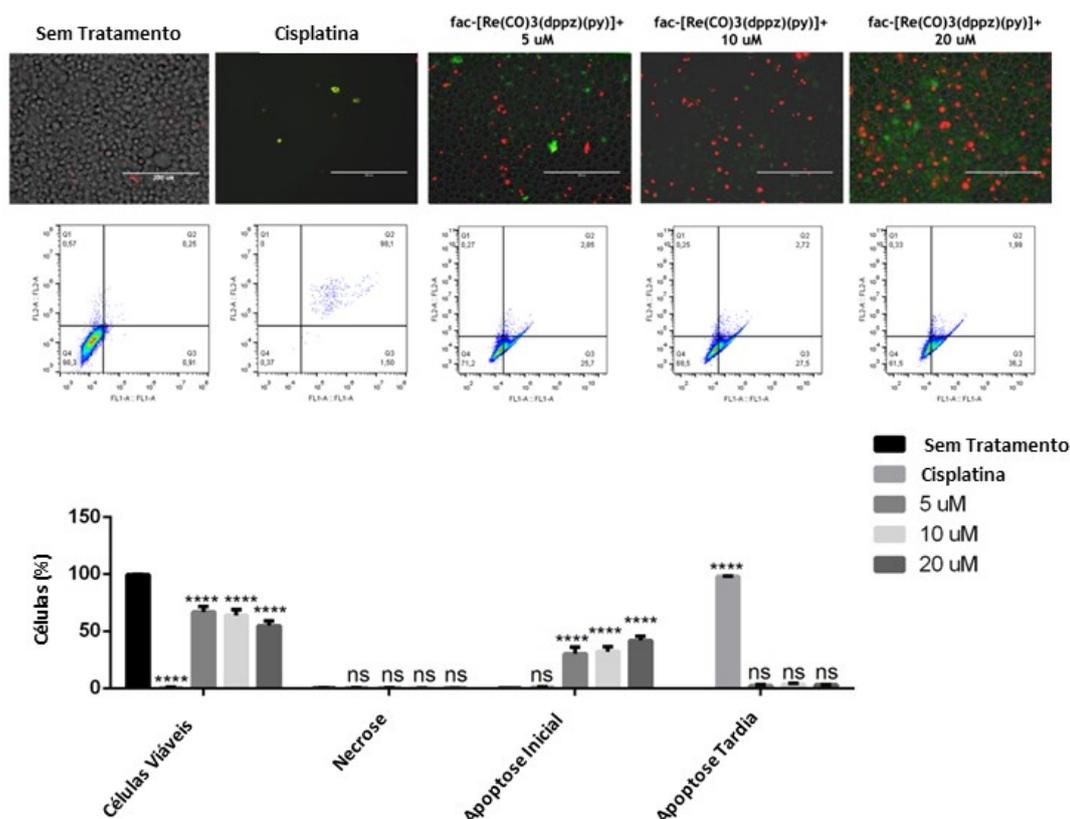
A administração de [Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup> em concentrações de 10 e 20 μM resultou em uma redução média de 35%, no entanto, em contraste com os resultados obtidos com [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(py)]<sup>+</sup>, o tratamento com [Re(CO)<sub>3</sub>(dpq)(py)]<sup>+</sup> demonstrou ser mais eficaz na redução do número de células viáveis, especialmente em uma concentração de 40 μM, culminando na eliminação quase por completo das células viáveis, como demonstrado na Figura 15. É importante ressaltar que o mecanismo de ação deste composto, ao contrário da Cisplatina, atuou de maneira dual, desencadeando tanto a apoptose prematura quanto a apoptose tardia, com uma atividade superior na promoção da apoptose tardia.



**Figura 15:** Histograma representativo do tipo de morte celular na linhagem tumoral HeLa. Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ). Para o gráfico de barras, os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo-pós teste de Bonferroni).

### $[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPPZ})(\text{PY})]^+$

A administração de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  foi capaz de induzir tanto apoptose inicial quanto apoptose tardia. À medida que se aumentou a concentração do complexo observou-se um aumento na porcentagem de células em apoptose inicial, chegando a um valor em torno de 40% no tratamento com concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Nas imagens de fotomicrografia de fluorescência, foi possível observar a marcação da membrana plasmática com coloração verde referente à marcação da Anexina V por Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o material genético marcado em vermelho pelo iodeto de propídeo, sendo que nessas imagens é possível verificar um evento característico das células apoptóticas que é a formação dos corpos apoptóticos contendo material genético fragmentado marcado em vermelho, conforme demonstrado na Figura 16.



**Figura 16:** Histograma representativo do tipo de morte celular na linhagem tumoral HeLa. Gráfico de barras representativo da porcentagem do tipo de morte celular da linhagem tumoral HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ). Para o gráfico de barras, os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (comparando com o controle negativo por two-way anova seguido pelo-pós teste de Bonferroni).

Os três complexos de rênio avaliados no presente trabalho foram capazes de induzir tanto apoptose inicial, quanto apoptose tardia, provavelmente devido à indução de danos irreparáveis ao DNA. No ensaio realizado foi utilizada a anexina V, que é capaz de identificar células nas quais a apoptose foi disparada ligando-se ao fosfolípídeo de membrana fosfatidilserina.

Em células vivas este fosfolípídeo está presente apenas na face interior da membrana, porém ao ser disparada a apoptose ele é externalizado e marcado pela anexina V, distinguindo assim as células apoptóticas. Já o fluorocromo iodeto de propídeo cora o núcleo de células necróticas ou em apoptose tardia, quando a integridade do núcleo foi comprometida, identificando assim células necróticas ou apoptóticas tardias (FENG *et al.*, 2023).

Feng *et al.*, (2023) estudaram um complexo de rênio(I) tricarbonila decorado com boro dipirrometeno, o qual possuía atividade fotodinâmica. Nesse trabalho os autores também descreveram uma indução de apoptose inicial e tardia para o

complexo estudado, corroborando com os resultados obtidos para os três complexos aqui avaliados. Yang et al., (2023) também obtiveram resultados parecidos em seu estudo com um complexo de Rênio(I) conjugado com daminozida, verificando a capacidade de indução de danos mitocondriais, induzir a apoptose, inibir a migração celular e a formação de colônias também em células HeLa.

Segundo (GHOSH *et al.*, 2014), vários estudos tem sido conduzidos por diversos campos da química na tentativa de sintetizar novas moléculas que interagem com o DNA, uma vez que o mesmo é o alvo intracelular mais comum de diversos quimioterápicos, o que geralmente acarreta a indução de apoptose. É possível propor que este é o mecanismo disparado pelos três complexos estudados aqui.

Asadian *et al.*, (2022) estudando o radionuclídeo perrênato de rênio descrevem a indução de quebras simples e duplas do DNA por esses compostos resultam em apoptose ou bloqueio do ciclo celular, como resposta de retroalimentação negativa para limitar a proliferação em face da ativação de proteína de tumor (P53) e BCL-2 associado à proteína X (BAX). A análise futura por PCR em tempo real ou western blotting poderão oferecer mais informações acerca das vias apoptóticas estimuladas pelos danos ao DNA induzidos pelos três complexos aqui estudados.

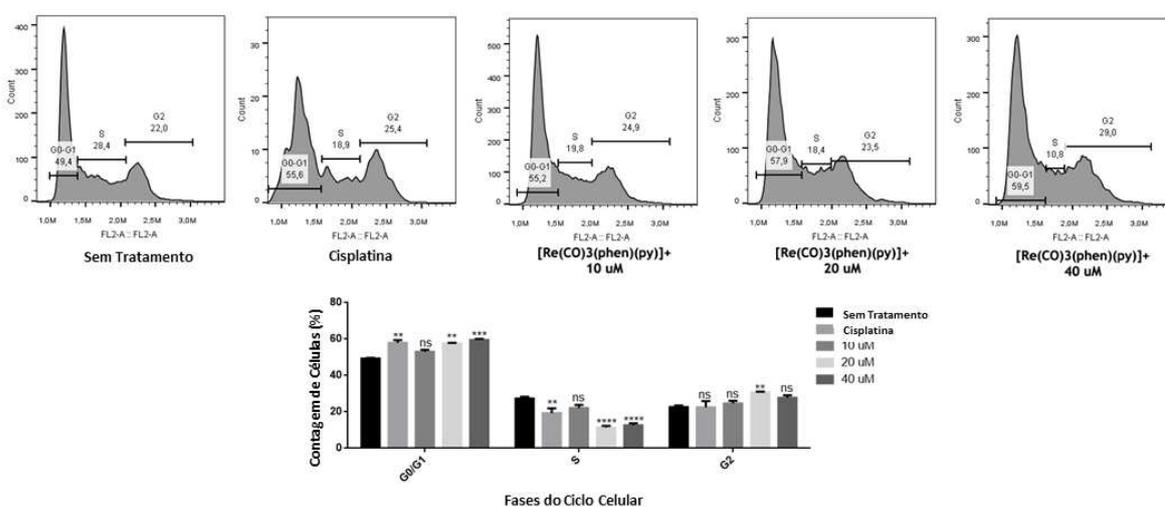
## **6.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM HeLa: EFEITOS NO CICLO CELULAR**

Para avaliar o efeito dos complexos de rênio ( $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , na proliferação celular, a linhagem HeLa foi tratada com os complexos por 24 hs e a distribuição das células em cada fase do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo após marcação dos núcleos celulares com iodeto de propídeo. Pode ser observado um aumento de células na fase G0/G1 e/ou G2 após 24 hs de tratamento com todos os complexos estudados.

### **$[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{PHEN})(\text{PY})]^+$**

Em relação ao complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ , no tratamento com uma concentração de 20  $\mu\text{M}$ , observou-se que em torno de 57,9% das células

encontravam-se na fase G0/G1. Esse resultado contrasta com o grupo controle, que registrou uma proporção de 49,4%. Adicionalmente, nos grupos tratados com concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ , as porcentagens foram calculadas em torno de 55,2% e 59,5%, respectivamente. Paralelamente, é notório que o composto acarretou uma redução nas células presentes na fase S do ciclo celular, enquanto promoveu um aumento proporcional de células na fase G2. Este fenômeno manifestou-se de maneira dose-dependente, evidenciando uma regulação no ciclo celular. O complexo demonstrou uma habilidade inibitória notável sobre a proliferação celular, aprisionando as células nas fases G0/G1 e G2, como ilustrado na Figura 17.

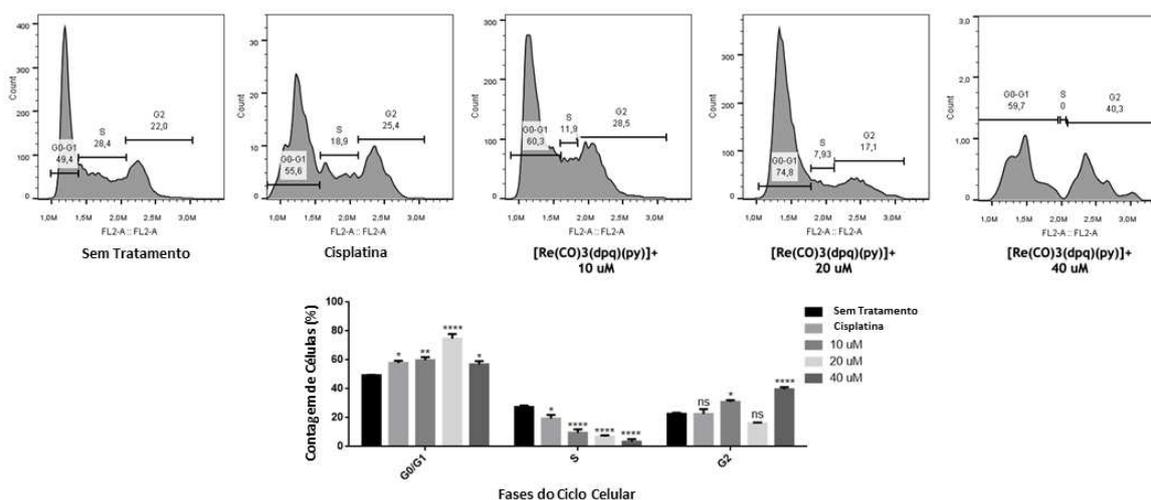


**Figura 17:** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ). Para o gráfico de barras, os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).

### $[\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DPQ})(\text{PY})]^+$

No âmbito do composto  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$ , foi observado um notável incremento na porcentagem de células na fase G0/G1, passando de 49,4% no grupo controle para aproximadamente 74,8% no grupo submetido ao tratamento com 20  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, nas condições experimentais com concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ , foram registrados valores em torno de 60,3% e 59,7%, respectivamente. Paralelamente, é notável que o composto manifestou uma tendência consistente de redução das células em fase S do ciclo celular, bem como um aumento gradativo na proporção de células na fase G2, à medida que a concentração aumenta. Este fenômeno, assim como observado anteriormente, segue uma relação de dependência da dose, reforçando a hipótese de modulação

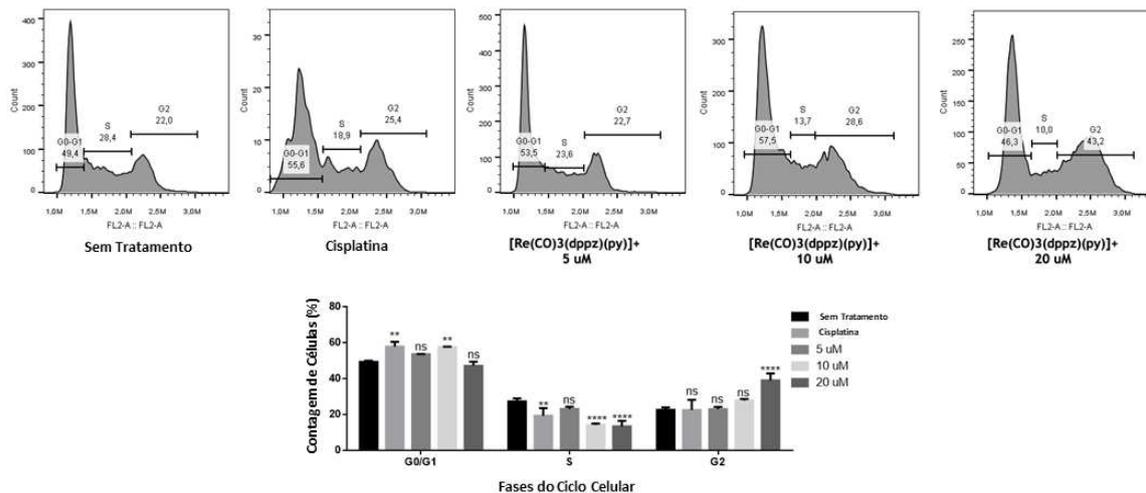
do ciclo celular pelo composto em questão. De maneira semelhante ao composto anterior, o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  também revelou a capacidade de inibir a proliferação celular. Essa inibição também se manifesta por meio do aprisionamento das células nas fases G0/G1 e G2, conforme exemplificado na Figura 18.



**Figura 18:** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ). Para o gráfico de barras, os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).

### $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{DPPZ})(\text{PY})]^+$

Nas análises do composto  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , merece destaque o aumento significativo de células na fase G0/G1, passando de 49,4% no grupo controle, para 57,5% nas células submetidas ao tratamento com uma concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Além disso, nas condições experimentais em que as concentrações foram fixadas em 5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ , os valores percentuais foram calculados em 53,5% e 46,3%, respectivamente. Adicionalmente, é notório que o composto exibiu uma tendência consistente de redução nas células em fase S do ciclo celular, ao mesmo tempo em que houve um aumento gradual na proporção de células na fase G2, à medida que a concentração do composto foi incrementada. Essa relação dose-dependente evidencia a influência direta do composto nas etapas do ciclo celular. Em consonância com os resultados observados nos compostos anteriores, o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  também se destaca pela sua capacidade de inibir a proliferação celular. Esse efeito inibitório é respaldado pela observação de um aprisionamento das células nas fases G0/G1 e G2, conforme representado na Figura 19.



**Figura 19:** Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células tumorigênicas HeLa tratadas com diferentes concentrações de  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$  (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ). Para o gráfico de barras, os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).

No contexto do processo intrínseco de divisão celular, os mecanismos de verificação de pontos de checagem, quando ativados em resposta a danos no DNA, desencadeiam uma interrupção da progressão do ciclo celular. Isso se traduz em um aprisionamento das células em fases específicas, como a G0/G1, conforme demonstrado por Machado *et al.* (2021) em um complexo de cobre, ou mesmo na fase G2, como evidenciado por Simpson *et al.* (2017) ao estudar complexos de rênio tricarbonílicos. Essas observações corroboram de maneira congruente com os resultados que emergiram do presente estudo. Ao restringir as células nessas fases do ciclo celular, surgem duas possíveis trajetórias: a primeira envolve a reparação dos danos celulares, enquanto a segunda pode desencadear o processo de morte celular programada, conhecido como apoptose.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo revelam que os complexos de rênio

$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$ , exibem citotoxicidade moderada contra a linhagem de câncer cervical HeLa, com  $\text{IC}_{50}$  abaixo de 50  $\mu\text{M}$ . No entanto, ao avaliar o IS, observa-se que todos os IS obtidos se mostraram em média maior que 1,5 o que já indica um certo grau de seletividade. Sendo o  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , foi o que mostrou maior capacidade citotóxica, e possível utilização em menor concentração.

A análise de docking molecular revelou interações favoráveis entre os complexos e a proteína BSA, especificamente nos sítios de triptofano 134 e 213. Notavelmente, a variação do número de anéis aromáticos nos complexos influenciou a energia de ligação, indicando uma relação entre a estrutura dos complexos e sua afinidade com a BSA.

É válido ainda destacar a capacidade dos complexos de rênio  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dpq})(\text{py})]^+$  e  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{py})]^+$  em interagir eficazmente com a molécula de DNA, evidenciada por meio do docking molecular e corroborada pelas análises de clivagem plasmidial. A preferência por interações no sulco menor do DNA, identificada nos três complexos, ressalta sua seletividade e potencial como agentes de tratamento.

A clivagem plasmidial revelou a habilidade desses complexos em induzir quebras nas fitas do DNA, uma característica bastante difundida entre os tratamentos anticancerígenos e que pode induzir a apoptose, justificando o que foi observado nas análises de apoptose em células HeLa, indicando que os complexos induzem tanto apoptose inicial quanto tardia, uma característica interessante para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas. Nesse contexto, os complexos de rênio explorados neste estudo surgem como candidatos promissores para futuros avanços no campo da terapia anticancerígena, se destacando o complexo  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ , para o qual se justificaria a utilização de estratégias de bioisosterismo para modificações moleculares que possam melhorar sua seletividade. Os resultados obtidos demonstram que complexos metálicos de rênio, são promissores agentes antitumorais e a importância de aprofundamento nas

pesquisas, com o intuito de obter agentes seguros para utilização destes como metalofármacos.

## REFERÊNCIAS

- AINUROFIQ, A. *et al.* **A review on solubility enhancement methods for poorly water-soluble drugs.** *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences* Wolters Kluwer Medknow Publications, 2021.  
[https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS\\_134\\_19](https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS_134_19)
- ALFAROUK, K. O. *et al.* **Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp.** *Cancer Cell International* BioMed Central Ltd., 15 jul. 2015.  
<https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>
- ALVES, M. O.; MAGALHÃES, S. C. M.; COELHO, B. A. A regionalização da saúde e a assistência aos usuários com câncer de mama. **Saúde e Sociedade**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 141-154, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO).  
<https://doi.org/10.1590/s0104-12902017160663>
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Understanding What Cancer Is: Ancient Times to Present | American Cancer Society.** Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/history-of-cancer/what-is-cancer.html>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- ARAÚJO FERNANDES A. G. **Quelato-Complexos de Rênio e Tecnécio com Potencial Aplicação Medicinal.** Tese de Doutorado, USP, 2013.
- ASADIAN, S.; PIRYAEI, A.; GHEIBI, N.; KALANTARI, B. A.; DAVARPANAH, M. R.; AZAD, M.; KAPUSTINA, V.; ALIKHANI, M.; NEJAD, S. M. Rhenium Perrhenate (188ReO<sub>4</sub>) Induced Apoptosis and Reduced Cancerous Phenotype in Liver Cancer Cells. p. 1–17, 2022.  
<https://doi.org/10.3390/cells11020305>
- BALAKRISHNAN, K. **Patient safety/quality improvement primer, part ii: prevention of harm through root cause analysis and action (RCA2).** *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. v. 161, n. 6, p. 911-921, 2019.  
<https://doi.org/10.1177/0194599819878683>
- BAUER, E. B.; HAASE, A. A.; REICH, R. M.; CRANS, D. C.; KÜHN, F. E. Organometallic and coordination rhenium compounds and their potential in cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, [S.L.], v. 393, p. 79-117, ago. 2019. Elsevier BV.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.04.014>
- BINKLEY, S. L. *et al.* The synthesis and toxicity of tripodal tricarbonyl rhenium complexes as radiopharmaceutical models. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 6, p. 632–638, jun. 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.02.004>
- CLAUDEL, M.; SCHWARTE, J. V.; FROMM, K. M. **New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes.** *Chemistry (Switzerland)* MDPI, , 1 dez. 2020.  
<https://doi.org/10.3390/chemistry2040056>

DA SILVA, R. G.; DA SILVA, W. E.; BELIAN, M. F. Antineoplastic chemotherapies platinum-based under the light of evolutionary biology. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1140–1167, 2018.

<https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180081>

DEBELA, D. T. et al. **New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives**. **SAGE Open Medicine** SAGE Publications Ltd, 2021.

<https://doi.org/10.1177/205031212111034366>

FENG, W.; LIANG, B.; CHEN, B.; LIU, Q.; PAN, Z.; LIU, Y. **Dyes and Pigments A tricarbonyl rhenium ( I ) complex decorated with boron dipyrromethene for endoplasmic reticulum-targeted photodynamic therapy**. *Dyes and Pigments*, v. 211, n. October 2022, p. 111077, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111077>

FERNANDES, A. G. A. **Quelato-Complexos de Rênio e Tecnécio com Potencial Aplicação Medicinal**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GHOSH, S.; PAUL, S. S.; MITRA, J.; KALYAN, K. Rhenium ( II ) nitrosyl complexes : synthesis , characterization , DFT calculations and DNA nuclease activity. n. July, p. 37–41, 2014.

<https://doi.org/10.1080/00958972.2014.924622>

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. *Chemistry of the Elements*, 2nd ed., U. K.: Butterworth-Heinemann, 1998.

HO, J.; LEE, W. Y.; KOH, K. J. T.; LEE, P. P. F.; YAN, Y.; J. **Inorg. Biochem.** 2013. 119 pág.10.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.10.011>

HUANG, Z.; WILSON, J. J. **Therapeutic and Diagnostic Applications of Multimetallic Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes**. **European Journal of Inorganic Chemistry**. John Wiley and Sons Inc, 15 abr. 2021.

<https://doi.org/10.1002/ejic.202100031>

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **A situação do câncer de mama no Brasil**: síntese de dados dos sistemas de informação. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tratamento**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/acoes-de-controle/tratamento>. Acesso em: 23 ago. 2022.

<https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2000v46n1.3398>

KONKANKIT, C. C. *et al.* Anticancer activity of complexes of the third row transition metals, rhenium, osmium, and iridium. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 30, p. 9934–9974, 2018.

<https://doi.org/10.1039/C8DT01858H>

KRISHNAMOORTHY, P. *et al.* Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and in vitro cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3376–3387, ago. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.001>

KUMAR SINGH, A. *et al.* Metal Complexes in Cancer Treatment: Journey So Far. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 4, p. e202300061, 1 abr. 2023.

<https://doi.org/10.1002/cbdv.202300061>

LIEW, H. S. *et al.* **Recent Emergence of Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes as Photosensitisers for Cancer Therapy.** **Molecules** MDPI AG, 1 set. 2020.

LIU, H. K.; SADLER, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 5, p. 349–359, 17 maio 2011.

<https://doi.org/10.3390/molecules25184176>

MACHADO, P. H. A. **Avaliação in vitro das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocômplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12.** 2019. 46 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

<https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2093>

MACHADO, Pedro Henrique Alves; PAIXÃO, Drielly Aparecida; LINO, Ricardo Campos; SOUZA, Tiago Rodrigues de; BONTEMPO, Nayara Júnia de Souza; SOUSA, L. M.; AZEVEDO, F. P. V.; ORSOLIN, P. C.; LIMA, P. M. A. P.; MARTINS, I. C. A selective Cull complex with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phenanthroline displays DNA-cleaving and pro-apoptotic properties in cancer cells. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-15, 27 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03909-1>

MAGALHÃES, C. S.; MOREIRA, A. N. **Associações entre Fatores de Risco e Complicações Bucais em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço Tratados com Radioterapia Associada ou Não à Quimioterapia.** Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 12, n. 2, abril-junho, 2012, pp. 187-193. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil.

<https://doi.org/10.4034/PBOCI.2012.122.06>

MKHATSHWA, M. *et al.* **Nanoparticles functionalised with re(I) tricarbonyl complexes for cancer theranostics.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, 2 jun. 2021.

<https://doi.org/10.3390/ijms22126546>

MOURA, J. L.; COSTA, I. F.; SANTOS, P. R. S.; SILVA, I. F.; MOURA, R. T.; CARNEIRO NETO, A. N.; FAUSTINO, W. M.; BRITO, H. F.; SABINO, J. R.;

TEOTONIO, E. E. S. Enhancing the Luminescence of Eu(III) Complexes with the Ruthenocene Organometallic Unit as Ancillary Ligand. **Inorganic Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 34, p. 13510-13524, 19 ago. 2022. American Chemical Society (ACS).  
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c02115>

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. **Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective**. **Drug Design, Development and Therapy** Dove Medical Press Ltd., , 3 mar. 2017.  
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

NASCIMENTO, A. S.; MELLO, E. V. S. L.; SCHNEIDER, L. C. L.; ALMEIDA, F. L. A. **Principais tratamentos utilizados no combate ao câncer de mama: uma revisão de literatura**. **Arquivos do MUDI**, v. 23, n. 3, p. 201-219, 2019.  
<https://doi.org/10.4025/argmudi.v23i3.51538>

NATH, M.; POKHARIA, S.; YADAV, R. Organotin(IV) complexes of amino acids and peptides. **Coordination Chemistry Reviews**, [S.L.], v. 215, n. 1, p. 99-149, maio 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545\(00\)00404-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545(00)00404-5).

PAIXÃO, D. A. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, n. li, p. 138–146, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

PAULO, F. C.; GUERRA, W.; SILVA, I.R.; SILVEIRA, J.N.; BOTELHO, F.V.; VIEIRA, L.Q.; MAIA, E.C. P. **Chem. Biodiversity**, 5, 2124, 2018.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200890193>

PERMYAKOV, E. A. Metal Binding Proteins. **Encyclopedia**, v. 1, n. 1, p. 261–292, 15 mar. 2021.  
<https://doi.org/10.3390/encyclopedia1010024>

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

SÁNCHEZ DELGADO, G. Y. et al. GOLD CHEMOTHERAPEUTIC COMPOUNDS: AN OVERVIEW of ANTICANCER Au(I/III)-COMPLEXES in RELATION to the STRUCTURE of the LIGAND. **Quimica Nova**, v. 43, n. 8, 1 set. 2020.

SCHINDLER, K.; CORTAT, Y.; NEDYALKOVA, M.; CROCHET, A.; LATTUADA, M.; PAVIC, A.; ZOBI, F. **Antimicrobial Activity of Rhenium Di- and Tricarbonyl Diimine Complexes: Insights on Membrane-Bound S. aureus Protein Binding**. **Pharmaceuticals** 2022, 15, 1107.  
<https://doi.org/10.3390/ph15091107>

SHAHABADI, A.; NEMATI, M.; HOSSEINIDOUST, S. E. The Effect of Knowledge Economy Factors on Income Inequality in the Selected Islamic Countries. **Journal of the Knowledge Economy**, v. 8, n. 4, p. 1174–1188, 1 dez. 2017.  
<https://doi.org/10.1007/s13132-016-0431-3>

SILVA, P. P. et al. **Platinum(II) Compounds of Tetracyclines as Potential Anticancer Agents: Cytotoxicity, Uptake and Interactions with DNA**. **Braz. Chem. Soc.** [s.l.: s.n.].

SILVA, P. P.; PAULA, F. C. S.; GUERRA, W.; SILVEIRA, J. N.; BOTELHO, F. V.; VIEIRA, L. Q.; BORTOLOTO, T.; FISCHER, F. L.; BUSSID, G.; TERENCEZI, H.; PEREIRA-MAIA, E. C. **Platinum (II) compounds of tetracyclines as potential anticancer agents: cytotoxicity, uptake and interactions with DNA**. *J Braz Chem Soc*, 21, 1237, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700011>

SILVA, R. G.; SILVA, W. E.; BELIAN, M. F. Antineoplastic Chemotherapics Platinum-Based Under the Light of Evolutionary Biology. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1140-1167, 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).  
<https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180081>

SIMPSON, C. L.; KIM, B. D. H.; BOURCET, M. R.; JONES, G. R.; JAKOBI, J. M. Stretch training induces unequal adaptation in muscle fascicles and thickness in medial and lateral gastrocnemii. **Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports**, [S.L.], v. 27, n. 12, p. 1597-1604, 30 jan. 2017. Wiley.  
<https://doi.org/10.1111/sms.12822>

SINGH, H. L.; VARSHNEY, A. K. Synthesis and characterization of coordination compounds of organotin(IV) with nitrogen and sulfur donor ligands. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 762–768, 2001.  
<https://doi.org/10.1002/aoc.234>

TARAI, S. K.; TARAI, ARUP; MANDAL, SAIKAT; NATH, BHASKAR; SOM, IPSITA; BHADURI, RITUPARNA; BAGCHI, ARKA; SARKAR, SOLANKI; BISWAS, ARUNIMA; MOI, SANKAR C. Cytotoxic behavior and DNA/BSA binding activity of thiosemicarbazone based Ni(II) complex: bio-physical, molecular docking and dft

THORP-GREENWOOD, F. L.; COOGAN, M. P.; MISHRA, L.; KUMARI, N.; RAI, G.; SARIPELLA, S. The importance of cellular localisation of probes: synthesis, photophysical properties, dna interactions and cellular imaging properties of rhenium dppz complexes with known cellular localisation vectors. **New J. Chem.**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 64-72, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).  
<https://doi.org/10.1039/C1NJ20662A>

UPADHYAY, A. **Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead**. **Genes and Diseases** Chongqing University, , 1 set. 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002>

VAN RIJT, S.H. SADLER, P. J. **Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs**. Drug Discov Today, 14, 1089, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.003>

VARGAS, C.; MAIA, G. **Complexos de rênio(I) e cobalto(III) como candidatos a metalofármacos antitumorais**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

VARMA, R. R.; PANDYA, J. G.; VAIDYA, F. U.; PATHAK, C.; DABHI, R. A.; DHADUK, M. P.; BHATT, B. S.; PATEL, M. N. DNA interaction, anticancer, antibacterial, ROS and lipid peroxidation studies of quinoxaline based organometallic Re(I) carbonyls. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1240, p. 130529, set. 2021. Elsevier BV.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130529>

WONG, W.; YAN, Y. K.; HOR, T. S. A.; VITTAL, J. J.; WHEATON, J. R.; HALL, I. H. **Polyhedron**, v. 21, p. 1991, 2022.

[https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(02\)01045-8](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(02)01045-8)

YADAV, M. *et al.* **Pharmaceutical properties of macrocyclic schiff base transition metal complexes: Urgent need in Today's World**. **Inorganica Chimica Acta** Elsevier B.V., 1 fev. 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2022.121300>

YANG, P.; XIE, K.; CHEN, M.; ZHANG, Z.; HUANG, B.; LI, R.; YE, R. **Investigation of Ruthenium ( II )/ Rhenium ( I ) -Daminozide Conjugates**. n. li, p. 1–12, 2023

ZELENIUK, K. V; GOLICHENKO, O. A.; SHTEMENKO, A. V; SHTEMENKO, N. I. Further evidence for redox activation of the plasmid – dirhenium(III) complexes interactions. **The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University, Series "Biology"**, n. 34, p. 11–17, 2020.

ZHENG, J.; VITTAL, J. J.; HENDERSON, W.; WHEATON, J. R.; HALL, I. H.; HOR, T. S. A.; YAN, Y. K. *J. Organomet. Chem.*, v. 650, p. 123, 2022.

[https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(02\)01200-7](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(02)01200-7)