

**ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO: ANÁLISES BIOLÓGICAS *in vitro*
COM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE E ESTABELECIMENTO
DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO CANCERÍGENAS
ORIUNDAS DE MODELO HETEROTÓPICO XENOGRÁFICO**

ANA CAROLINE MAFRA BEZERRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
MAIO DE 2025**

**ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO: ANÁLISES BIOLÓGICAS
in vitro COM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE E
ESTABELECIMENTO DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS-
TRONCO CANCERÍGENAS ORIUNDAS DE MODELO
HETEROTÓPICO XENOGRÁFICO**

ANA CAROLINE MAFRA BEZERRA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia”.

Orientador: Professor Dr. Milton Masahiko Kanashiro.

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
MAIO DE 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

B574

Bezerra, Ana Caroline Mafra.

Adenocarcinoma pancreático : análises biológicas, *in vitro*, com composto de coordenação de cobre e o estabelecimento de cultivo celular de células tronco cancerígenas oriundas de modelo heterotípico xenográfico / Ana Caroline Mafra Bezerra. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

155 f. : il.

Bibliografia: 101 - 112.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Milton Masahiko Kanashiro.

1. Câncer. 2. Células-tronco cancerígenas. 3. Modelo de xenoenxerto heterotópico. 4. Complexo de coordenação de cobre. 5. Apoptose. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO: ANÁLISES BIOLÓGICAS *in vitro* COM
COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE E ESTABELECIMENTO DE
CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO CANCERÍGENAS ORIUNDAS DE
MODELO HETEROTÓPICO XENOGRÁFICO

ANA CAROLINE MAFRA BEZERRA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutora em
Biociências e Biotecnologia

Aprovada em: 28/05/2025

Documento assinado digitalmente
 **FRANZ VIANA BORGES**
Data: 11/08/2025 11:35:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Doutor Franz Viana Borges (Instituto Federal Fluminense campus Centro
Campos dos Goytacazes – IFF).**

Documento assinado digitalmente
 **REBEKA DA CONCEICAO SOUZA**
Data: 11/08/2025 11:24:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof(a) Doutora Rebeka da Conceição Souza (Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro – UENF).**

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO HENRIQUE SEABRA**
Data: 25/08/2025 08:56:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof Doutor Sérgio Henrique Seabra (Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro – UENF).**

Documento assinado digitalmente
 **MILTON MASAHICO KANASHIRO**
Data: 26/08/2025 09:42:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Doutor Milton Masahiko Kanashiro (Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro – UENF) – Orientador.**

“Dedico todo e qualquer sucesso meu, aos meus pais, Rose Mary e Suliman Bezerra que, sob muito sol, me fizeram chegar até aqui, pela sombra e água fresca”.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A minha mãe, *Rose Mary*, que com passos firmes possibilitou todos os meus voos. Obrigada por sua dedicação e entrega genuína no papel mais admirável que é ser mãe. O nosso amor é incondicional!
- ❖ Ao meu pai, *Suliman Bezerra*, por me ensinar sobre força, resiliência e humildade. O câncer nos mostrou o poder da nossa união. Vencemos!
- ❖ Ao meu irmão, *Diego Sulliman*, que me faz acreditar com coragem na força do caminho que semeio. Seu apoio sempre é fundamental para minha existência.
- ❖ Agradeço ao meu orientador, professor *Milton Kanashiro*, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa e principalmente pelo crescimento profissional.
- ❖ Às técnicas do LBR, *Juliana Azevedo* e *Rita Escocard*, pela contribuição e paciência em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ A Faperj e Universidade Estadual Darcy Ribeiro do Norte Fluminense, pela oportunidade de construção profissional por meio do estudo e pesquisa.
- ❖ Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para avaliação deste trabalho e contribuírem com suas considerações.
- ❖ Ao revisor *Sanderson Calixto*, que prontamente pôde contribuir para que eu finalizasse esta etapa.
- ❖ Ao Professor *Eulógio* de Carvalho e ao Médico Veterinário *Pratick Gabriel Alencar* por me auxiliarem nas análises histopatológicas, agradeço imensamente a disponibilidade em ajudar.
- ❖ Aos meus amigos do LBR, *Yasmin Viana* e *Vinícius Mussi*, pelo auxílio não somente acadêmico, mas por trazerem leveza e risadas no dia a dia. E à *Kíssila Soares* por partilhar tantas vivências importantes e desafiadoras da pós-graduação comigo.
- ❖ Agradeço também ao *Sanderson Calixto*, pela vontade de ajudar e ensinar em tantos momentos. Com você, aprendi muito sobre profissionalismo, competência e generosidade. E ao querido *Fabício Moreira*, por colaborar constantemente com meu trabalho, obrigada por compartilhar seu conhecimento.
- ❖ Em especial, meu agradecimento ao meu eterno companheiro de trabalho e amigo *Lucas Ehloim*, que, para além da parceria no laboratório, me deu muito suporte emocional e esteve presente na construção de cada passo desta Tese! Tem muito de

você aqui, meu amigo! E à *Maria Núbia* por ter sido uma parceira e amiga de trabalho incansável, presente e generosa. É uma honra ter podido conviver com vocês.

- ❖ Aos meus amigos de longa data, que torceram por mim e estiveram sempre enviando mensagens e palavras de apoio, presentes ou à distância (*André Luís Monteiro, Débora Trindade, Érika Sant'Ana, Livia Concídera, Leniseth Gomes, Aline Xavier, Taymara Sabino, Ellen Oliveira, Fernanda Souza, Ana Luiza Silva, Raysa Trindade, Raquel Chagas e Karol Abreu*).
- ❖ E ao meu grande incentivador e companheiro *Khaledy (Diego Nascimento)*, o meu agradecimento por constantemente me lembrar do meu potencial, me apoiar e me ensinar sobre nunca desistir.
- ❖ Por fim, a Causa primária de todas as coisas, minha gratidão a Deus por me colocar nesta jornada, a todos que me antecederam e que criaram o solo firme para que eu pisasse, caminhasse e sonhasse. Agradeço à minha ancestralidade e a minha espiritualidade que me guiam no caminho e que nunca me deixam só.

“Um sonho que se sonha junto vira realidade!”.

Grata sou a todos!

“A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas.”

Rosalind Franklin

RESUMO

Atualmente, o câncer é compreendido como um microambiente biológico complexo, no qual as interações entre os componentes celulares e moleculares desempenham papel crucial na progressão tumoral. Essa nova perspectiva tem impulsionado a busca por novos alvos terapêuticos e uma compreensão mais aprofundada do microambiente tumoral. Nesse contexto, a biologia das células-tronco e suas propriedades intrínsecas vêm sendo reconhecidas como fundamentais na patogênese de diversos tipos de câncer, influenciando tanto o entendimento dos mecanismos envolvidos na formação tumoral quanto às estratégias terapêuticas empregadas. Nesta pesquisa, foi investigado, *in vitro*, o efeito de complexos de coordenação de cobre (H04), em adenocarcinoma pancreático. Os resultados demonstraram que o H04 apresentou atividade citotóxica significativa, superando a eficácia da cisplatina nas células testadas. A análise do mecanismo de ação revelou que o composto induz apoptose, evidenciada pelo padrão de fragmentação de DNA identificado por meio do ensaio de Sub-G1, pela perda do potencial de membrana mitocondrial detectada no ensaio de JC-1, e pela exposição da fosfatidilserina confirmada através do ensaio com Anexina V e Iodeto de Propídio. Além disso, o composto interferiu no equilíbrio redox celular, provocando estresse oxidativo em células de adenocarcinoma pancreático. Além disso, esta pesquisa buscou estabelecer, *in vivo*, o cultivo de células-tronco cancerígenas a partir de um modelo xenográfico heterotópico. A caracterização histopatológica dos tumores gerados demonstrou semelhança morfológica com os tumores originais de adenocarcinoma pancreático. A presença de uma subpopulação de células-tronco cancerígenas foi confirmada pela expressão dos marcadores CD24, CD133, CD44 e EPCAM. As células isoladas, denominadas CSC-BxPC-3, foram posteriormente submetidas a ensaios *in vitro* com o complexo H04, permitindo avaliar sua resposta ao tratamento. Esses experimentos contribuíram para a compreensão do potencial terapêutico do composto frente a células-tronco cancerígenas, além de possibilitar a comparação direta com sua linhagem parental, BxPC-3. Além dos estudos experimentais, foi realizada uma revisão sistemática com foco na aplicação de compostos de coordenação metálicos no tratamento de células-tronco cancerígenas, evidenciando o potencial desses complexos como agentes terapêuticos seletivos e promissores no combate à resistência tumoral.

Palavras-chave: Câncer; Células-tronco cancerígenas; Modelo de xenoenxerto heterotópico; Complexo de coordenação de cobre; Apoptose.

ABSTRACT

Cancer is currently understood as a complex biological microenvironment in which interactions between cellular and molecular components play a crucial role in tumor progression. This new perspective has driven the search for new therapeutic targets and a deeper understanding of the tumor microenvironment. In this context, the biology of stem cells and their intrinsic properties have been recognized as fundamental in the pathogenesis of several types of cancer, influencing both the understanding of the mechanisms involved in tumor formation and the therapeutic strategies employed. In this research, the effect of copper coordination complexes (H04) on pancreatic adenocarcinoma was investigated *in vitro*. The results demonstrated that H04 presented significant cytotoxic activity, surpassing the efficacy of cisplatin in the cells tested. Analysis of the mechanism of action revealed that the compound induces apoptosis, evidenced by the DNA fragmentation pattern identified by the Sub-G1 assay, by the loss of mitochondrial membrane potential detected by the JC-1 assay, and by the exposure of phosphatidylserine confirmed by the Annexin V and Propidium Iodide assay. In addition, the compound interfered with the cellular redox balance, causing oxidative stress in pancreatic adenocarcinoma cells. Furthermore, this research sought to establish, *in vivo*, the culture of tumor stem cells from a heterotopic xenograft model. The histopathological characterization of the generated tumors demonstrated morphological similarity with the original pancreatic adenocarcinoma tumors. The presence of a subpopulation of tumor stem cells was confirmed by the expression of the markers CD24, CD133, CD44 and EPCAM. The isolated cells, called CSC-BxPC-3, were subsequently subjected to *in vitro* assays with the H04 complex, allowing their response to treatment to be assessed. These experiments contributed to the understanding of the therapeutic potential of the compound against tumor stem cells, in addition to enabling direct comparison with its parentais line, BxPC-3. In addition to the experimental studies, a systematic review was conducted focusing on the application of metal coordination compounds in the treatment of cancer stem cells, highlighting the potential of these complexes as selective and promising therapeutic agents against tumor resistance.

Keywords: Cancer; Tumor stem cells; Heterotopic xenograft model; Copper coordination complex; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Números estimados de 2022 a 2050, homens e mulheres, idade (0-85+) no mundo.....	18
Figura 2 - Principais alternativas e estratégias terapêuticas no tratamento do adenocarcinoma pancreático.....	24
Figura 3 - Etapas da Oncogênese.....	27
Figura 4 - Linha do tempo de descobertas de mortes celulares.....	32
Figura 5 - Representação esquemática das vias da apoptose.....	33
Figura 6 – Análise do ciclo celular da linhagem Bxpc-3.....	55
Figura 7 - Análise do tipo de morte induzido pelo composto de cobre H04 através da exposição de fosfatidilserina (PS) e marcação com anexina V e iodeto de propídio em células da linhagem BxPc-3.....	57
Figura 8 - Concentração inibitória para 50% (IC ₅₀) das células pertencentes à linhagem BXPC-3 quando tratadas com H04 e Cisplatina na presença e ausência do antioxidante NAC.....	59
Figura 9 - Análise da produção de ROS em células Bxpc-3 por citometria de fluxo após tratamento com cisplatina por 24 horas.....	60
Figura 10 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial marcadas com a sonda fluorescente JC-1 foram analisadas por citometria de fluxo após incubação por 48h.....	64
Figura 11 - Biomarcadores para células-tronco cancerígenas em tumores sólidos e malignidades hematopoiéticas.....	73
Figura 12 - Acompanhamento do crescimento tumoral em camundongos Balb/c nude.....	81
Figura 13 - Histopatologia no H/E, em secções do tumor Bxpc-3 induzido em Balb C/ Nude.....	83
Figura 14 - Percentual de células CSC-BxPC-3 que expressam os marcadores HLA-ABC (Alexa Fluor 488-A) e H2K-d (BV711-A), analisado por citometria de fluxo.....	85
Figura 15 - Concentração inibitória para 50% (IC ₅₀) das células pertencentes à linhagem CSC - BXPC-3 quando tratadas com H04 e Cisplatina na presença e ausência do antioxidante NAC.....	91
Figura 16 - Análise da produção de ROS em células CSC - Bxpc-3 por citometria de fluxo após tratamento com cisplatina por 24 horas.....	96
Figura 17 - Análise da produção de ROS em células CSC - Bxpc-3 por citometria de fluxo após tratamento com cisplatina por 24 horas.....	95
Figura 18 - Análise do tipo de morte induzido pelo composto de cobre H04 através da exposição de fosfatidilserina (PS) e marcação com anexina V e iodeto de propídio em células da linhagem CSC - BxPc-3.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC ₅₀ (μmol/L)	51
Tabela 2. Índice de seletividade (I.S). Indica a citotoxicidade seletiva dos compostos para cada linhagem neoplásica tratadas com os compostos H04 e H03 comparado ao PBMC e a BEAS – 2B.	51

LISTA DE ABREVEATURAS

A549 – Linhagem de carcinoma de pulmão humano
ACC – Carcinoma de células acinares
ADP – Adenocarcinoma pancreático
APAF-1 – Protease de ativação apoptótica de fator 1 (<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>)
B16-F10 – Linhagem celular murina estabelecida de melanoma metastático
Bax – Proteína X associada a uma proteína antiapoptótica da família Bcl-2 (<i>Protein X associated with an antiapoptotic protein of the Bcl-2 family</i>)
Bcl-2 – proteína antiapoptótica, linfomas de células B 2(<i>B cell lymphoma 2</i>)
Bid – <i>BH3</i> Linfoma de células B 2 Homologia 3 agonista de morte de domínio de interação agonista de morte de domínio de interação (<i>B cell lymphoma 2 Homology 3 interacting-domain death agonist interacting-domain death agonist</i>)
BxPC-3 – Linhagem de adenocarcinoma pancreático humano
CDDP – Cisplatina
CDKs – Quinases dependentes de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinases</i>)
CP – Câncer de pâncreas
CSC – BxPC-3 – Linhagem celular oriunda de tumor murino inoculado com BxPC-3
DAMPs – Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DISC – Complexo indutor de sinal de morte (<i>Death signal inducing complex</i>)
DMEM/F-12 – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco: mistura de nutriente F-12 (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12</i>)
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EMT – Epitelial-mesenquimal
ROS – Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
FADD – Fas associado ao domínio de morte (<i>Fas-Associated Death Domain</i>)
FAS – Receptor de morte celular
FDA – <i>Food and Drug Administration</i>
GSDMD – Gasdermina D
IAP – Inibidor da Proteína de Apoptose (<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>)
IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IC₅₀ – Concentração inibitória necessária para matar 50% da população celular
IDH – Índice de desenvolvimento humano
IMC – Índice de massa corporal
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IsopOH – Isopropanol
JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LT-α – Linfotóxina-α
MDA-MB231 – Linhagem de adenocarcinoma de mama humano
MCF-7 – Câncer de mama (<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>)
MCP – Morte celular programada

MEC – Matriz extracelular
MFI - Intensidade mediana de fluorescência (*Median fluorescence intensity*)
MDM2 – Murino duplo minuto 2 (*Murine double minute 2*)
MOLT-4 – Linhagem celular humana de leucemia linfóide aguda
MOMP – Permeabilização da membrana externa mitocondrial
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio
Nec-1 – Necrostatina-1
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)
PBS – Tampão Salino Fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)
PC3 – Linhagem de adenocarcinoma de próstata
PI – Iodeto de propídio (*Propidium iodide*)
SMAC/DIABLO – Segundo ativador de caspases / proteína de ligação direta a IAP derivado de mitocôndrias com baixo pI (*Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI*)
SMAC – Ativador de caspases derivado da mitocôndria (*Mitochondria-derived caspase activator*)
TC – Tomografia computadorizada
THP-1 – Linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda
TNF – Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (*Tumor necrosis factor- α*)
TNFr – Superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor receptor superfamily*)
TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)
U937 – Linhagem celular humana de linfoma histiocítico

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	Erro! Indicador não definido.
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE ABREVEATURAS	11
CAPÍTULO I - Análises biológicas <i>in vitro</i> com composto de coordenação de cobre (H04).	
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Estimativas do câncer.....	17
2.2 Câncer de pâncreas (Adenocarcinoma Pancreático).....	19
2.3 Aspectos Bioquímicos do Câncer: Mecanismos Celulares e Moleculares na Progressão Tumoral.....	25
2.3.1 Câncer e metastase	25
2.3.2 Ciclo celular no câncer	29
2.3.3 Mecanismo de morte celular	31
2.4 Terapias para o câncer	38
2.5 Compostos de coordenação de cobre	40
2.6 A pesquisa dos complexos de coordenação e o laboratório de biologia do reconhecer (lbr).....	42
3 JUSTIFICATIVA.....	43
4 OBJETIVOS	44
4.1. Objetivo geral.....	44
4.2. Objetivos específicos.....	44
5 MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 Cultivo celular	45
5.2 Diluição e armazenamento dos compostos	45
5.3 Avaliação do efeito citotóxico dos compostos por meio da metabolização mtt [3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio]	46
5.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (SUB-G1).....	47
5.5 Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)	48
5.6 Confirmação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através do Inibidor N-Acetil-L-Cisteína (NAC).....	48
5.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	49

5.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.....	49
5.9 Análise estatística.....	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1 Análise da citotoxicidade induzida pelos compostos por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio).....	50
6.2 Avaliação de alterações e fragmentação do DNA no ciclo celular (SUB-G1).....	55
6.3 Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).....	57
6.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	59
6.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi M$).....	63

CAPÍTULO II – Estabelecimento de células –tronco tumorais de adenocarcinoma pancreático a partir de modelo heterotípico xenográfico

1. INTRODUÇÃO.....	66
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	67
2.2 Células-tronco cancerígenas.....	67
2.3 Biomarcadores de células-tronco cancerígenas de pâncreas.....	71
2.4 Modelo experimental de tumores murinos.....	75
3 JUSTIFICATIVA.....	76
4 OBJETIVOS.....	76
4.1 Objetivo geral.....	76
4.2 Objetivos específicos.....	76
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
5.1 Experimentação in vivo.....	77
5.1.1 Aims.....	77
5.1.2 Desenvolvimento de lesões tumorais.....	77
5.1.3 Análises Histopatológicas.....	77
5.2 Cultivo celular in vitro dos tumores sólidos originários do modelo experimental de tumores murinos.....	78
5.3 Caracterização de células-tronco cancerígenas com marcação de anticorpos.....	79
5.4 Análise da viabilidade celular, avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).....	79
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	79
6.1 Indução de tumores no modelo experimental murino e caracterização de células tronco tumorais com marcação de anticorpos.....	79

6.2 Análise da viabilidade celular e avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	89
6.3 Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).....	94
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS	98
CAPÍTULO III – Ensaios pré-clínicos de células-tronco cancerígenas direcionadas por complexos de coordenação baseados em metais: uma revisão sistemática.	
1 JUSTIFICATIVA.....	65
2 OBJETIVOS.....	65.
2.2 Objetivo geral.....	65
2.3 Objetivos específicos.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
4 RESUMO GRÁFICO DA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	100
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICES	
A - REVISÃO SISTEMÉTICA	
B - MATERIAL SUPLEMENTAR	

CAPÍTULO I - Análises biológicas *in vitro* com composto de coordenação de cobre (H04).

1 Introdução

As origens do câncer são multifatoriais e podem ser atribuídas tanto a fatores internos, também chamados de hereditários, responsáveis por aproximadamente 5 a 10% dos casos, quanto a fatores externos, que representam a grande maioria das ocorrências (Mattiuzzi; Lippi, 2019). Em termos gerais, o contato contínuo do indivíduo com agentes carcinogênicos desencadeia alterações genéticas que favorecem a transformação neoplásica das células. Esses agentes são classificados em três categorias principais: físicos, como as radiações ultravioleta e ionizante; químicos, incluindo substâncias como o tabaco, o álcool, as aflatoxinas e o amianto; e biológicos, envolvendo infecções causadas por certos vírus, bactérias ou parasitas. Além desses, comportamentos e condições ambientais, como uma alimentação inadequada, o sedentarismo e a exposição à poluição, também são considerados fatores de risco significativos para o surgimento do câncer.

Inicialmente, pesquisadores identificaram um conjunto de características fundamentais compartilhadas entre os diferentes tipos de câncer. Entre elas, destacam-se a autonomia em relação aos sinais reguladores de crescimento, a capacidade de infiltrar tecidos adjacentes, a indução da angiogênese, a evasão dos limites replicativos e a resistência aos mecanismos de morte celular programada. Esse conjunto de características foi expandido para incluir a capacidade do tumor de escapar à resposta imune antitumoral, a instabilidade genômica e a reprogramação metabólica, consolidando essas marcas como pilares centrais no processo de carcinogênese. Em anos mais recentes, novas evidências têm destacado a relevância das alterações epigenéticas e da plasticidade fenotípica como componentes cruciais na progressão tumoral. Entre essas múltiplas propriedades, a proliferação sustentada, a instabilidade genômica e a plasticidade fenotípica se destacam como elementos particularmente significativos na biologia do câncer metastático (Hanahan, et al., 2011; 2020; 2022).

Os compostos de coordenação metálica vêm sendo objeto de estudo desde a descoberta e ascensão da cisplatina, que permanece, até os dias atuais, como uma das principais estratégias terapêuticas no tratamento de diversos tipos de câncer. No entanto, devido aos efeitos colaterais significativos associados ao seu uso, a pesquisa por novos

compostos que sejam mais eficazes e, ao mesmo tempo, menos tóxicos continua sendo uma prioridade. O objetivo é oferecer alternativas terapêuticas que proporcionem melhores resultados clínicos e reduzam os impactos adversos sobre a qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento oncológico.

Seguindo essa vertente de estudo, nosso grupo de pesquisa tem relatado resultados promissores de trabalhos que consistem na síntese, caracterização e investigação da atividade biológica de alguns compostos de coordenação com centros de cobre (II) (Bezerra, et al., 2021; Silva, et. al. 2021; Maciel, et. al., 2019; Borges, et al., 2016; Fernandes, et al., 2015), ferro (III) (Siqueira, et. al., 2020; Horn, et al., 2013), cobalto (II) (Morcelli, et al., 2016) e platina (II) (Moreira, et al., 2019).

Dessa forma, a importância dos compostos de coordenação metálica e o constante avanço nessa área têm impulsionado a busca por novas estruturas com maior eficácia, menor toxicidade e potencial terapêutico não apenas no tratamento do câncer, mas também em outras áreas da medicina. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal a investigação de novos compostos de coordenação, bem como a avaliação de seus efeitos biológicos na terapêutica oncológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estimativas do câncer

O câncer é um problema de saúde pública global. Na última década, a incidência aumentou 20%, e espera-se que, até 2030, ocorram mais de 25 milhões de novos casos. A vigilância do câncer é essencial para o planejamento, monitoramento e avaliação das ações de controle (Santos, 2024). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), (2024), a previsão é de mais de 35 milhões de novos casos de câncer em 2050, um aumento de 77% em relação aos 20 milhões de casos estimados em 2022. O rápido crescimento da carga global de câncer reflete o envelhecimento e o crescimento da população, bem como as mudanças na exposição a fatores de risco, muitos dos quais estão associados ao desenvolvimento socioeconômico.

Em termos absolutos, estima-se que os países com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) registrem o maior acréscimo no número de casos de câncer, com cerca de 4,8 milhões de novos diagnósticos esperados em 2050, em comparação às estimativas de 2022. No entanto, o aumento proporcional da incidência

será mais expressivo nos países com baixo IDH (crescimento de 142%) e médio IDH (99%). Estima-se ainda que, nessas regiões, a mortalidade por câncer praticamente dobrará até 2050. (Organização pan-americana da saúde, 2025). O *CANCER TOMORROW* oferece um conjunto de ferramentas de visualização de dados para prever a incidência e mortalidade futuras de câncer para um determinado país ou região. Essas previsões são baseadas nas estimativas atuais de 2022 e se estendem até 2050, abrangendo 36 tipos específicos de câncer, bem como todos os tipos combinados, em 185 países ou territórios. As estimativas são segmentadas por sexo e faixa etária, como parte do projeto *GLOBOCAN* (Ferlay, 2024).

No Brasil, devido às suas dimensões continentais e heterogeneidade em termos de território e população, o perfil de incidência reflete a diversidade das regiões geográficas, apresentando padrões que coexistem tanto com os de países desenvolvidos quanto com os de países em desenvolvimento. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), são esperados 704 mil novos casos de câncer no triênio 2023-2025. Excluindo o câncer de pele não melanoma, ocorrerão 483 mil novos casos. Os cânceres de mama feminina e de próstata foram os mais incidentes, com 73 mil e 71 mil novos casos, respectivamente. Em seguida, vêm os cânceres de cólon e reto (45 mil), pulmão (32 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (17 mil) (Brasil, 2025).

De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), estima-se que, até 2050, a incidência de câncer atinja 19 milhões de novos casos em homens e 16,3 milhões em mulheres (Figura 1). Quanto à mortalidade, projeta-se que o câncer será responsável por 10,5 milhões de óbitos entre homens e 8,0 milhões entre mulheres, considerando todos os tipos da doença.

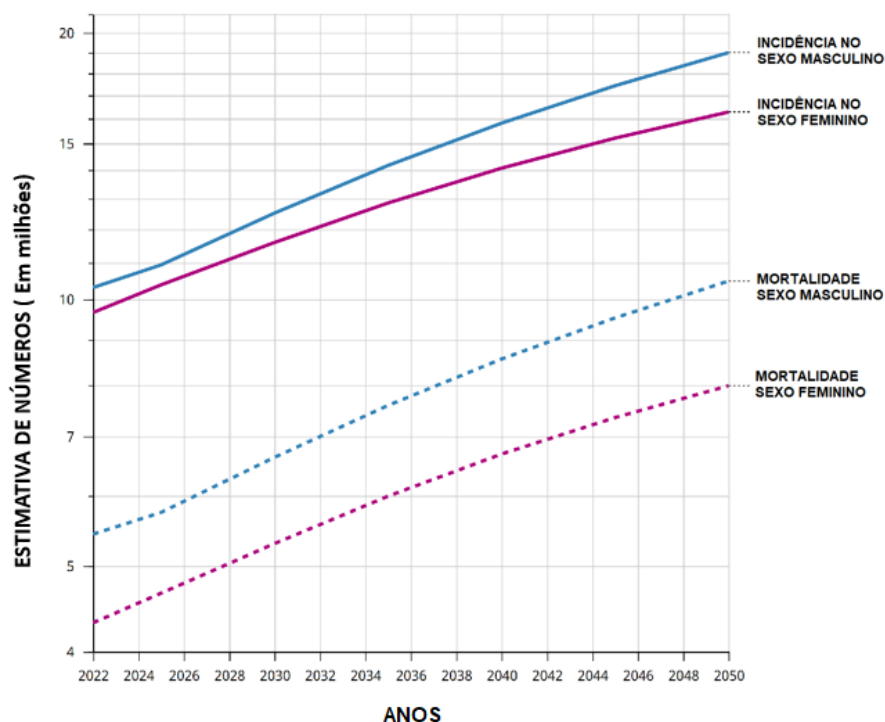


Figura1: Números estimados de 2022 a 2050, homens e mulheres, idade (0-85+) no mundo. Adaptado de Observatório Global do Câncer, 2025 (<https://gco.iarc.who.int>).

Diante desses dados e projeções, é notável o quanto o câncer representa um dos maiores desafios para a saúde pública mundial, sendo responsável por uma elevada carga de morbidade e mortalidade. As estimativas globais indicam que sua incidência continua a crescer, impulsionada por fatores como o envelhecimento populacional, mudanças nos estilos de vida e exposições ambientais. Nesse contexto, os estudos sobre o câncer tornam-se cada vez mais relevantes, não apenas para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na iniciação, progressão e disseminação tumoral, mas também para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e terapias mais eficazes. Investir em pesquisa oncológica é fundamental para reduzir o impacto social e econômico da doença e para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes em escala global.

2.2 Câncer de pâncreas (Adenocarcinoma Pancreático)

O câncer de pâncreas (CP) é classificado como um dos tipos mais letais, segundo o *Global Cancer Observatory* (2024), uma vez que, na maioria dos casos, é diagnosticado em estágios avançados e apresenta uma taxa de sobrevida em cinco anos

inferior a 9%. A origem do câncer de pâncreas é complexa e envolve múltiplos fatores, incluindo componentes genéticos, ambientais e comportamentais. Pesquisas indicam que práticas como o tabagismo, a obesidade e uma alimentação inadequada estão fortemente relacionadas a um maior risco de desenvolvimento da doença (Maisonneuve; Lowenfels, 2015). Mesmo com esses avanços, os processos moleculares que conduzem ao surgimento e à progressão do câncer pancreático ainda não são totalmente compreendidos, o que dificulta as estratégias de prevenção e o diagnóstico precoce (Gonçalves, et al, 2024).

Um dos grandes desafios no manejo clínico do Adenocarcinoma pancreático ductal (ADP) é a falta de métodos eficazes para diagnóstico precoce, o que reduz significativamente as opções terapêuticas disponíveis. A gemcitabina, um análogo da pirimidina, foi durante muitos anos considerada a principal droga utilizada como terapia de primeira linha no tratamento do ADP em estágio avançado (Yue Q., et al, 2017). Apesar de seu uso consolidado, a resposta terapêutica à gemcitabina permanece limitada, com eficácia observada em apenas 23,8% dos pacientes. Essa baixa taxa de resposta é, em grande parte, atribuída à presença de um estroma tumoral extremamente denso, característico do microambiente tumoral pancreático, que atua como uma barreira física, dificultando a penetração e a difusão adequada do fármaco até as células malignas (Zong Y, et al, 2020). Além disso, o estroma também desempenha um papel ativo na promoção da resistência ao tratamento, tornando o ADP particularmente resistente às terapias convencionais.

O pâncreas é formado por duas porções funcionais distintas: o componente exócrino e o componente endócrino. A parte exócrina é constituída principalmente por células ductais e acinares, responsáveis pela produção e secreção de enzimas digestivas, enquanto o componente endócrino é formado pelas células das ilhotas de Langerhans, que regulam a homeostase glicêmica através da liberação de hormônios. A maioria das neoplasias pancreáticas origina-se de um único tipo celular, podendo ser de origem exócrina ou endócrina. Em geral, os tumores se desenvolvem predominantemente a partir de células ductais — a forma mais frequente —, embora possam também surgir das células das ilhotas, em menor proporção, ou, mais raramente, das células acinares. De maneira expressiva, cerca de 95% dos tumores exócrinos pancreáticos são classificados como ADP). Em contraste, o carcinoma de células acinares (ACC) é uma neoplasia pouco comum, correspondendo a apenas 1% a 2% de todos os tumores

pancreáticos (Kimura, T. et al, 2020; Siegel RL, Miller KD, Jemal A., 2015; Stelow EB, et al, 2010).

Além das próprias células malignas, o microambiente tumoral foi reconhecido como um elemento crucial na promoção da progressão do câncer e na modulação da resposta imune antitumoral. O câncer de pâncreas, em particular, é caracterizado por uma baixa densidade celular neoplásica e pela presença de uma matriz extracelular densa e fibrótica. Embora essa matriz espessa seja amplamente associada à obstrução da penetração de agentes terapêuticos e à limitação da infiltração de células do sistema imune, ela também desempenha um papel fundamental na sustentação do microambiente tumoral, favorecendo o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas (Del Chiaro, et al, 2023; Callery MP, et al, 2009).

Os sinais clínicos do câncer de pâncreas são, em grande parte, inespecíficos, o que contribui para o diagnóstico tardio, geralmente em estágios avançados, após o tumor já ter se expandido localmente ou metastatizado. Em um estudo prospectivo multicêntrico envolvendo 391 pacientes encaminhados por suspeita de neoplasia pancreática — dos quais 119 foram confirmados com diagnóstico de câncer de pâncreas —, os sintomas iniciais mais frequentemente relatados incluíram redução do apetite (28%), dispepsia (27%) e alterações nos hábitos intestinais (27%) (Walter FM, et al, 2016). Observou-se que essas manifestações iniciais foram semelhantes tanto no grupo com câncer quanto no grupo sem câncer. No entanto, determinados sintomas subsequentes mostraram associação mais significativa com a presença de malignidade pancreática, como icterícia (49% nos casos confirmados vs. 12% nos não confirmados), fadiga (51% vs. 26%), perda de apetite persistente (48% vs. 26%), emagrecimento involuntário (55% vs. 22%) e mudanças nos hábitos intestinais (41% vs. 16%) (Del Chiaro, et al, 2023).

O diagnóstico do câncer de pâncreas envolve uma série de exames e procedimentos que visam confirmar a presença da doença e determinar sua extensão. Entre os exames de imagem, destacam-se a tomografia computadorizada, que utiliza raios-X, e a ressonância magnética, que faz uso de campos magnéticos para visualizar o pâncreas e identificar possíveis anomalias (Del Chiaro, et al, 2023). A ultrassonografia, que emprega ondas sonoras para gerar imagens do interior do corpo, também é útil na detecção de irregularidades no pâncreas. Além disso, exames de sangue podem ser realizados para medir níveis elevados de substâncias específicas, frequentemente

encontradas em pacientes com câncer pancreático. Em muitos casos, é necessária uma biópsia, procedimento no qual uma amostra de tecido do pâncreas é coletada para análise laboratorial e confirmação do diagnóstico. A endoscopia e a ecoendoscopia envolvem a inserção de um tubo flexível com câmera ou ultrassom, passando pela boca até o intestino delgado, permitindo a visualização do pâncreas e a coleta de amostras para biópsia. Em situações em que os métodos anteriores não fornecem resultados conclusivos, a laparoscopia pode ser indicada. Esse exame minimamente invasivo consiste na inserção de um pequeno tubo com câmera por meio de uma incisão na parede abdominal, permitindo a inspeção direta do pâncreas e de outras estruturas abdominais (Hospital Israelita Albert Einstein, 2025).

Uma série de fatores de risco está associada com o possível desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático, entre os quais se destaca o histórico familiar. Estima-se que até 10% de todos os cânceres de pâncreas sejam de origem familiar, (Del Chiaro, et al, 2023). Pacientes que possuem dois parentes de primeiro grau diagnosticados com câncer de pâncreas apresentam uma taxa de incidência padronizada de 6,4, o que corresponde a um risco vitalício estimado entre 8% e 12%. Por outro lado, indivíduos que têm três parentes de primeiro grau com histórico de câncer pancreático apresentam uma taxa de incidência padronizada significativamente mais elevada, de 32, implicando um risco vitalício de aproximadamente 40% (Del Chiaro, et al, 2023; Klein AP, Brune KA, Petersen GM, 2004).

Os fatores clássicos relacionados ao estilo de vida seguem um padrão semelhante ao observado em diversos outros tipos de câncer. Entre eles, destacam-se: o tabagismo, associado a um risco relativo de 1,8% para fumantes ativos e de 1,2% para ex-fumantes (Lugo A, Peveri G, Bosetti C, 2018); a obesidade, na qual um aumento de cinco unidades no índice de massa corporal (IMC) eleva o risco relativo em 1,10%; e fatores mais específicos, como o diabetes mellitus, que apresenta um risco relativo de 1,94% (Kierkegaard J, Mortensen FV, Cronin-Fenton D, 2017). É importante ressaltar que o diabetes mellitus, além de constituir um fator de risco, também pode representar uma manifestação precoce do câncer de pâncreas — especialmente quando surge em indivíduos mais velhos, podendo servir como indicativo inicial da doença e possibilitar o diagnóstico em estágios mais precoces. Outro fator relevante é a pancreatite crônica, que está associada a um risco relativo elevado de 16,16% (Chari ST, et al, 2022).

Por fim, no que se refere aos fatores de risco, destacam-se também aqueles associados a mutações da linha germinativa e a síndromes hereditárias específicas. Entre eles, incluem-se: mutações nos genes LKB1/STK11, responsáveis pela síndrome de Peutz-Jeghers, com um risco relativo estimado em 132%; a mutação CDKN2A/p16, associada à síndrome do melanoma de pinta múltipla atípica familiar, com risco relativo variando entre 13% e 22%; as mutações BRCA1 e BRCA2, relacionadas à síndrome hereditária do câncer de mama e ovário, com risco relativo de 2% e 10%, respectivamente (Rebours V, et al, 2008); mutações nos genes PRSS1, CPA1, CTSC e SPINK1, que caracterizam a pancreatite hereditária e conferem risco relativo entre 53% e 87% (Kastrinos F, et al, 2009) mutações nos genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, associadas à síndrome de Lynch, cujo risco relativo pode chegar a 8,6%; e, por fim, mutações nos genes PALB2 e ATM, para os quais o risco relativo específico ainda não foi completamente estabelecido (Del Chiaro, et al, 2023).

O tratamento do câncer de pâncreas é determinado principalmente pelo estágio da doença e pode envolver diferentes abordagens terapêuticas combinadas. Em casos iniciais, a cirurgia é considerada a principal opção com intenção curativa, visando a remoção completa do tumor, do segmento pancreático acometido e dos linfonodos regionais. A quimioterapia é frequentemente utilizada, isoladamente ou em combinação com outros métodos, com o objetivo de destruir as células tumorais ou impedir seu crescimento e disseminação. A radioterapia, por sua vez, utiliza radiação de alta energia, de forma precisa e controlada, para eliminar células cancerígenas, podendo ser empregada de maneira adjuvante à cirurgia ou à quimioterapia, a fim de potencializar os resultados terapêuticos. Além disso, a terapia-alvo representa uma estratégia mais recente e personalizada, utilizando medicamentos que atuam diretamente sobre genes ou proteínas específicas das células tumorais, contribuindo para a redução ou eliminação do tumor de forma mais seletiva (Hospital Israelita Albert Einstein, 2025). Deste modo, observa-se na **Figura 2**, o esquema geral das principais alternativas e estratégias terapêuticas no tratamento do adenocarcinoma pancreático.

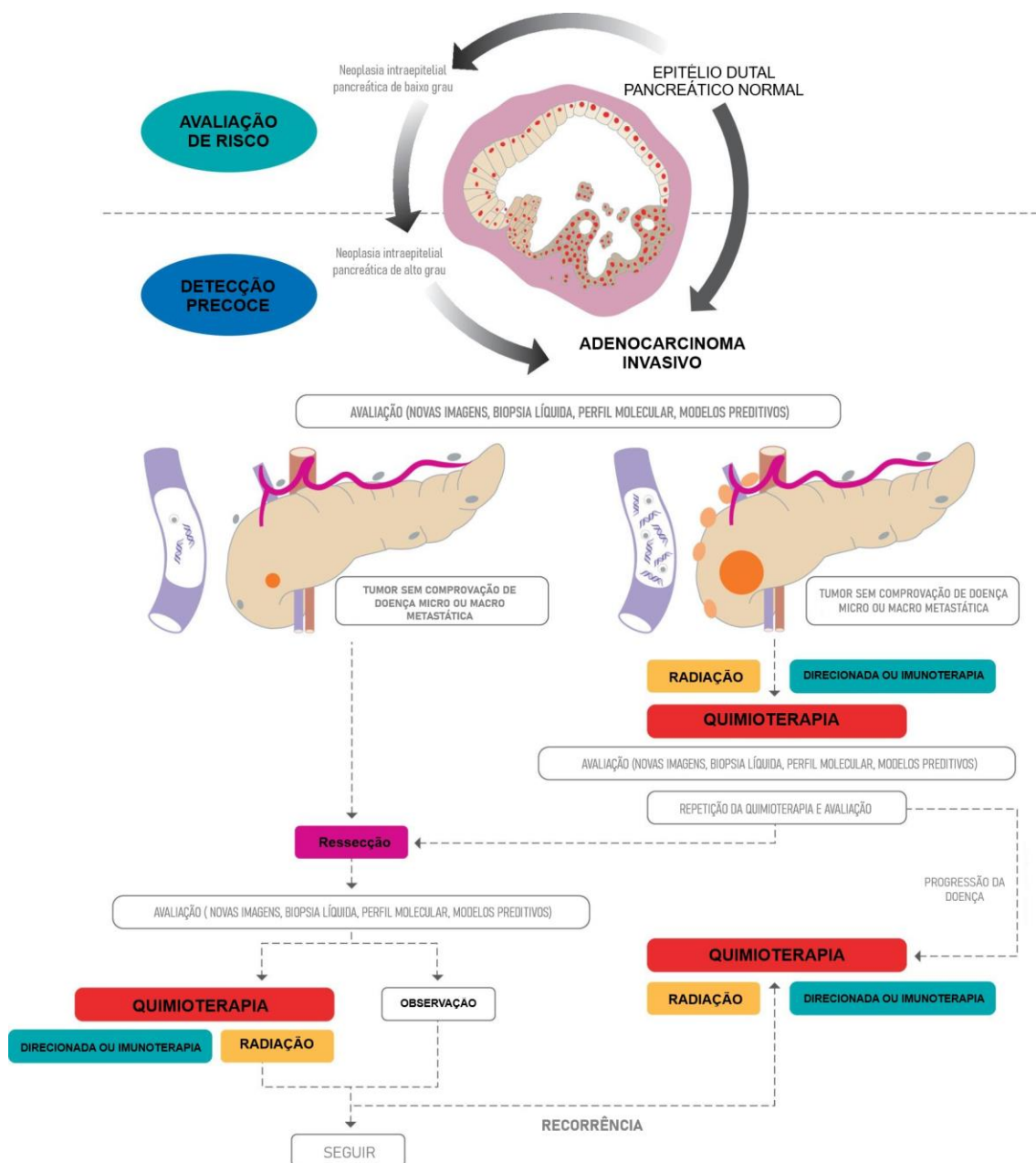


Figura 2: Principais alternativas e estratégias terapêuticas no tratamento do adenocarcinoma pancreático. Adaptada de (Del Chiaro, et al, 2023).

Em complemento a essas estratégias, o marcador tumoral CA19-9 tem sido amplamente utilizado para monitorar a resposta terapêutica e estimar o prognóstico de pacientes com câncer de pâncreas. Uma meta-análise demonstrou que os níveis de CA19-9 estão correlacionados com a eficácia do tratamento pré-operatório, indicando que a normalização desse marcador ou uma redução superior a 50% em relação ao valor inicial são fatores preditivos favoráveis de sobrevida. Complementar a isso, um estudo retrospectivo recente que avaliou a combinação entre a tomografia computadorizada

(TC) e o CA19-9 evidenciou um bom desempenho na previsão da sobrevida após a realização de quimiorradioterapia (Kim SS, et al, 2022).

Apesar dos avanços no entendimento do câncer de pâncreas, essa neoplasia continua sendo uma das mais agressivas, com altas taxas de mortalidade. A principal dificuldade no combate a essa doença reside em sua detecção precoce, uma vez que os métodos de diagnósticos atuais muitas vezes não são eficazes até que o câncer tenha atingido estágios avançados, limitando significativamente as opções terapêuticas. No entanto, diversas pesquisas têm aprimorando continuamente o conhecimento sobre essa doença, proporcionando novas perspectivas que tornam as descobertas cada vez mais promissoras. O aprofundamento na compreensão dos mecanismos moleculares que sustentam o desenvolvimento e a progressão do câncer pancreático abre caminho para inovações no tratamento. Além disso, essas novas abordagens terapêuticas, combinadas com os tratamentos já existentes, oferecem a esperança de melhores resultados e um futuro mais otimista para os pacientes.

2.3 Aspectos Bioquímicos do Câncer: Mecanismos Celulares e Moleculares na Progressão Tumoral

2.3.1 Câncer e Metástase

Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2024), o câncer é caracterizado como um tipo de tumor que apresenta crescimento celular anormal e possui o potencial de invasão ou disseminação do órgão de origem para outras regiões do corpo. Os tumores desenvolvem essa capacidade invasiva ou disseminativa por meio da aquisição de múltiplos fenótipos malignos, resultantes de alterações genéticas e epigenéticas que interrompem importantes vias celulares, como os mecanismos de dano e reparo do DNA, controle da proliferação celular e prevenção da destruição imunológica (Hanahan D. *et al*, 2022; Vinhedo, *et al*, 2011). Além disso, os cânceres exibem características conhecidas que os dotam de maior sobrevivência e capacidade proliferativa, frequentemente como resultado de mutações desestabilizadoras (Kiri, S., Ryba, 2024).

A desordem genética que origina o câncer envolve genes cruciais na regulação do ciclo celular e no processo de apoptose. Os principais grupos de genes responsáveis pela cancerogênese são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (Civetta, L. Civetta, M. 2011; Vogelstein, K, 2004). Mutações em genes que codificam as proteínas p53, Rb, p16/CDKN2A e CDKN1B levam à perda da regulação do ciclo celular. Como

essas proteínas desempenham um papel essencial na prevenção da proliferação celular descontrolada, sua alteração resulta na formação de uma massa tecidual anormal com alta capacidade proliferativa, conhecida como neoplasia (Zhang; Tang; Rycaj, 2018).

As neoplasias, que incluem o câncer *in situ* e o câncer invasivo, caracterizam-se pelo crescimento descontrolado das células e, na prática, são denominados tumores (Inca; Silva, 2018). Esses tumores podem ser classificados como benignos ou malignos, sendo que o termo "câncer" é utilizado exclusivamente para neoplasias malignas. Essa nomenclatura surgiu devido à capacidade dessas células de invadir tecidos adjacentes e disseminar-se pelo organismo (Unicamp, 2019).

O processo de formação do câncer é denominado carcinogênese ou oncogênese, e geralmente ocorre de forma lenta, podendo levar anos até que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível. Nesse contexto, os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos são responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor (Inca, 2019). A rápida replicação de células tumorais é uma característica fundamental da carcinogênese, conforme representado na **Figura 2**. A evasão dos pontos de verificação de controle do ciclo celular, que regulam a divisão celular, constitui um dos principais mecanismos que favorecem esse crescimento agressivo (Kiri, S., Ryba, 2024).

Inicialmente, Hanahan e Weinberg (2011), descreveram diversas características essenciais que são comuns a todos os tipos de câncer: a independência da sinalização de crescimento controlado, a capacidade de se disseminar para outros tecidos, a formação direcionada de vasos sanguíneos, a evasão dos limites replicativos e a regulação negativa das vias responsáveis pela morte celular programada. Cerca de dez anos depois, pesquisadores expandiram essas características para incluir a resposta anti-imune dos tumores, a instabilidade genômica e a desregulação metabólica, que também passaram a ser consideradas características proeminentes da carcinogênese. Mais recentemente, o papel da modificação epigenética e da flexibilidade fenotípica foi destacado como processo ou fator impulsionador do desenvolvimento do câncer. Dentre essas características, a proliferação contínua, a instabilidade do genoma e a flexibilidade fenotípica são particularmente relevantes para o câncer metastático (Hanahan, Douglas 2022).

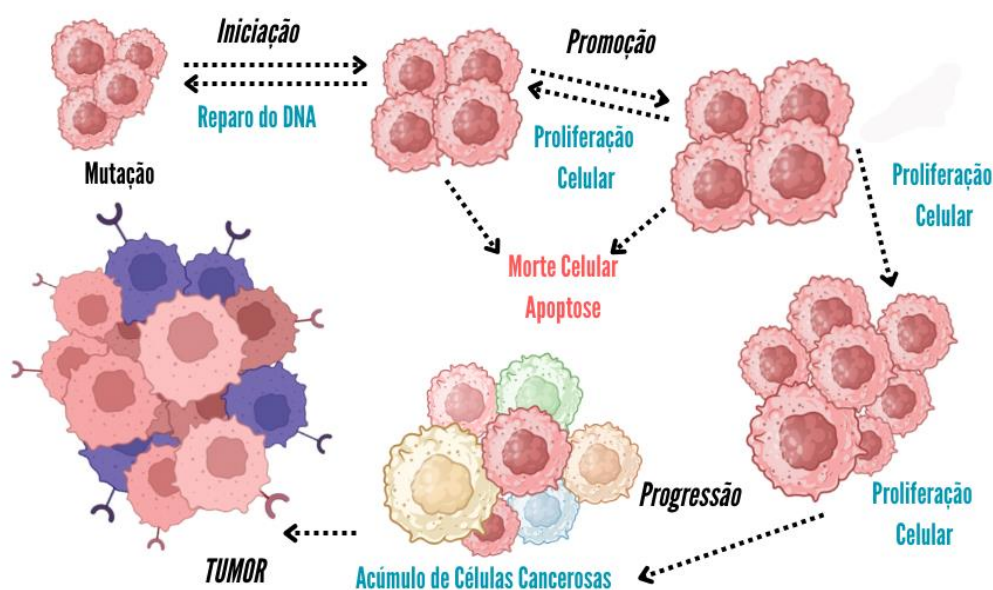


Figura 3: Etapas da Oncogênese. Representadas da seguinte forma: Iniciação (uma célula sofre uma mutação genética), promoção (a célula iniciada começa a se multiplicar); e progressão (a célula se torna maligna e assim o tumor ganha mais mutações, se torna mais agressivo e invade tecido). Da autora (2025).

A progressão do câncer para a metástase é impulsionada por uma combinação de alterações genéticas e epigenéticas que desregulam os processos celulares fundamentais, como a sobrevivência celular, a invasão e a interação com o microambiente (Hanahan, 2011). De acordo com Massagué, J. e Obenauf, AC (2020), as células metastáticas possuem a capacidade de se adaptar a microambientes distantes por meio de vias moleculares específicas, como a ativação da via *TGF-β*, que facilita a sobrevivência em órgãos-alvo como o fígado e o cérebro.

Segundo o INCA (2024), a metástase é definida como o acometimento de uma área distante pelo tumor, sem relação direta com o foco primário. A disseminação tumoral é um processo complexo e ainda não completamente elucidado, que pode ser dividido em cinco etapas:

- 1) invasão e infiltração de tecidos subjacentes por células tumorais, com a permeação de pequenos vasos linfáticos e sanguíneos;
- 2) liberação de células neoplásicas na circulação, isoladamente ou em pequenos êmbolos;
- 3) sobrevivência dessas células na corrente sanguínea;
- 4) retenção dessas células nos leitos capilares de órgãos distantes;

5) extravasamento dos vasos linfáticos ou sanguíneos, seguido pelo crescimento das células tumorais disseminadas.

Conforme descrito por Silva (2018), a oncogênese é um processo dividido em três estágios, representados na **Figura 3**:

- Estágio de iniciação, no qual os genes são afetados por agentes carcinogênicos;
- Estágio de promoção, no qual agentes oncopromotores atuam sobre a célula previamente alterada;
- Estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula.

A metástase depende de múltiplas mutações genéticas e da adaptação metabólica das células tumorais, que modulam seu metabolismo energético para sobreviver em ambientes desfavoráveis (Alonso-Curbelo, D., Ho, YJ., Burdziak, C. et al, 2021). É uma etapa crucial na progressão do câncer, indicando um estágio mais avançado da doença e um prognóstico desfavorável. Diversos processos celulares, como a degradação da matriz extracelular (MEC), a transição epitelial-mesenquimal (EMT), a angiogênese tumoral, o desenvolvimento de um microambiente tumoral inflamatório e a disfunção da maquinaria de morte celular programada, são reconhecidos como fundamentais para a ocorrência da metástase (Talmagde et al, 2010).

Além desses fatores, vale ressaltar que as atualizações sobre conceitos do câncer estão constantemente acontecendo, possibilitando novas evidências e hipóteses da complexidade desses processos. De acordo com Hanahan (2022), são introduzidas quatro novas dimensões como: desbloqueio da plasticidade fenotípica, que refere-se à capacidade das células cancerosas de alterar seu estado de diferenciação, permitindo adaptação a diferentes ambientes e contribuindo para a progressão tumoral; reprogramação epigenética não mutacional, que envolve alterações na expressão gênica sem mudanças na sequência do DNA, facilitando a aquisição de características malignas; microbiomas polimórficos, que destaca a influência de comunidades microbianas diversas no microambiente tumoral, afetando a progressão e resposta ao tratamento. E Células senescentes: células que cessaram a divisão celular mas permanecem metabolicamente ativas, podendo promover inflamação e influenciar o microambiente tumoral (Hanahan, Douglas, 2022).

2.3.2 Ciclo celular no câncer

A principal característica associada ao desenvolvimento do câncer está relacionada à proliferação contínua e desregulada das células tumorais, resultado de alterações acumulativas nos sistemas de regulação celular e nas vias de sinalização intracelular (Hanahan, Douglas, 2022). Em vez de obedecer aos sinais que regulam o comportamento normal das células, as células cancerígenas se multiplicam e se dividem de maneira desordenada. Esse processo descontrolado propicia a invasão de tecidos e órgãos saudáveis, culminando, muitas vezes, na disseminação das células malignas por diferentes regiões do organismo (Feitelson MA, et al, 2015). O ciclo celular é descrito como uma sequência organizada de eventos em que a célula cresce, duplica seu material genético e, posteriormente, divide-se em duas células-filhas durante a mitose. Alterações na progressão desse ciclo representam um dos principais mecanismos que sustentam a formação de tumores, fazendo dos reguladores do ciclo celular alvos estratégicos para terapias anticâncer (Matthews HK , Bertoli C , de Bruin RAM, 2022).

O ponto de verificação G1, também conhecido como ponto de restrição, atua para impedir que células que apresentem danos no DNA prossigam para a fase S, mesmo após terem completado a fase G1. Quando não há lesões no DNA, a proteína p53 é mantida sob controle por um de seus próprios alvos de transcrição, a oncoproteína murina *double minute 2* (MDM2). A MDM2 interage com a p53, inibindo a atividade transcricional mediada por esta proteína, promovendo seu transporte para fora do núcleo celular e favorecendo sua degradação via ubiquitinação, uma vez que a MDM2 também atua como uma ligase de ubiquitina do tipo E3 (Poon RYC, 2021).

O centróssomo exerce funções essenciais na transição G1/S, além de participar ativamente da divisão celular, da migração, da polaridade celular, da formação e orientação do fuso mitótico (Darling S, et al, 2017). A progressão desregulada do ciclo celular, característica marcante no câncer, está relacionada ao ciclo de duplicação do centróssomo (Gonczy P, 2015). Durante a fase S, o centróssomo é duplicado, passando por um único processo de separação a cada ciclo celular, seguido pela nucleação do fuso mitótico baseado em microtúbulos. A ativação do complexo E/cdk2 é responsável por controlar a duplicação do centróssomo (Darling S, et al, 2017). Esse ciclo compreende tanto a duplicação quanto o deslocamento dos centróssomos (Nam H-J, Naylor R, van Deursen JM, 2015). A duplicação ocorre no final da fase G1 e início da fase G2, enquanto a movimentação e dinâmica dos centróssomos são observadas no final da fase

G2 e no início da mitose (fase M). A separação inadequada dos centrôssomos, cujo momento é fundamental, tem sido apontada como uma possível causa de erros na segregação cromossômica — um fenômeno frequentemente associado a diversos tipos de câncer humano (Jamasbi, E, et al, 2022).

O ponto de verificação G2 tem como função impedir que células com danos no DNA, persistentes das fases G1 e S, avancem para a mitose. Quando são detectadas lesões no DNA, o ponto de verificação G2 é ativado, envolvendo a ativação das quinases ATM e ATR, que, subsequentemente ativam as proteínas CHK1 e CHK2. Essas proteínas, por sua vez, promovem a ativação da WEE1 e a fosforilação da CDC25C, levando à sua inativação (Liu K, Zheng M, Lu R, et al, 2020). A fosforilação de CDC25C por CHK1/CHK2 bloqueia sua função fosfatase, o que resulta na inibição do complexo ciclina B-CDK1, responsável pela entrada na mitose, provocando assim a interrupção do ciclo celular na fase G2 (Lockhead S, Moskaleva A, Kamenz J, et al, 2020).

Lesões no DNA levam à ativação das proteínas ATM e CHK2, que impactam a estabilidade das interações entre cinetócoros e microtúbulos através da modulação das proteínas Aurora A e PLK1 (quinases semelhantes a polo). Esse processo favorece o surgimento de cromossomos retardados na anáfase e contribui para erros na segregação cromossômica durante a mitose (Bakhoun SF, 2014). De forma geral, os erros mitóticos têm origem nos cromossomos que permanecem atrasados na anáfase, sendo considerada uma causa principal da instabilidade cromossômica. Além disso, defeitos mitóticos, como falhas no ponto de verificação de montagem do fuso e irregularidades na estrutura do fuso mitótico, também desempenham um papel importante na indução de erros de segregação cromossômica em células tumorais (Jamasbi, E, et al, 2022).

A desregulação do ciclo celular permite que as células tumorais se proliferem de maneira descontrolada. Intervenções terapêuticas direcionadas a interromper o ciclo celular mostram-se promissoras no controle do crescimento e da progressão tumoral. A telomerase, uma enzima responsável por manter o comprimento dos telômeros, está frequentemente hiperativa nas células cancerígenas, conferindo-lhes capacidade de imortalidade. O bloqueio da telomerase representa uma oportunidade estratégica para limitar o potencial de replicação das células tumorais e inibir seu crescimento. A angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos, desempenha um papel crucial no crescimento dos tumores e na metástase (Yousefi, Tooba et al, 2024).

Estratégias que buscam inibir a angiogênese visam privar os tumores de seu suprimento sanguíneo essencial, limitando, assim, sua progressão. A metástase, que envolve a disseminação das células cancerígenas do tumor primário para locais distantes, representa um grande desafio no tratamento do câncer (Jamasi, E, et al, 2022). O foco das pesquisas está na compreensão dos mecanismos que regulam a metástase e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas capazes de bloquear esse processo devastador.

2.3.3 Mecanismos de morte celular

O câncer é caracterizado pela proliferação celular descontrolada, e o tratamento visa interromper esse crescimento excessivo e eliminar as células "imortalizadas". A morte celular programada (MCP) oferece uma estratégia eficaz para manipular o destino celular, sendo promissora para o avanço da pesquisa oncológica. A apoptose, como um mecanismo regulador do ciclo celular, permite a remoção de células anormais ou danificadas e tem sido crucial na prevenção de tumores. Células tumorais, no entanto, frequentemente evitam a apoptose, com essa evasão desempenhando um papel central na tumorigênese. Isso ocorre principalmente por três mecanismos: desequilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, inibição das caspases e falhas nas vias de sinalização do receptor de morte (Qian, Shen'er et al, 2024; Wong RS, 2011).

A descoberta de múltiplos tipos de morte celular programada tem impulsionado avanços significativos na compreensão dos seus mecanismos intrincados (Qian S, et al, 2020). Esse fenômeno foi observado pela primeira vez em 1842, durante os estudos de Karl Vogt sobre o desenvolvimento de girinos. Entretanto, o interesse científico nesse processo aumentou significativamente apenas a partir de 1972, quando John Kerr, Andrew Wyllie e Alastair Currie introduziram o termo "apoptose" para descrevê-lo (Kerr, 1972). Desde então, inúmeras pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de elucidar novos mecanismos envolvidos na morte celular, ampliando a compreensão desse fenômeno biológico essencial. Na **Figura 4**, pode-se observar o caminho histórico dessas descobertas.

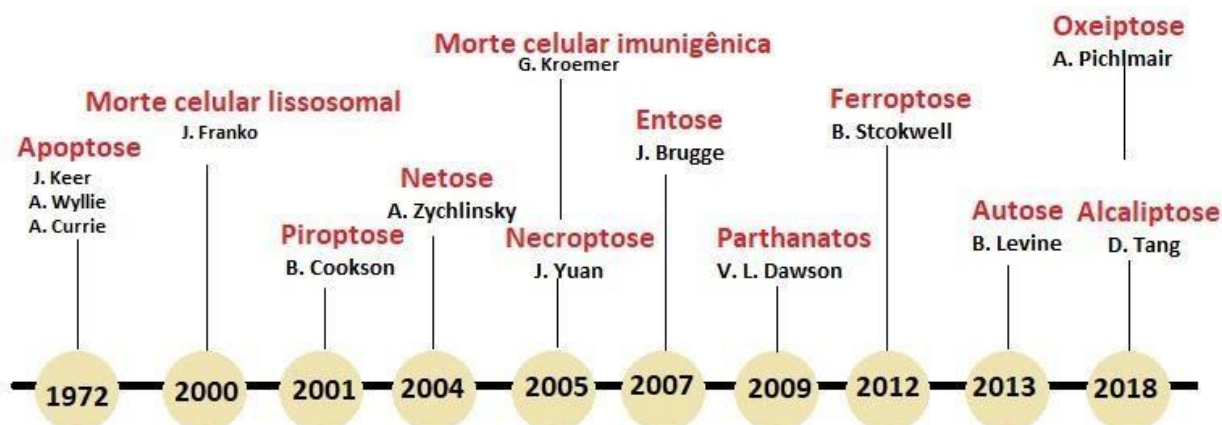


Figura 4 – Linha do tempo de descobertas de mortes celulares. (Modificado de TANG, 2019).

Segundo García (2012), o mecanismo apoptótico é essencial para o desenvolvimento natural celular, o equilíbrio homeostático entre a proliferação celular e a taxa de morte celular é um fator fundamental para a manutenção dos processos fisiológicos normais. A apoptose é uma forma organizada de morte celular programada, essencial para o desenvolvimento, a senescência e a homeostase tecidual. Também atua como mecanismo de defesa em respostas imunes e diante de danos celulares patológicos ou terapêuticos. Caracteriza-se pelo encolhimento celular, citoplasma denso, organelas compactadas e formação de bolhas na membrana plasmática (“*blebbing*”). Outro marcador é a exposição da fosfatidilserina, normalmente localizada no interior da membrana, que ao ser exposta, sinaliza fagócitos para a remoção de células apoptóticas e neutrófilos senescentes, além de participar na ativação de fatores de coagulação. Estudos recentes demonstraram que esse processo de exposição é regulado pelas proteínas flipase e scramblase (Nagata, Sakuragi e Segawa, 2020).

A ativação da apoptose pode ocorrer por meio de duas vias moleculares distintas, a via extrínseca ou do receptor da morte ou através da via intrínseca ou mitocondrial, ambas as vias levam à ativação de uma família de proteases de cisteína denominadas caspases (Qian S, et al, 2020), conforme ilustrado na **Figura 5**.

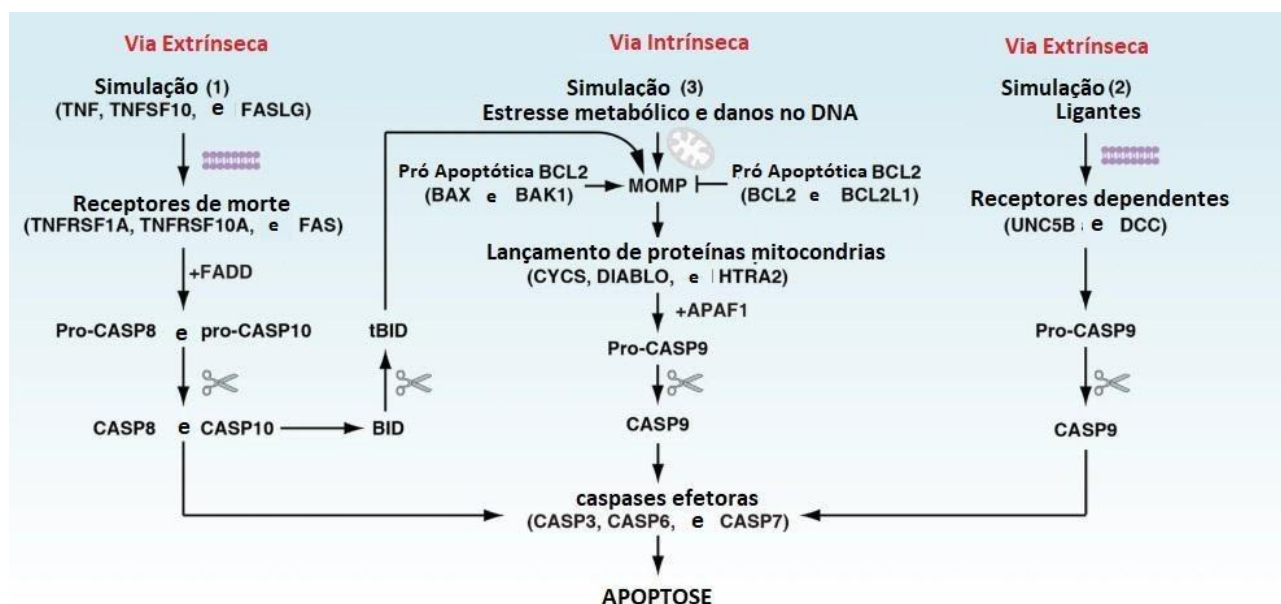


Figura 5 – Representação esquemática das vias da apoptose. (Modificado de TANG, 2019).

A via intrínseca de apoptose, também conhecida como via mitocondrial, é desencadeada por alterações nos sinais intracelulares em resposta a diversos estressores, como danos ao DNA, estresse oxidativo intenso e privação de fatores de crescimento. Esses estímulos desestabilizam o equilíbrio entre proteínas pró-sobrevivência e pró-apoptóticas da família BCL-2 (linfoma de células B 2). A proteína BCL-2, homóloga ao gene *CED-9* de *C. elegans*, foi identificada em 1985, e desde então numerosos homólogos têm sido reconhecidos como reguladores essenciais da apoptose intrínseca. As proteínas pró-apoptóticas BAX (proteína X associada a BCL-2) e BAK (antagonista/assassino de BCL-2) desempenham suas funções através de interações de ligação, sendo sua atividade inibida por membros antiapoptóticos da família BCL-2. Quando ativados, BAX e BAK promovem a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), um processo facilitado por proteínas sensíveis de BH3, como BID (agonista de morte mediado pelo domínio BH3) e BAD (promotor de morte associado a BCL-XL/BCL-2). Essas proteínas utilizam seus domínios BH3 para neutralizar membros antiapoptóticos, como BCL-2 e BCL-XL, além de, em alguns casos, ativarem diretamente BAX e BAK, promovendo assim a progressão da morte celular programada (Johnson, KA, 2024; Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL, 2023; Li J, Chen CH, O'Neill KL, 2023).

O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial resulta em um influxo significativo de Ca^{2+} e na liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c e o

ativador de caspases derivado da mitocôndria (SMAC). A interação do citocromo c com o fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1) induz uma mudança conformacional que promove a formação do apoptossomo e o subsequente recrutamento e ativação da procaspase-9. As caspases envolvidas na apoptose são classificadas em iniciadoras e efetoras (Sever AIM, Alderson TR, Rennella E, et al, 2023; Bock FJ, Tait *SWG*, 2020). A ativação da caspase-9 desencadeia a clivagem e ativação das caspases efetoras, como a caspase-3 e a caspase-7, que conduzem uma cascata proteolítica responsável pela desestruturação controlada das células (Shahar N, Larisch S, 2020). Por exemplo, caspase-3 e caspase-7 clivam o inibidor da desoxirribonuclease ativada por caspase, liberando essa endonuclease para fragmentar o DNA, intensificando a eficiência do processo apoptótico (Jost PJ, Vucic D, 2020). O SMAC, também conhecido como proteína de ligação ao inibidor de proteínas de apoptose (IAP), potencializa ainda mais a apoptose ao promover a degradação de IAPs, uma família de proteínas que suprime a apoptose. Dentre elas, destaca-se a proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossomo X (XIAP), que atua inibindo diretamente a atividade da caspase-3 e da caspase-7 (Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al, 2006).

Por outro lado, a via extrínseca (ou via de receptores de morte) é desencadeada em resposta a fatores externos, ou seja, pela via dos ligantes de morte, tais como: Fas L, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), linfotoxina- α (LT- α) e os ligantes indutores de apoptose relacionados com TNF (TRAIL) que reconhecem e se ligam aos seus receptores específicos na membrana. Estes receptores de morte pertencem à superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNFr). A apoptose inicia quando ocorre a interação entre ligantes e receptores de morte e o recrutamento de moléculas adaptadoras (FADD) e da pró-caspase 8 formando um complexo indutor de sinal de morte (DISC). Após a formação do DISC, ocorre a autoclivagem da pró-caspase 8, que assume sua conformação ativa prosseguindo e amplificando a cascata apoptótica que por sua vez, ativa as caspases executoras 3, 6 e 7, que são comuns em ambas as vias (TANG *et al.*, 2019).

A sinalização mediada pelo receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) ultrapassa a indução da morte celular, desempenhando também papéis essenciais na regulação da inflamação e da sobrevivência celular em diversos contextos fisiológicos e patológicos (Huyghe J, Priem D, Bertrand MJM, 2024). Após sua ativação, o TNFR recruta a proteína quinase associada ao receptor (RIPK1) e os inibidores celulares de

proteínas de apoptose (cIAPs) através da interação do adaptador TRADD com o fator associado ao receptor de TNF 2, formando o denominado Complexo I (Darding M, Meier P, 2012). Os cIAPs promovem a ubiquitinação de RIPK1 via ligações em lisina 63 (K63), o que favorece o recrutamento dos complexos canônicos da quinase IκB e subsequente ativação da via NF-κB, essencial para a sobrevivência e resposta inflamatória. No entanto, a inibição funcional de componentes do Complexo I, como os próprios cIAPs, TAK1 (quinase ativada pelo fator de crescimento transformador β) ou TBK1 (quinase de ligação ao tanque), provoca a formação do Complexo II, ou ripoptossomo, composto por RIPK1, FADD, caspase-8 e cFLIP. Neste complexo, o balanço entre cFLIP e caspase-8 é determinante: cFLIP age como um inibidor, limitando a ativação da caspase-8 mediada por TRADD e FADD. Dessa forma, o ripoptossomo apresenta atividade pró-apoptótica apenas sob condições de baixos níveis de cFLIP (Rodriguez DA, Tummers B, Shaw JJP, et al, 2024). Quando a atividade da caspase-8 é suprimida, o destino celular se desvia para a necroptose devido à ausência da clivagem de RIPK1, conforme discutido na seção sobre necroptose (Mandal R, 2020). Adicionalmente, a ativação da caspase-8 promove a clivagem da proteína BID, originando a forma truncada tBID, que induz a liberação de SMAC pela permeabilização da membrana mitocondrial (MOMP). A liberação de SMAC neutraliza a ação inibitória de XIAP sobre as caspases, estabelecendo assim um elo funcional entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Wang Y, Tjandra N, 2013).

Existem ainda outros mecanismos de morte, incluindo a necrose programada e morte autofágica, ressalta-se a importância da compreensão da patogenicidade e terapêutica do câncer (MISHRA *et al*, 2018). A morte celular dependente de autofagia ou morte celular do tipo II um processo biológico natural, regulado e destrutivo que desmonta os componentes necessários ou disfuncionais de uma célula (TANG, 2019).

A autofagia é um processo catabólico altamente conservado, no qual os lisossomos degradam e reciclam biomacromoléculas e organelas danificadas, envelhecidas ou em excesso, liberando pequenos metabólitos para reutilização celular (Yao R, Shen J, 2023). Esse mecanismo é crucial para a manutenção da homeostase celular em condições fisiológicas normais e atua como um sistema de defesa em resposta a estressores como privação de nutrientes, hipóxia e estresse no retículo endoplasmático (RE). A autofagia é classificada em três tipos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA). Na microautofagia,

organelas ou vesículas citoplasmáticas se fundem diretamente com os lisossomos, oferecendo uma especificidade maior em comparação com a macroautofagia (Wang L, Klionsky DJ, Shen HM, 2023). A CMA, por sua vez, envolve chaperonas citoplasmáticas para reconhecimento de carga e facilita a fusão lisossomal por meio de proteínas substrato e LAMP-2^a (Yang Z, Klionsky DJ, 2010). Atualmente, a pesquisa concentra-se principalmente na macroautofagia, caracterizada pelo encapsulamento da carga-alvo em vesículas de membrana dupla antes da fusão com os lisossomos. Neste contexto, o termo "autofagia" refere-se especificamente à macroautofagia (Liu S, et al, 2023; Kaushik S, Cuervo AM, 2018; Yang Z, Klionsky DJ, 2010).

Como explicitado na **Figura 4**, anteriormente, há uma série de outros tipos de morte celulares investigadas a fim de compreender melhor esses processos. A ferroptose, descoberta de morte celular proposta por Dixon, é definida pelo desequilíbrio de peróxidos lipídicos mediados pelo ferro dentro das células (Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al, 2012). Diferente da apoptose, piroptose e autofagia, a ferroptose exibe características morfológicas e genéticas únicas. Os íons de ferro desempenham funções essenciais em diversas reações fisiológicas, tornando as rotas metabólicas do ferro amplamente estudadas (Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G, 2021). O ferro na forma Fe^{3+} é internalizado pela célula através do receptor de transferrina presente na membrana plasmática, sendo posteriormente reduzido a Fe^{2+} pela enzima STEAP3. O Fe^{2+} tende a formar complexos de ligação com ferro, mas o seu excesso leva à formação de pools instáveis dentro da célula, favorecendo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) via reação de Fenton (Chen X, Yu C, Kang R, Tang D, 2020). Embora a ferroptose tenha papel relevante, a cuproptose surgiu como um novo foco de investigação. A descoberta da ferroptose impulsionou o interesse nas formas de morte celular programada dependente de metais (Li J, Cao F, Yin HL, et al, 2020). O acúmulo excessivo de íons de cobre compromete a função metabólica mitocondrial, favorecendo a oligomerização anômala de proteínas aciladas por ácidos graxos no ciclo do ácido tricarboxílico e diminuindo os níveis de proteínas dos clusters Fe-S, caracterizando um novo tipo de morte celular programada denominado cuproptose (Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al, 2022).

Embora compartilhe semelhanças genéticas com a necrose, a necroptose possui vias moleculares bastante distintas. Inicialmente descrita como a inibição da necrose independente de caspase através do uso da necrostatina-1 (Nec-1), a necroptose é

caracterizada pela ativação de mecanismos de sinalização específicos (Kolbrink B, von Samson-Himmelstjerna FA, Murphy JM, Krautwald S, 2023). Tanto a necroptose quanto a apoptose extrínseca utilizam um complexo receptor extracelular comum; entretanto, células normais tendem a seguir a via apoptótica, por ser menos propensa a gerar inflamação. Quando fatores externos — como mutações genéticas, interações moleculares ou tratamentos farmacológicos — falham em ativar a apoptose extrínseca, os sinais pró-morte que normalmente conduziriam à apoptose podem, alternativamente, induzir a necroptose, resultando em uma morte celular altamente inflamatória (Pasparakis M, Vandenabeele P, 2015).

A piroptose, assim como a necroptose, envolve a formação de poros específicos na membrana celular, resultando em uma morte celular regulada (Elias EE, Lyons B, Muruve DA, 2023). A ativação do inflamossomo e das caspases é fundamental para a ocorrência da piroptose, um processo intrinsecamente inflamatório (Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al, 2016). Pesquisas demonstraram que as caspases-1, -4 e -5 em humanos, além das caspases-1 e -11 em camundongos, são capazes de induzir a piroptose por meio da clivagem da proteína Gasdermina D (GSDMD). Após a clivagem, os fragmentos da GSDMD se oligomerizam com suas porções N-terminais, promovendo a formação de poros na membrana plasmática. Dessa forma, os poros formados pela GSDMD constituem o principal mecanismo de execução da piroptose (Shi J, Zhao Y, Wang K, et al, 2015). Além disso, as caspases ativadas clivam precursores de citocinas inflamatórias, como o pro-IL-1 β e o pro-IL-18, permitindo que as formas maduras dessas citocinas sejam liberadas para o meio extracelular através dos poros de GSDMD, impulsionadas pelo fluxo de íons e fluido intracelular. O inflamossomo atua como uma plataforma essencial para a ativação da caspase-1, cuja formação é desencadeada pela detecção de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs) (Miao R, Jiang C, Chang WY, et al, 2023).

Os estudos de morte celular programada se tornam fundamentais para a compreensão dos processos tumorigênicos no câncer, pois seu desequilíbrio permite a sobrevivência de células anormais que deveriam ser eliminadas. Mecanismos como a apoptose, quando inibidos, favorecem a proliferação descontrolada e a resistência das células tumorais a tratamentos. Além disso, novas formas de morte celular, como ferroptose e necroptose, têm revelado caminhos alternativos que os tumores exploram

para escapar da destruição, ampliando as possibilidades de intervenção terapêutica e aprofundando o entendimento da biologia tumoral.

2.4 Terapias para o câncer

Nas últimas décadas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2019), o tratamento do câncer passou por avanços expressivos, proporcionando uma ampla gama de alternativas terapêuticas. A estratégia mais eficaz no enfrentamento da doença tem sido a abordagem multidisciplinar, que integra diferentes métodos de tratamento. Atualmente, o arsenal terapêutico contra o câncer inclui cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, terapias-alvo, imunoterapia, terapia gênica e transplante de medula óssea. As possibilidades de combinação entre esses tratamentos são tão numerosas que se torna inviável para um único médico dominar todas as melhores opções para cada tipo de câncer. Para ilustrar, apenas considerando as combinações entre cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapias-alvo no tratamento do câncer de mama, estima-se mais de 400 esquemas terapêuticos distintos (Instituto vencer o câncer, 2024).

Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. De acordo com Inca (2019), A cirurgia oncológica é um tipo de tratamento do câncer que consiste na retirada do tumor através de excisões no corpo do paciente. Quando indicada, sua principal finalidade é a retirada completa da lesão tumoral. O câncer, em sua fase inicial, pode ser controlado – e até mesmo curado - por meio da intervenção cirúrgica, atualmente considerada um dos tripés para o tratamento da doença, ao lado da quimioterapia e da radioterapia.

A radioterapia é um tratamento contra o câncer que utiliza altas doses de radiação para matar células cancerígenas ou reduzir o tamanho do tumor. Segundo Inca (2020), esse tratamento pode ser dividido em dois tipos:

- **Radioterapia externa ou teleterapia:** O tratamento com radioterapia consiste na irradiação de áreas do corpo que são previamente demarcadas. Essa abordagem pode ser curativa, pré-operatória, pós-operatória, pós-quimioterapia ou paliativa que consiste em antiálgica e anti-hemorrágica.
- **Braquiterapia:** aplicadores são colocados pelo médico, em contato ao local a ser tratado, e a radiação é emitida do aparelho para os

aplicadores. Esse tratamento é feito no ambulatório (podendo necessitar de anestesia), de uma a duas vezes por semana.

A quimioterapia constitui uma modalidade terapêutica baseada no uso de fármacos capazes de destruir células cancerígenas. Esses medicamentos, ao serem administrados, se misturam ao sangue e são distribuídos por todo o organismo, promovendo a eliminação das células tumorais e prevenindo sua disseminação (INCA, 2019). Contudo, a maioria dos agentes quimioterápicos apresenta ação inespecífica, afetando não apenas as células malignas, mas também células normais de alta taxa proliferativa, como as da mucosa gastrointestinal, vasos capilares e do sistema imunológico, o que resulta em diversos efeitos adversos (Maxwell, 2020).

Em paralelo, a imunoterapia tem se consolidado como uma abordagem terapêutica inovadora no tratamento do câncer, explorando as capacidades do sistema imunológico para reconhecer e eliminar células tumorais. Avanços notáveis foram alcançados com o desenvolvimento de inibidores de checkpoint imunológico, como os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 e anti-CTLA-4, os quais têm demonstrado eficácia em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma, carcinoma pulmonar e câncer de bexiga. Além disso, a combinação da imunoterapia com outras modalidades terapêuticas, como a quimioterapia e terapias direcionadas, tem sido explorada com o objetivo de potencializar os resultados clínicos, promovendo respostas mais eficazes e duradouras no tratamento oncológico (Lustosa, A. et al, 2024).

No campo da oncologia, as células CAR-T têm sido avaliadas como uma alternativa terapêutica altamente promissora. "CAR" se refere ao receptor quimérico de antígeno (do inglês, *chimeric antigen receptor*), enquanto "T" diz respeito aos linfócitos T, células do sistema imunológicos adaptativos responsáveis por funções citotóxicas e pelo recrutamento de fagócitos. Assim, as células CAR-T são linfócitos T que foram geneticamente modificados e reprogramados para reconhecer antígenos tumorais específicos de um paciente, configurando-se como uma terapia personalizada (Qu et al., 2021). As células CAR-T representam um marco significativo no avanço das terapias antineoplásicas, especialmente no contexto da heterogeneidade tumoral. Cada tipo de câncer apresenta características genéticas únicas, além de subpopulações celulares e plasticidade tumoral induzida pelas células-tronco cancerígenas (CSCs). Assim, ao receber linfócitos T modificados geneticamente para reconhecer antígenos específicos

de seu tumor, o paciente tem sua chance de sucesso terapêutico amplificada de forma significativa (Yang et al., 2020).

Vale ressaltar que muitas áreas inovadoras têm se destacado no tratamento dos diferentes tipos de câncer. Para além das abordagens clássicas, as novas linhas de pesquisas buscam associar tecnologias disponíveis com objetivo de aprimorar cada vez mais a eficácia terapêutica. Entre essas inovações, destacam-se o uso de nanopartículas para entrega direcionada de medicamentos e as terapias fotodinâmicas, que utilizam luz para ativar agentes terapêuticos diretamente nas células tumorais (Hurvitz, SA, Caswell-Jin, JL, McNamara, KL et al). Também ganham relevância as terapias alvo-moleculares, que atuam sobre estruturas específicas das células cancerígenas, reduzindo danos às células saudáveis. Um exemplo promissor é o uso de anticorpos conjugados a drogas, como o Elahere (mirvetuximab soravtansina), aprovado para câncer de ovário (Lustosa, A. et al, 2024).

2.5 Composto de coordenação de cobre

Os compostos de coordenação metálica têm sido empregados na medicina humana ao longo da história para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. Desde a descoberta da cisplatina em 1965, uma ampla gama de complexos de coordenação metálica, envolvendo metais como platina, rutênio, ouro e cobre, foi projetada, sintetizada e testada com o objetivo de desenvolver fármacos clinicamente eficazes e seguros.

O cobre (Cu), um oligoelemento essencial em diversos processos fisiológicos, tem sido amplamente investigado devido ao seu papel na progressão tumoral e aos seus potenciais aplicações terapêuticas. A regulação dos níveis intracelulares de cobre é fundamental para a manutenção da homeostase, uma vez que desequilíbrios podem resultar em toxicidade e levar à morte celular. Nesse contexto, o desenvolvimento de agentes terapêuticos que modulam a homeostase do cobre tem emergido como uma abordagem promissora no tratamento do câncer, destacando-se o uso de quelantes, ionóforos e complexos metálicos à base de cobre. Estudos recentes têm aprofundado a compreensão do potencial desses complexos como estratégias inovadoras na terapia oncológica (Wang, Yingqiao, et al, 2024).

No contexto da quimioterapia, os compostos de coordenação constituem uma classe significativa de agentes antineoplásicos. A estrutura química desses compostos é

caracterizada por uma molécula orgânica externa, denominada ligante ou base de Lewis, que se coordena a um átomo central de metal ou íon metálico. Este íon metálico atua como um ácido de Lewis, ou seja, um aceptor de pares de elétrons. Para que ocorra a formação do complexo de coordenação, é essencial que os ligantes possuam ao menos um par de elétrons livres, capazes de interagir com o íon metálico central. A escolha e a natureza dos ligantes desempenham um papel crucial, pois a coordenação com o metal central pode potencializar significativamente os efeitos terapêuticos do íon metálico, aumentando sua eficácia antitumoral (Basler et al., 2021; Parveen et al., 2019).

Os complexos de cobre (I/II) são conhecidos por sua atividade redox, apresentando características de alta labilidade e uma tendência incomum a adotar geometrias de coordenação distorcidas, o que os torna estruturalmente menos previsíveis quando comparados a outros complexos de metais de transição de primeira linha (Santini, 2014). Diversos compostos de cobre demonstraram propriedades antitumorais promissoras em estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Maciel et al., 2020; Denoyer, 2018; Santini, 2014). De acordo com Muhammad (2019), o mecanismo primário de ação anticâncer dos complexos de Cu (II) está relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares, que ocorre pela redução de Cu (II) para Cu (I). As ROS, que são metabólitos altamente reativos do O₂, são geradas na membrana interna das mitocôndrias e posteriormente liberadas no espaço intermembranar e na matriz mitocondrial (HAN, 2001).

Conforme descrito por Deni (2018), a interação entre o DNA e pequenas moléculas tem se mostrado um mecanismo fundamental no desenvolvimento de agentes quimioterápicos, com o intuito de bloquear a replicação durante o ciclo celular. Nesse contexto, pequenas moléculas, incluindo diversos complexos metálicos e seus respectivos ligantes, foram avaliadas quanto à sua afinidade pelo DNA e, posteriormente, testadas quanto à sua atividade anticâncer em diferentes linhagens celulares. De acordo com Mahendiran (2018), foi observado que os complexos de Cu (I) fosfina apresentam propriedades citotóxicas e antiangiogênicas significativas, além de promoverem uma redução substancial da massa tumoral *in vivo*, sem causar perda expressiva de peso corporal e com efeitos adversos menos intensos do que a cisplatina. Adicionalmente, complexos de Cu têm sido identificados como potenciais inibidores seletivos do proteassoma tumoral e indutores de apoptose, atuando especificamente na via da ubiquitina-proteassoma (UPP) (Zhang, 2016).

Os compostos de cobre têm se destacado como uma abordagem promissora no tratamento do câncer, mostrando avanços significativos em pesquisas recentes. Como um metal essencial para o organismo humano, o cobre desempenha papéis cruciais em várias funções biológicas, e, quando utilizado em doses adequadas, pode causar menos efeitos colaterais em comparação com outros tratamentos convencionais. A capacidade do cobre de interagir com processos celulares essenciais, como a geração de espécies reativas de oxigênio e a modulação de vias metabólicas, tem sido explorada para potencializar sua ação antitumoral, oferecendo uma alternativa terapêutica com menor toxicidade. Esse equilíbrio entre eficácia terapêutica e segurança tem tornado os compostos de cobre uma opção atraente no desenvolvimento de novos fármacos anticâncer.

2.7 A pesquisa dos complexos de coordenação e o laboratório de biologia do reconhecer (LBR)

O grupo de pesquisa sob a orientação do Professor Doutor Milton Masahiko Kanashiro em parcerias com outros docentes que sintetizam os compostos, realiza há alguns anos o estudo com complexos de coordenação em linhagens cancerígenas a fim de realizar avaliações biológicas dos mesmos. Ao decorrer desses anos encontraram-se resultados promissores em seus testes, validando a importância de estudos de novos complexos de coordenação.

Na pesquisa desenvolvida por Borges (2008) em seu trabalho “Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de compostos de coordenação de Ferro”, foram testados três compostos de coordenação de Ferro, todos foram capazes de induzir apoptose em células tumorais de maneira dose dependente.

Na dissertação “Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica dos compostos de coordenação de cobalto e de ferro” de Paula Siqueira (2020), ao comparar a citotoxicidade dos compostos de cobalto e de ferro, foi possível observar que o complexo de ferro apresentou maior efetividade. Dentre os valores de IC₅₀ apresentados, o composto demonstrou os melhores resultados em linhagens humanas de leucemia linfóide aguda (MOLT-4), apresentando a IC₅₀ de $4,8 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$; de câncer de pâncreas (BxPC-3) com IC₅₀ de $10,19 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$. Além disso, os resultados da avaliação do ciclo celular (Sub-G1), potencial de membrana mitocondrial (JC1) e microscopia indicam que o Fe α BMPA induz morte celular por apoptose nas linhagens

celular humana de leucemia linfóide aguda e de adenocarcinoma pancreático (SIQUEIRA, 2020).

De acordo com Maciel (2019), o composto de cobre (II) induziu morte celular por apoptose na linhagem de carcinoma de pulmão NCI-H460 com comprometimento mitocondrial. Além disso, nos estudos *in vivo*, o complexo foi eficaz no tratamento das lesões, reduzindo em 48% o crescimento tumoral em comparação com o grupo controle.

Pesquisas realizada por Silva (2020), os estudos adicionais, quantitativos e qualitativos, com o complexo de cobre sugeriram a indução de morte celular apoptótica, pela ativação das vias intrínseca e extrínseca, em células BxPC-3. Além disso, quando realizada a avaliação da toxicidade aguda do complexo de cobre *in vivo* mostrou um excelente perfil de segurança em camundongos Balb/c nude. Além disso, complexos metálicos de cobre demonstraram menor citotoxicidade para células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em comparação à maioria das células neoplásicas analisadas, apresentando índices de seletividade relevantes, especialmente para as linhagens THP-1 (leucemia monocítica aguda) e PC-3 (adenocarcinoma de próstata), além disso, o composto induziu a fragmentação do DNA em ambas às linhagens celulares, sugerindo a apoptose como mecanismo de morte celular, o que foi confirmado em células PC-3 pela marcação positiva com anexina V. Promoveu a perda do potencial de membrana mitocondrial nas células PC-3, indicando ativação da via intrínseca da apoptose (Baptista, 2023).

O histórico de pesquisas desenvolvidas demonstrou perspectivas promissoras e sólidas no desenvolvimento de estudos com os compostos de coordenação, fazendo com que mais pesquisas possam vir a serem realizadas para que tais resultados desenvolvidos possam ser aprofundados, além disso, trazendo novas possibilidades na área em questão.

3 Justificativa

Os resultados obtidos até o momento têm impulsionado o aprofundamento das pesquisas e a busca por novos compostos de coordenação de cobre. Nosso grupo de pesquisa tem acumulado uma série de estudos envolvendo compostos com núcleos de coordenação formados por diferentes metais, cujos resultados têm se mostrado bastante promissores. Algumas dessas moléculas já levaram ao pedido de registro de patentes, e outras ainda estão em estudo, com potencial para o desenvolvimento de novas patentes,

incluindo o composto de cobre (H04) em avaliação neste trabalho, o qual ainda está em análises biológicas iniciais pós sintetização. Diante dos resultados positivos e das limitações que a quimioterapia convencional ainda apresenta no tratamento do câncer, somos motivados a investigar novas alternativas terapêuticas. A realização de pesquisas focadas na avaliação da atividade antineoplásica de novos compostos de coordenação de cobre é fundamental. Por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, podemos determinar a eficácia farmacológica desses compostos, bem como explorar a viabilidade de seu desenvolvimento como um novo agente quimioterápico.

4 Objetivos

4.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antineoplásica, *in vitro*, do complexo de cobre (**H04**), do complexo de platina (**H18**) e do ligante (**H03**) contra linhagens de células cancerígenas.

4.2. Objetivos específicos

1. Analisar a citotoxicidade e a viabilidade celular frente aos compostos de coordenação (**H04**), (**H03**) e (**H18**), por meio do ensaio colorimétrico de MTT.
2. Investigar o índice de seletividade apresentado pelos compostos.
3. Identificar o composto mais eficaz e as linhagens celulares mais suscetíveis para aprofundar a análise do seu mecanismo de ação.
4. Examinar a ocorrência de morte celular programada por meio de alterações no ciclo celular e da quantificação de DNA por citometria de fluxo.
5. Determinar o tipo de morte celular utilizando marcação com Anexina V e iodeto de propídio via citometria de fluxo.
6. Investigar a perda do potencial de membrana mitocondrial por meio do marcador fluorescente JC-1 nas células tratadas.
7. Confirmar a atuação das espécies reativas de oxigênio (ROS) no mecanismo de morte celular utilizando o inibidor N-Acetil-L-Cisteína (NAC) através do ensaio colorimétrico de MTT.
8. Avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no processo de morte celular utilizando a sonda DCFH-DA por citometria de fluxo.

5 Materiais e métodos

5.1 Cultivo Celular

As linhagens celulares utilizadas na pesquisa foram MOLT-4 (leucemia linfóide aguda), U937 (linfoma histiocítico humano), THP-1 (leucemia monocítica aguda humano), PC-3 (carcinoma de próstata humano), MDA-MB- 231 (adenocarcinoma de mama), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama humano), NCI- H460 (Carcinoma de pulmão humano), BXP-3 (Adenocarcinoma pancreático humano), BEAS-2B (epitélio brônquico normal, Vírus epitelial transformado) procedentes do banco de células do RJ (BCRJ) e PBMC (célula mononuclear do sangue periférico) foram obtidos a partir de amostras de sangue periférico cedidas por doadores voluntários saudáveis, mediante consentimento livre e esclarecido, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil). As células foram isoladas por meio de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque™, seguindo protocolo previamente estabelecido. As PBMCs foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Gibco, BRL), suplementado com 10 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Já as células BEAS-2B, foram cultivadas com o meio comercialmente disponível como BEGM BulletKit, que inclui suplemento e meio base. E as outras linhagens foram mantidas em cultivo no meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). As células foram acondicionadas em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP) e incubadas em estufa (*Forma Scientific, Inc.*, Modelo 3159 S/N 33808-427) a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada. Quando atingiam 70% de confluência, as células aderentes eram coletadas por dissociação enzimática (tripsina 0,025% e EDTA a 37°C) e semeadas em placas com contagem variável, conforme a necessidade de cada experimento.

5.2 Diluição e armazenamento dos compostos

O composto de cobre (**H04**), o ligante (**H03**) e o composto de platina (**H18**) foram fornecidos pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Joseane Lessa, do Instituto Federal Fluminense – Campus Itaperuna. Os compostos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 10 mM e armazenados a -20 °C.

5.3 Avaliação do efeito citotóxico dos compostos por meio da metabolização MTT [3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio]

As linhagens celulares, descritas em 5.1., foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular. As células de origem neoplásica foram plaqueadas em placas de 96 poços, utilizando um volume de 100 µL por poço (2×10^5 células/mL). As placas foram incubadas por 2 horas e, em seguida, tratadas com os compostos **H03** (ligante), **H04** (cobre) e **H18** (platina) em concentrações pré-definidas, com um volume de 100 µL em DEMEM-F12, sendo mantidas na estufa a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio].

Para a realização do ensaio com PBMC, foi utilizada uma concentração de 2×10^6 células/mL. Todo procedimento foi realizado em cabine de segurança/fluxo laminar. Dispensou-se Ficoll (à temperatura ambiente) diretamente no fundo do tubo cônico de 50ml, o volume foi igual à metade do volume de sangue disponível para realizar o procedimento: Usou-se pipeta sorológica com pipetador automático, dispensar o sangue vagarosamente, pela parede do tubo, para que ele caia sobre o ficoll sem misturar. Centrifugou o tubo a 500xg, durante 40 minutos, à temperatura ambiente (+/- 20°C). A centrífuga deve estar devidamente equilibrada. O plasma foi removido primeiro, com a pipeta Pasteur com bulbo. Ao se aproximar do anel de PBMC, uma interface branca entre o plasma e o colchão de ficoll – trocou-se a pipeta pasteur para começar a retirar o anel de PBMC, que deve ser transferido para outro tubo cônico de 50ml, contendo 10ml de meio RPMI gelado. Ao finalizar a coleta do anel de PBMC, o volume foi completado para 40ml. Em seguida foram realizadas as etapas de lavagem: Centrifugou-se a 500xg, durante 10 minutos, a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet de células e repetiu a etapa de lavagem por mais duas vezes, usando 20 ml de meio RPMI, em cada lavagem. Em seguida, ressuspendeu-se o pellet em 2ml de meio RPMI. Transferir 10µl dessa suspensão celular para um microtubo contendo 190µl de tripan blue 0,4% (foi feita uma diluição de 1:20), por fim, realizou-se a contagem das células em Câmara de Neubauer e quantificou-se o total de células necessárias para o plaqueamento do MTT.

Para cada 100 µL de cultivo, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL). Após mais quatro horas de incubação, 170 µL do sobrenadante de cada poço foram removidos e 120 µL de uma solução de isopropanol com 0,04% de HCl foram adicionados, com posterior homogeneização até a completa dissolução dos cristais de

sal formados. As leituras das placas de 96 poços foram realizadas em um espectrofotômetro (*Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.*) utilizando um comprimento de onda de 570 nm. As absorbâncias obtidas de cada triplicata permitiram o cálculo dos valores da concentração inibitória 50% (IC₅₀), realizado no programa *GraphPad Prism* 8, que também foi utilizado para a confecção dos gráficos.

5.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)

O efeito do composto de cobre (**H04**) e da cisplatina foi avaliado por meio de citometria de fluxo. Células das linhagens Bxpc-3 (2×10^5 células/mL) foram semeadas em garrafas de cultura de 25 cm³ com um volume de 3 mL. Posteriormente, foi adicionado o tratamento com 2 e 4 vezes a IC₅₀ do **H04** (1,2 µmol/L e 2,4 µmol/L e cisplatina - 32µmol/L), em 3 mL de DEMEM-F12. As células foram incubadas por 48 horas. Após a incubação, o conteúdo de cada garrafa (6 mL) foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm. O pellet resultante foi ressuspenso em PBS, transferido para microtubos de centrifugação e centrifugado novamente por 5 minutos a 10.000 rpm, procedimento repetido duas vezes. Após a lavagem com PBS, 1 mL de etanol a 70% gelado foi lentamente adicionado ao pellet, e as células foram submetidas à fixação por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, e o pellet formado foi lavado com tampão fosfato-citrato (0,2 M, pH 7,8) e centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm em cada lavagem. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL do tampão final, composto por RNase A (100 µg/mL), iodeto de propídio (50 µg/mL) e tampão fosfato-citrato. As células foram então incubadas a 37°C por 30 minutos, protegidas da luz.

A fluorescência do conteúdo de DNA celular foi quantificada por citometria de fluxo (*FACS Calibur™, BD Sciences*), e a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular foi analisada utilizando o software WinMDI versão 2.9. As proporções de células nas fases G0/G1, S e G2/M foram apresentadas como histogramas. As células apoptóticas, caracterizadas pelo conteúdo de DNA hipodiplóide fluorescente, foram quantificadas no pico sub-G1 dos histogramas. Os dados experimentais foram obtidos através do registro de 10.000 eventos por amostra.

5.5 Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V e Iodeto de propídio

A quantificação de células em apoptose foi realizada através do ensaio Anexina V/PI. As células BxPC-3 foram semeadas na concentração de 2×10^5 em garrafas de cultura de 25 cm² no volume de 3 mL de células da linhagem experimental adicionando 3 mL de DEMEM/F-12 com a concentração de 2x e 4x a IC₅₀ do composto de cobre (1,2 e 2,4 µmol/L) e cisplatina na concentração de 1x IC₅₀ (32,0 µmol/L) incubadas por 24 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Após o período de incubação, foram seguidos os passos do kit (*TACS Annexin V-FICT Apoptosis Detection Kit – R&D Systems*). O conteúdo foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugados por 5 min. a 1500 rpm. As células foram lavadas 2x com PBS e a cada lavagem foram centrifugadas por 5 min. a 1500 rpm. Posteriormente foi preparado o reagente de incubação. Cada amostra necessitou de 100 µL da solução, combinando tampão de ligação a 10x (10 µL); iodeto de propídio (PI – 10 µL); Anexina V-FICT (1,0 µL); água destilada (79 µL), totalizando um volume 100 µL que foi mantido no escuro e no gelo. Após essa etapa, foi retirado o sobrenadante, que tinha PBS e possivelmente outros produtos oriundos da “lavagem” e as células foram ressuspensas suavemente no reagente de incubação, no escuro por 15 min. Em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 400 µL do tampão de ligação do kit a 1x (diluição 1:10) em água destilada. Após as etapas, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur™, modelo 342973), com a contagem de 10.000 eventos para cada amostra. Os gráficos Dot-plots quantificam porcentagem de células normais, apoptóticas e necróticas, obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

5.6 Confirmação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através do Inibidor N-Acetil-L-Cisteína (NAC)

As células Bxpc-3 foram plaqueadas em volume de 100µL/poço (2×10^5 cels/mL) em placas de 96 poços, e tratadas e não com NAC (inibidor de ROS) na concentração final de 5mmol/L. As células foram então incubadas por 2 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, nas células pré- tratadas e não pré-tratadas foram adicionados o tratamento com o composto **H04** e cisplatina nas concentrações já estabelecidas e mantidas na estufa por 48 horas, a 37°C e 5% de CO₂. O procedimento seguinte é o mesmo descrito no item 5.3.

5.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para determinar o nível constitutivo de ROS presente nas células BxPc-3 foi realizado a quantificação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas na concentração de 2×10^5 em garrafas de cultura de 25 cm² no volume de 3 mL adicionando 3 mL de DEMEM/F-12, foi adicionado o tratamento com as mesmas concentrações dos ensaios anteriores e incubadas por 24 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Após 24 horas, as células foram transferidas para tubos de centrifugação e foram centrifugados por 5 min. a 1200 rpm. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e submetidas novamente a centrifugação por 5 min. a 1200 rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi parcialmente descartado e as células foram ressuspensas em 50 µL de PBS. Uma solução da sonda DCFH-DA foi preparada em PBS na concentração final de 2,5 µmol/L, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então encaminhadas para leitura, realizada imediatamente após a adição de 500 µL da solução contendo a sonda. A quantificação da fluorescência, indicativa da presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi realizada por citometria de fluxo.

5.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo

A linhagem Bxpc-3 foi tratada e incubada como descrito no item 4.4. Após o período de incubação o conteúdo de cada garrafa (6mL) foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado por 5 min. a 2.200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* adicionados 500µL de solução de JC-1 (Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (25 µg/mL, *Sigma*) diluídos em meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL). As células, depois de ressuspensas, foram incubadas por 15 min. em estufa (37°C, 5 % de CO₂). A seguir, as células em suspensão foram submetidas a centrifugação por 5 min. a 2.200 rpm e lavadas duas vezes com 1mL de meio de cultura DMEM/F-12 (Gibco, BRL) não suplementado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido ressuspenso em 500µL de meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) não suplementado. A leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur™, modelo 342973). Os gráficos Dot-plot da porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

5.9 Análise Estatística

O programa *GraphPadPrism* versão 8.0 foi utilizado para as análises estatísticas.

6. Resultados e discussões

6.1 Análise da citotoxicidade induzida pelos compostos por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio).

Em primeira análise, foram testados os efeitos citotóxicos do composto de coordenação de cobre (**H04**), do composto de platina (**H18**) e do ligante (**H03**), A cisplatina, fármaco convencional utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, também foi utilizado como controle positivo dos experimentos. A atividade citotóxica dos complexos investigados foi avaliada por meio de um microensaio colorimétrico utilizando o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), que permite aferir a função celular em nível mitocondrial (MOSMANN, 1983). O objetivo foi determinar, *in vitro*, as concentrações dos compostos necessárias para induzir a morte de 50% das células neoplásicas (IC₅₀).

O ensaio foi conduzido com as seguintes linhagens celulares de câncer humano: U937, MOLT-4, THP-1, MDA-MB231, MCF-7, NCI-H460, BxPc-3, A549 e PC-3. Além das linhagens tumorais, também foram incluídas na análise duas linhagens celulares humanas com características não neoplásicas: PBMC (células mononucleares do sangue periférico) e Beas-2B (células epiteliais bronquiais humanas imortalizadas). A inclusão dessas linhagens teve como objetivo avaliar a seletividade dos compostos, permitindo comparar seus efeitos citotóxicos em células saudáveis e, assim, inferir seu potencial terapêutico e perfil de toxicidade. Cada linhagem foi testada em três experimentos independentes, realizados em triplicata, com os valores de IC₅₀ expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em todos os experimentos, as células incubadas exclusivamente com o meio de cultura DMEM/F-12 foram utilizadas como controle branco. Para o controle positivo, utilizou-se cisplatina diluída no mesmo meio de cultura e sob as mesmas condições aplicadas aos compostos testados. Todas as linhagens foram submetidas a um período de incubação de 48 horas, com concentrações crescentes dos compostos (**H04** e **H03**), variando de 0,03125 μl a 100 μl , em uma diluição seriada por dois. E nas análises

citotóxica do composto de platina (**H18**) e cisplatina utilizaram-se as concentrações crescentes (3,125 μ l - 200 μ l).

Dessa forma, a **Tabela 1** apresenta os valores de IC_{50} obtidos para cada uma das linhagens celulares testadas frente aos compostos avaliados. Já a **Tabela 2** exibe os índices de seletividade (IS), calculados com base na comparação entre a atividade citotóxica observada nas linhagens tumorais e nas linhagens saudáveis, permitindo avaliar a capacidade dos compostos em discriminar entre células neoplásicas e não neoplásicas.

Tabela 1. Valores de IC_{50} (μ mol. L). Ilustra a concentração inibitória dos compostos de coordenação, ligante e a cisplatina para 50% das células em cada linhagem neoplásica testada. (n=3).

Linhagem	Composto H04	Ligante H03	Composto H18	Cisplatina
PBMC	0,31 $\pm$ 0,02	3,2 $\pm$ 0,6	≥ 100	44,0 $\pm$ 2,0
BEAS- 2B	6,73 $\pm$ 1,55	0,74 $\pm$ 0,01	54,10 $\pm$ 15,02	10,94 $\pm$ 1,76
MOLT-4	0,10 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,05	≥ 100	15,0 $\pm$ 0,8
U937	0,12 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,01	42,24 $\pm$ 2,0	17,0 $\pm$ 0,9
THP-1	0,15 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,01	61,50 $\pm$ 3,30	11,8 $\pm$ 1,1
MDA-MB-321	0,17 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,01	≥ 100	58,3 $\pm$ 1,8
MCF-7	0,19 $\pm$ 0,07	2,17 $\pm$ 0,36	≥ 100	60,0 $\pm$ 0,9
A549	0,21 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,6	≥ 100	≥ 100
NCI- H460	0,67 $\pm$ 1,1	0,41 $\pm$ 1,3	≥ 100	21,5 $\pm$ 1,5
PC-3	0,18 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,1	20,4 $\pm$ 1,1	42,8 $\pm$ 1,1
BXPC-3	1,16 $\pm$ 0,11	10,3 $\pm$ 2,5	≥ 100	15,8 $\pm$ 1,5

Tabela 2. Índice de seletividade (I.S). Indica a citotoxicidade seletiva dos compostos para cada linhagem neoplásica tratadas com os compostos H04 e H03 comparado ao PBMC e a BEAS – 2B. (I.S) = (IC_{50} das células normais/ IC_{50} das células neoplásicas).

PBMC	BEAS-2B	MOLT-4	U937	THP-1	MDA-MB-321	MCF-7	A549	NCI-H460	PC-3	BXPC-3
COMPOSTO H04										
0,31 ± 0,02	6,73 ± 1,55	3,1	2,6	2,1	39,59	35,42	32,05	10,04	37,34	5,8
LIGANTE H03										
3,2 ± 0,6	0,74 ± 0,01	11,4	5,8	26,6	1,69	0,34	1,54	1,8	12,33	0,7

O composto de platina (**H18**) apresentou baixa atividade citotóxica em mais de 50% das linhagens testadas, incluindo as tumorais BXPC-3, NCI-H460, A549, MCF-7, MDA-MB-231, MOLT-4, além da linhagem saudável PBMC, todas com valores de IC₅₀ superiores a 100 µmol.L. Esses resultados indicam uma eficácia limitada, tornando o composto (**H18**) pouco relevante para análises subsequentes. Entretanto, em algumas linhagens específicas, o (**H18**) demonstrou níveis moderados de citotoxicidade, como na linhagem de linfoma histiocítico (U937), com IC₅₀ de 42,24 ± 2,0 µmol. L; na linhagem de leucemia monocítica aguda (THP-1), com IC₅₀ de 61,50 ± 3,30 µmol. L; e no adenocarcinoma de próstata (PC-3), onde apresentou maior atividade com IC₅₀ de 20,4 ± 1,1 µmol. L (**Tabela 1**). Em células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS-2B), o valor observado foi de 54,10 ± 15,02 µmol.L. Apesar desses resultados pontuais, quando comparado ao composto (**H04**) e ao ligante (**H03**), o composto de platina (**H18**) demonstrou desempenho citotóxico inferior, revelando-se menos promissor quanto à seletividade e à eficácia antitumoral. O mesmo comportamento foi observado para a cisplatina, utilizada como controle positivo no ensaio. Embora apresente efeito citotóxico significativo e seja um quimioterápico amplamente estabelecido na prática clínica, sua atividade foi consideravelmente inferior quando comparada à dos complexos de cobre e do ligante isolado nas linhagens celulares testadas. Esses resultados indicam que, apesar da eficácia reconhecida da cisplatina, os compostos de cobre apresentaram um potencial antitumoral mais robusto, sugerindo maior efetividade e possível seletividade frente às células neoplásicas.

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, o complexo de cobre **H04** apresentou desempenho superior, quando comparado com o **H03**, na maioria das linhagens celulares avaliadas, incluindo PBMC, MOLT-4, U937, MDA-MB-231, MCF-

7, A549 e BXP-3, com respectivos valores de IC_{50} : $0,31 \pm 0,02 \mu\text{mol.L}$; $0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol.L}$; $0,12 \pm 0,06 \mu\text{mol.L}$; $0,17 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}$; $0,19 \pm 0,07 \mu\text{mol.L}$; $0,21 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}$ e $1,16 \pm 0,11 \mu\text{mol.L}$. Vale ressaltar, que mesmo em algumas linhagens, como: BEAS- 2B, THP-1, NCI- H460 e PC-3, embora os valores tenham sido ligeiramente maiores, com pouca variação relevante em relação ao ligante **H03**, ainda assim o composto (**H04**) demonstrou efeitos citotóxico promissores. O tratamento com esse composto resultou em viabilidade celular reduzida a 50% mesmo em baixas concentrações, o que se reflete nos valores de IC_{50} considerados altamente promissores.

O ligante **H03** apresentou citotoxicidade superior quando comparado aos compostos clássicos à base de platina (**Tabela 1**), corroborando os resultados observados para os complexos contendo tiossemicarbazonas. O ligante (**H03**) destaca-se por sua elevada seletividade frente a células tumorais, o que contribui significativamente para a redução dos efeitos colaterais em células saudáveis. Além disso, apresentam boa estabilidade em meio fisiológico — uma característica essencial para aplicações terapêuticas bem-sucedidas (Hidalgo, 2023). Outro aspecto relevante é sua capacidade de interagir de maneira eficaz com alvos biológicos, como o DNA e proteínas séricas, mecanismo amplamente associado ao seu potencial anticancerígeno (Almeida, 2022). No entanto, os ensaios de citotoxicidade realizados com o complexo de cobre **H04** revelaram um efeito ainda mais promissor, superando todos os demais compostos analisados, o que reforça o potencial desse metal na formulação de agentes antitumorais inovadores.

Esses resultados indicam uma eficácia citotóxica relevante e sugerem que o **H04** possui elevada potência antitumoral, sendo eficaz em diferentes tipos celulares, tanto hematopoiéticos quanto sólidos. A baixa concentração necessária para atingir o efeito citotóxico em múltiplas linhagens evidencia não apenas a potência do composto, mas também sua seletividade, especialmente ao se considerar que a atividade foi observada de forma consistente em modelos celulares representativos de diferentes tipos de câncer. Esse resultado aponta para a relevância do íon metálico na atividade biológica do complexo e evidencia o papel central da metalofarmacologia no desenho de novos candidatos terapêutico.

A partir dessa análise, foi calculado o índice de seletividade (IS), utilizando como referência duas linhagens celulares não tumorais: as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), amplamente empregadas por representarem adequadamente

células saudáveis, e as células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS-2B), conforme apresentado na **Tabela 2**. A análise do índice de seletividade (IS) foi realizada considerando as características específicas de cada linhagem celular avaliada. As linhagens de origem leucêmica foram comparadas aos PBMCs como controle de células normais, enquanto as linhagens com características aderentes foram comparadas à linhagem epitelial não tumoral BEAS-2B. O índice de seletividade foi calculado dividindo-se o valor de IC₅₀ obtido para a célula normal pelo valor de IC₅₀ correspondente à célula tumoral. Em outras palavras:

$$\text{IS} = \text{IC}_{50} \text{ da célula normal} \div \text{IC}_{50} \text{ da célula tumoral}$$

Valores de IS superiores a 1 indicam que o composto apresenta maior toxicidade seletiva para as células tumorais em relação às células normais. Dessa forma, um índice de seletividade mais elevado sugere maior potencial terapêutico, com menor efeito citotóxico sobre tecidos saudáveis. No contexto da linhagem tumoral BxPC-3, o composto de cobre **H04** apresentou um índice de seletividade de **0,7** quando comparado às células BEAS-2B, o que sugere um possível perfil tóxico para células epiteliais pulmonares. Esse resultado alerta para a necessidade de atenção quanto à via de administração, posologia e monitoramento de potenciais efeitos adversos em tecidos pulmonares.

Por outro lado, o mesmo composto demonstrou um índice de seletividade de **5,8** em relação às células PBMC, indicando uma seletividade marcante para células tumorais pancreáticas, o que reforça seu potencial como agente quimioterápico promissor para o tratamento do câncer de pâncreas. A discrepância observada entre os valores de IS nas diferentes linhagens normais evidencia a importância de se considerar múltiplos modelos celulares não tumorais durante a fase pré-clínica, a fim de melhor caracterizar o perfil de segurança e eficácia de compostos candidatos.

Embora o composto de cobre tenha apresentado resultados citotóxicos relevantes, bem como índices de seletividade promissores em diversas linhagens celulares analisadas, optou-se por direcionar as análises posteriores mais aprofundadas para a linhagem BxPC-3, representativa do adenocarcinoma pancreático. Essa escolha justifica-se pelo fato de o câncer de pâncreas estar entre os tumores mais letais, sendo comumente diagnosticado em estágios avançados e apresentando uma taxa de sobrevida de cinco anos inferior a 9% (Barman et al., 2021).

No contexto brasileiro, dados recentes do período entre abril de 2023 e abril de 2024 apontam para 19.291 internações e 3.834 óbitos relacionados ao adenocarcinoma pancreático (Costa et al., 2024), o que reforça a urgência por alternativas terapêuticas mais eficazes. Diante desse cenário alarmante, torna-se evidente a relevância de investigações mais aprofundadas sobre compostos promissores, como o complexo de cobre **H04**, com vistas ao desenvolvimento de novos agentes farmacológicos voltados ao tratamento dessa neoplasia altamente agressiva e de elevada letalidade.

6.2 Avaliação de alterações e fragmentação do DNA no ciclo celular (SUB-G1)

Posteriormente, foi analisado as possíveis vias de ação do composto **H04** na linhagem tumoral Bxpc-3. Em primeiro momento avaliou-se o ciclo celular, afim de observado o comportamento da fragmentação do DNA ou não diante do tratamento, assim no Ensaio de Subg-1(**Figura 6**), por meio dos histogramas gerados pela citometria de fluxo, pode-se quantificar a ação do composto em relação ao deslocamento das células para a região de sub-G1.

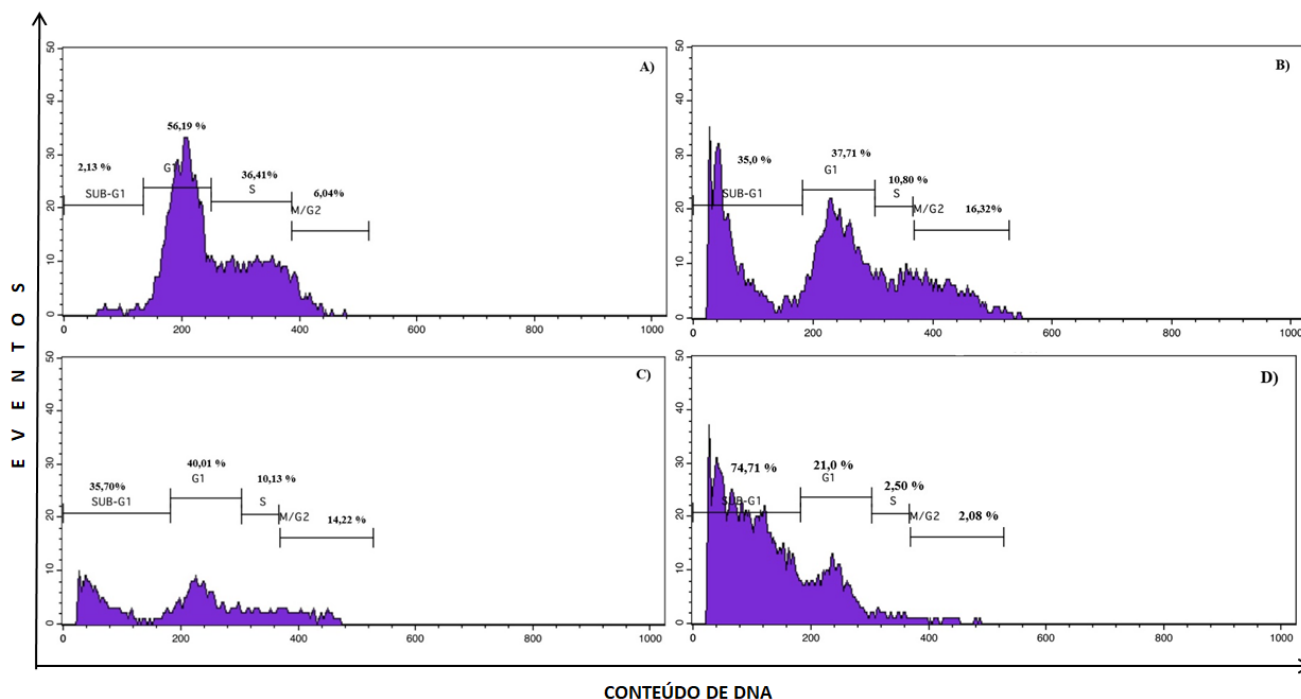


Figura 6. Análise do ciclo celular da linhagem BxPc-3. As células foram incubadas por 48 horas antes da análise por citometria de fluxo. **A)** Células não tratadas; **B)** Células tratadas com 2,4 $\mu\text{mol/L}$ de H04; **C)** Células tratadas com 4,8 $\mu\text{mol/L}$ de H04; **D)** Células tratadas com 32 μM de cisplatina. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Os dados obtidos estão apresentados na **Figura 6** e correspondem à análise após 48 horas de tratamento, com o objetivo de avaliar o deslocamento do conteúdo de DNA, expresso em porcentagem (%), como indicativo da fragmentação celular característica do processo apoptótico. No grupo controle, o percentual de células na fase sub-G1 — marcador clássico de fragmentação de DNA — foi de apenas 2,13%, evidenciando a estabilidade celular na ausência de tratamento (**Figura 6A**). Enquanto as células tratadas com 2,4 $\mu\text{mol/L}$ e 4,8 $\mu\text{mol/L}$ do composto **H04** apresentaram, respectivamente, 35% e 35,70% de células em sub-G1 (**Figura 6B** e **Figura 6C**), sugerindo uma indução significativa de fragmentação de DNA e morte celular programada. A diferença entre as duas concentrações, entretanto, foi pouco expressiva, indicando que o aumento da dose não resultou em um deslocamento substancial adicional para a fase sub-G1.

Como controle positivo, a cisplatina — em concentração de 32 $\mu\text{mol/L}$ — resultou em 74,71% de células em sub-G1 (**Figura 6D**), valor consideravelmente superior aos obtidos com o **H04**, o que reforça seu conhecido potencial citotóxico. No entanto, os resultados obtidos com o **H04** são promissores, especialmente considerando suas concentrações mais baixas e a seletividade demonstrada em análises anteriores.

Complexos de cobre (II) baseados em bases de Schiff reduzidas derivadas de salicilaldeído e aminoácidos mostraram a capacidade de clivar o DNA e exibiram atividade citotóxica significativa, sugerindo seu potencial como fármacos antineoplásicos (Korcová et al, 2023). Além disso, em pesquisa realizada por Sangeetha et al. (2021), foram sintetizados complexos de cobre (II) com ligantes de 2-metil-8-hidroxiquinolina e co-ligantes tri/diimina. Os complexos mostraram afinidade de ligação ao DNA, atividade de clivagem e indução de apoptose em células tumorais, com valores de IC_{50} inferiores aos da cisplatina.

Complementando desta forma, a ligação dos compostos de coordenação de cobre com o potencial de fragmentação do DNA, resultados semelhantes foram encontrados em ensaios realizados pelo nosso grupo. Um composto de cobre avaliado induziu a fragmentação do DNA nas linhagens celulares THP-1 e PC-3, indicando a morte celular por apoptose como um possível mecanismo de ação (Baptista, 2023). Esses achados estão em consonância com resultados obtidos em trabalhos anteriores desenvolvidos no mesmo laboratório. Em especial, o estudo conduzido por Silva (2019) investigou três complexos de cobre (II) — $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ (1), $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2) e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (3) — os quais também demonstraram indução

significativa de apoptose em células tumorais. Esses resultados reforçam o potencial terapêutico dos complexos metálicos de cobre no campo da oncologia experimental. Em consonância com esses achados, a literatura reporta que compostos à base de cobre (II) exibem atividade citotóxica significativa, geralmente associada à sua capacidade de interagir com o DNA, promovendo sua clivagem, além de regulares importantes vias apoptóticas (Borges et al., 2016; Fernandes et al., 2015).

6.3 Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).

Os resultados demonstrados no item 6.2 evidenciam o potencial promissor do composto **H04**, apontando indícios relevantes de indução de características apoptóticas que merecem ser exploradas com maior profundidade. O ensaio realizado forneceu dados significativos que justificam a continuidade das análises, com o objetivo de elucidar se o composto é, de fato, capaz de desencadear processos apoptóticos em células tumorais. Desta forma, o ensaio de Anexina e Iodeto de propídio (**Figura 7**), teve como objetivo avaliar a viabilidade celular e identificar células em diferentes estágios de morte celular, especialmente apoptose inicial, apoptose tardia e necrose.

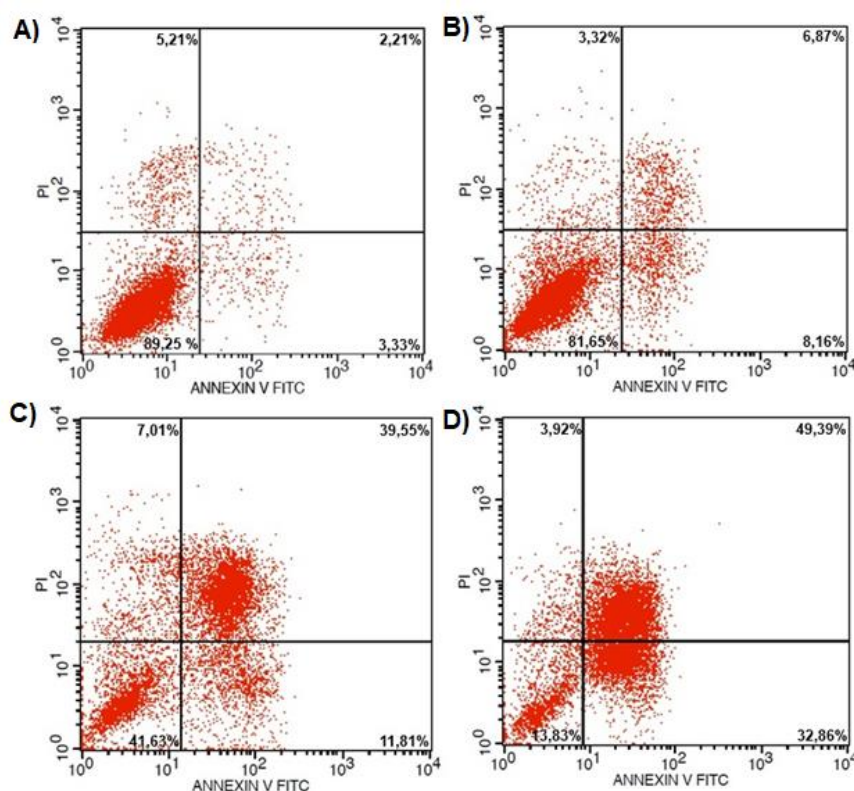


Figura 7: Análise do tipo de morte induzido pelo composto de cobre H04 através da exposição de fosfatidilserina (PS) e marcação com anexina V e iodeto de propídio

em células da linhagem BxPc-3. A) Células não tratadas; **B)** Células tratadas com 2,4 $\mu\text{mol/L}$ de H04; **C)** Células tratadas com 4,8 $\mu\text{mol/L}$ de H04; **D)** Células tratadas com 32 $\mu\text{mol/L}$ de Cisplatina. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Os dados obtidos por meio da marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI) indicam que o composto **H04** induz um efeito apoptótico significativo nas células de adenocarcinoma pancreático. De acordo com o histograma representado na **Figura 7**, as células foram tratadas com concentrações de 2,4 $\mu\text{mol/L}$ e 4,8 $\mu\text{mol/L}$ do composto, além de 32 $\mu\text{mol/L}$ de cisplatina como controle positivo. Na concentração de 2,4 $\mu\text{mol/L}$ (**Figura 7B**), observou-se que 6,8% das células apresentaram exposição de fosfatidilserina, evidenciada pela marcação positiva com anexina V, caracterizando apoptose em estágio inicial. Já na concentração de 4,8 $\mu\text{mol/L}$, 39,55% (**Figura 7C**) das células exibiram dupla marcação por anexina V e PI, indicando apoptose tardia ou necrose secundária. Em comparação, o tratamento com cisplatina a 32 $\mu\text{mol/L}$ (**Figura 7D**) resultou em 49,39% de células com padrão semelhante de dupla marcação, refletindo um efeito citotóxico mais pronunciado.

Segundo Elmore (2007), complexos metálicos podem induzir diferentes tipos de morte celular. O aumento da dupla marcação Anexina V⁺/PI⁺ em concentrações mais altas do composto sugere a ocorrência de necrose secundária. Isso acontece quando o processo de apoptose avança sem que as células mortas sejam removidas. A Anexina V marca células em estágio inicial de apoptose, enquanto o PI é usado para marcar células com membranas comprometidas (indicando necrose ou apoptose tardia). Um percentual abaixo de 50% pode sugerir que, embora algumas células tenham iniciado o processo apoptótico, muitas delas ainda não chegaram a estágios tardios suficientes para marcar com PI. Isso pode indicar que o composto de cobre está induzindo apoptose precoce, mas sem uma progressão significativa para necrose ou apoptose tardia (Giri, et al, 2022). Outra observação possível de ser feita seria em relação ao tempo de tratamento ou a concentração do composto de cobre que pode ter sido insuficiente para induzir um efeito mais amplo de necrose ou apoptose em estágio tardio. Uma exposição mais prolongada ou uma concentração mais alta poderia aumentar a proporção de células com membranas comprometidas, resultando em uma maior marcação com PI.

No entanto, as análises realizadas são significativas, pois, mesmo com as concentrações relativamente baixas do composto **H04**, observou-se uma indução expressiva da exposição de fosfatidilserina nas membranas celulares, com quase 40%

das células tratadas apresentando esse marcador. Esse resultado é particularmente relevante, pois, em concentrações muito mais elevadas de cisplatina, a indução de fosfatidilserina foi apenas 10% superior. Isso sugere que o composto **H04**, apesar de utilizado em concentrações menores, apresenta um efeito citotóxico significativo, capaz de ativar as vias iniciais da apoptose de maneira eficiente. Esses achados indicam que o composto **H04** pode atuar como um potente indutor apoptótico, apresentando um perfil interessante para o desenvolvimento de terapias anticancerígenas, especialmente no contexto de cânceres resistentes a tratamentos tradicionais como a cisplatina.

6.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O envolvimento de ROS frente ao composto de cobre e cisplatina foram confirmadas no ensaio colorimétrico de MTT, especificado no **Figura 8**:

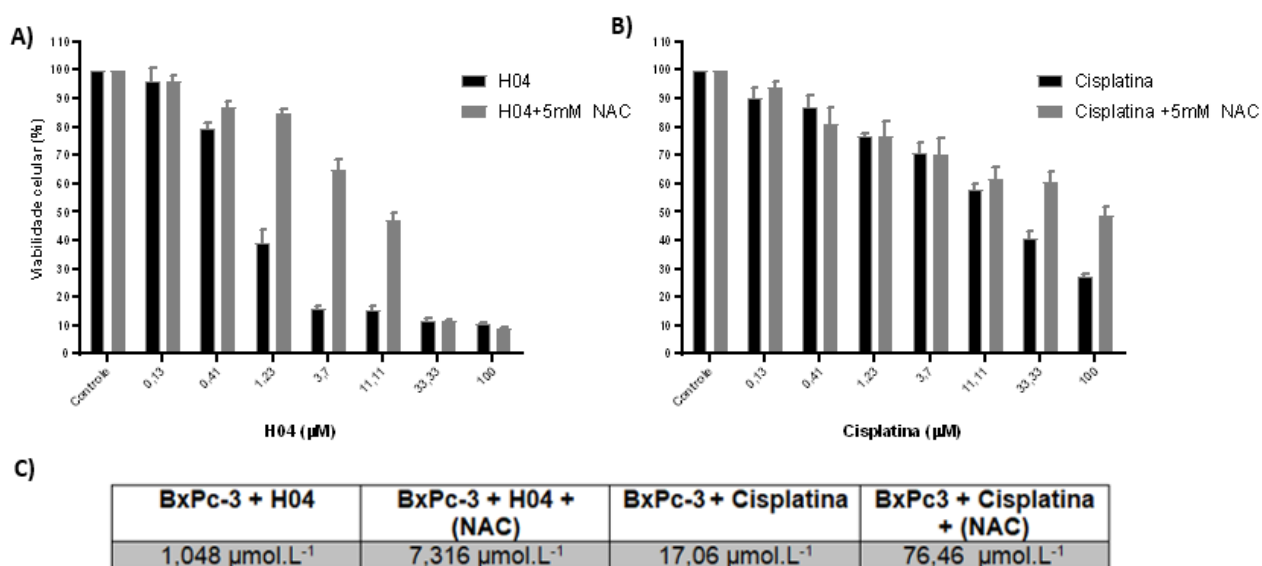


Figura 8 - Concentração inibitória para 50% (IC₅₀) das células pertencentes à linhagem BxPc-3 quando tratadas com H04 e Cisplatina na presença e ausência do antioxidante NAC. (n=3,) em (A) Concentrações realizadas em diluição seriada por três, valores de viabilidade celular expressões em porcentagens para o tratamento com o composto H04 com e sem a presença de NAC. (B) Concentrações realizadas em diluição seriada por três, valores de viabilidade celular expressões em porcentagens para o tratamento com o composto cisplatina com e sem a presença de NAC. Em (C) Valores de IC₅₀ encontrados a partir do tratamento com o composto H04 e a cisplatina, com e sem o pré tratamento de NAC.

As células BxPc-3, incubadas por 2 horas em diferentes concentrações de cisplatina juntamente com o antioxidante NAC, apresentaram uma maior viabilidade celular em comparação com as células tratadas com as mesmas concentrações de cisplatina, porém sem o tratamento prévio com NAC (**Figura 8**). A diferença observada

(**Figura 8C**) foi significativa, variando de 17,06 $\mu\text{mol/L}$ para 76,46 $\mu\text{mol/L}$. Esses resultados sugerem que o **NAC** diminui a atividade citotóxica da cisplatina, possivelmente devido à sua capacidade de inibir a formação de ROS. Um efeito semelhante foi observado no tratamento com o composto **H04**, que quando adicionado o **NAC** (**Figura 8B**), os valores de IC_{50} foram de 1,048 $\mu\text{mol/L}$, sem o **NAC** para 7,316 $\mu\text{mol/L}$ com a presença do antioxidante. Embora tanto o cobre quanto a cisplatina tenham demonstrado o mesmo efeito esperado quando tratadas com o antioxidante, a diferença do efeito citotóxico de ambos é nitidamente discrepante em mesmas concentrações, mostrando que em concentrações baixíssimas o composto **H04**, consegue não só inibir a viabilidade de 50% das células BxPc-3, mas também que sua ação é capaz de realizar uma produção de espécies reativas de oxigênio, resultado esse que necessita de maior observação para averiguar sua relação com as possíveis vias apoptóticas ou não.

Células de câncer pancreático, como as da linhagem Bxpc-3, frequentemente apresentam níveis elevados de estresse oxidativo devido a várias características associadas ao câncer, como alterações no metabolismo celular e disfunções mitocondriais, como: Efeito Warburg, disfunção mitocondrial, alterações em proteínas e vias de sinalização redox e hipóxia no microambiente tumoral. Todos esses mecanismos podem interferir na produção constitutiva de ROS na linhagem Bxpc-3, que têm uma produção naturalmente alta de ROS, devido à sua natureza de células tumorais (Kalyanaraman, 2022; Powers et al., 2011).

Para a análise qualitativa da indução de ROS pelo tratamento e a avaliação da viabilidade celular frente aos compostos, foi realizado o ensaio com a sonda DCFH-DA, visando observar de forma qualitativa a expressão do estresse oxidativo causado pelo tratamento. No ensaio de citometria de fluxo, após 24 horas de exposição aos compostos, as células foram marcadas com a sonda DCFH-DA, e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi quantificada. Exemplificados na **Figura 9**:

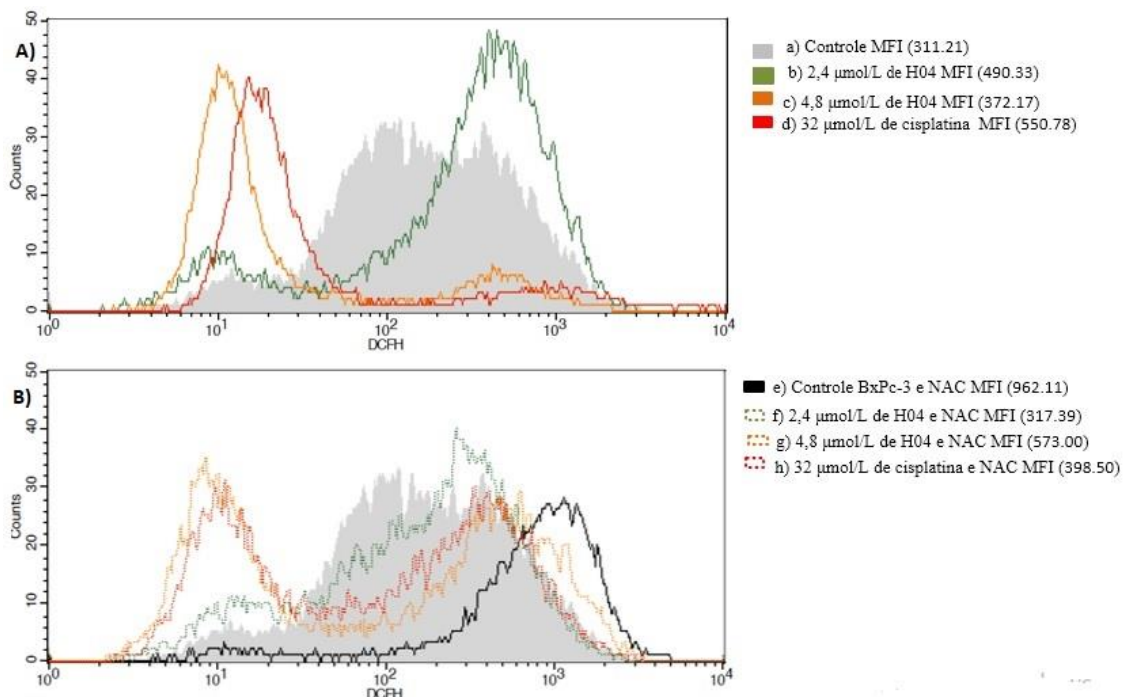


Figura 9: Análise da produção de ROS em células Bxpc-3 por citometria de fluxo após tratamento com cisplatina por 24 horas. A) Células não tratadas; B) Células tratadas com 2,4 μmol/L de H04; C) Células tratadas com 4,8 μmol/L de H04; D) Células tratadas com 32 μmol/L de cisplatina; E) Células não tratadas com NAC; F) Células tratadas com 2,4 μmol/L de H04 e NAC e G) Células tratadas com 4,8 μmol/L de H04 e NAC; H) Células tratadas com 32 μmol/L de cisplatina e NAC.

Conforme ilustrado na **Figura 9A** as células BxPC-3 tratadas com **H04** nas concentrações de 2,4 μmol/L e 4,8 μmol/L apresentaram valores de Intensidade mediana de fluorescência (*Median fluorescence intensity*) (MFI) de 490,33 e 372,17, respectivamente. Por outro lado, a cisplatina (32 μmol/L) resultou em um MFI de 550,78, enquanto o controle apresentou um MFI significativamente mais alto, de 311,21, indicando uma redução nos níveis de ROS após o tratamento. No entanto, quando as células foram pré-tratadas com NAC (**Figura 9B**), os valores de MFI foram consideravelmente mais altos nas concentrações de 4,8 μmol/L do composto **H04** e no controle branco. Esse efeito não foi observado nas concentrações de 1,2 μmol/L do composto de cobre e 32 μmol/L da cisplatina, cujos valores de MFI foram de 573,00 e 962,11, respectivamente, para a concentração de 4,8 μmol/L e controle branco. Para as concentrações de 2,4 μmol/L do composto de cobre e 32 μmol/L da cisplatina, os valores de MFI foram de 317,39 e 398,50, respectivamente.

Os dados demonstram que o NAC exerceu um efeito protetor para as células, sugerindo que, durante o tratamento, as células apresentaram uma produção aumentada

de ROS. Isso indica que o composto **H04**, nessa concentração, pode interferir no mecanismo de produção de ROS, modulando sua geração. Pesquisas indicam que elevados níveis de cobre reduzem a atividade de enzimas essenciais, como glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase (CAT), além de diminuir os níveis de tióis proteicos e não proteicos, o que sugere um aumento no estresse oxidativo (França et al., 2023). O NAC, sendo um antioxidante que repõe os níveis de glutathiona (GSH) e neutraliza as ROS, ao atenuar esse efeito, indica que a toxicidade do composto em células tumorais está diretamente relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio. Assim, é importante destacar que os resultados deste ensaio demonstraram que o composto de cobre (**H04**) tem uma capacidade superior de interferir na produção de ROS, sendo mais eficaz do que a cisplatina, mesmo quando utilizado em concentrações significativamente menores, como 2,4 $\mu\text{mol/L}$. Com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, as células cancerígenas podem evitar a morte celular e danos por meio da regulação positiva de programas antioxidantes. Portanto, se torna mais eficaz induzir a morte celular usando estratégias direcionadas para melhorar ainda mais os níveis de ROS e drogas que inibem programas antioxidantes (Zhang J, et al, 2024).

Curiosamente, o mesmo processo não aconteceu quando foi adicionado o NAC ao controle branco de Bxpc-3 e quando se dobrou o valor da concentração do composto **H04** para 4,8 $\mu\text{mol/L}$ (**Figura 9B**). Em ambas as análises a quantidade de fluorescência em MFI, aumento significativamente, quando comparada com o tratado sem a presença do NAC. Diante disto, surgem alguns apontamentos a serem analisados que possam corroborar para este resultado inesperado dentro deste contexto de análise.

As células BxPC-3 apresentam uma produção naturalmente alta de ROS, devido à sua natureza de células tumorais com metabolismo alterado e disfunção mitocondrial, como anteriormente mencionado. Isso pode fazer com que elas respondam de maneira diferente a tratamentos com compostos que induzem estresse oxidativo, como cobre, cisplatina ou outros fármacos, podendo até gerar maiores quantidades de ROS. Pensando desta forma, as células BxPC-3 podem ter mitocôndrias disfuncionais, o que também contribui para a produção de ROS (Parascandolo A, Laukkanen MO, 2018). Além disso, ROS podem ser induzidas por hipóxia, decorrentes dessa disfunção mitocondrial e da ativação enzimática, intensificando a instabilidade genômica,

aumentando a agressividade tumoral e contribuindo para a resistência à terapia (Mendoza EN, Ciriolo MR, Ciccarone F, 2025).

Embora não tenha sido realizado diretamente com a linhagem a Bxpc-3, por exemplo, um estudo publicado na revista *Toxicology in Vitro* investigou o efeito do NAC em células de carcinoma prostático humano PC-3. Os resultados mostraram que o NAC apresentou um efeito bifásico sobre os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio ROS, atuando como antioxidante nas primeiras horas de tratamento, mas exibindo um efeito pró-oxidante após 48 horas de exposição. Esse comportamento sugere que, em determinadas condições, o NAC pode inicialmente reduzir os níveis de ROS, mas posteriormente contribuir para um aumento adicional dessas espécies reativas (Lee, Yoon-Jin et al, 2011).

Com base nessas análises, é possível sugerir que a diferença observada pode estar relacionada às características da linhagem BxPC-3, conhecida por apresentar níveis basais elevados de espécies reativas de oxigênio. Esse perfil redox pode influenciar de forma particular a resposta das células ao tratamento com determinados compostos, especialmente os metálicos, como os à base de cobre. Quando expostas a agentes que induzem estresse oxidativo, como os complexos de cobre, é provável que as células BxPC-3 acumulem ainda mais ROS, o que pode desencadear efeitos tanto terapêuticos quanto tóxicos, a depender da intensidade do estresse oxidativo preexistente. Nesse contexto, embora o pré-tratamento com NAC, um antioxidante, geralmente reduza a produção de ROS em diversas linhagens celulares, em células como as BxPC-3, que já apresentam uma elevada carga oxidativa basal, o efeito protetor do NAC pode ser insuficiente ou mesmo revertido, resultando em um aumento adicional na produção de ROS.

6.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ M)

A fim de avaliar as vias apoptóticas que podem ser induzidas pelo composto **H04**, foi realizado o ensaio com o corante JC-1, o qual permite investigar a permeabilização da membrana mitocondrial, um mecanismo fundamental para a compreensão da possível ativação da via intrínseca de apoptose, bem como das interações relacionadas ao estresse oxidativo desencadeadas pelo tratamento. A preservação desse potencial é fundamental para a viabilidade celular, uma vez que a produção da maior parte das moléculas de ATP, responsáveis por fornecer energia para

as funções celulares essenciais, está diretamente ligada à integridade da função mitocondrial (Goutiou et al., 2020). Para a determinação do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a sonda catiônica lipofílica JC-1, o resultado está explicitado na **Figura 10**:

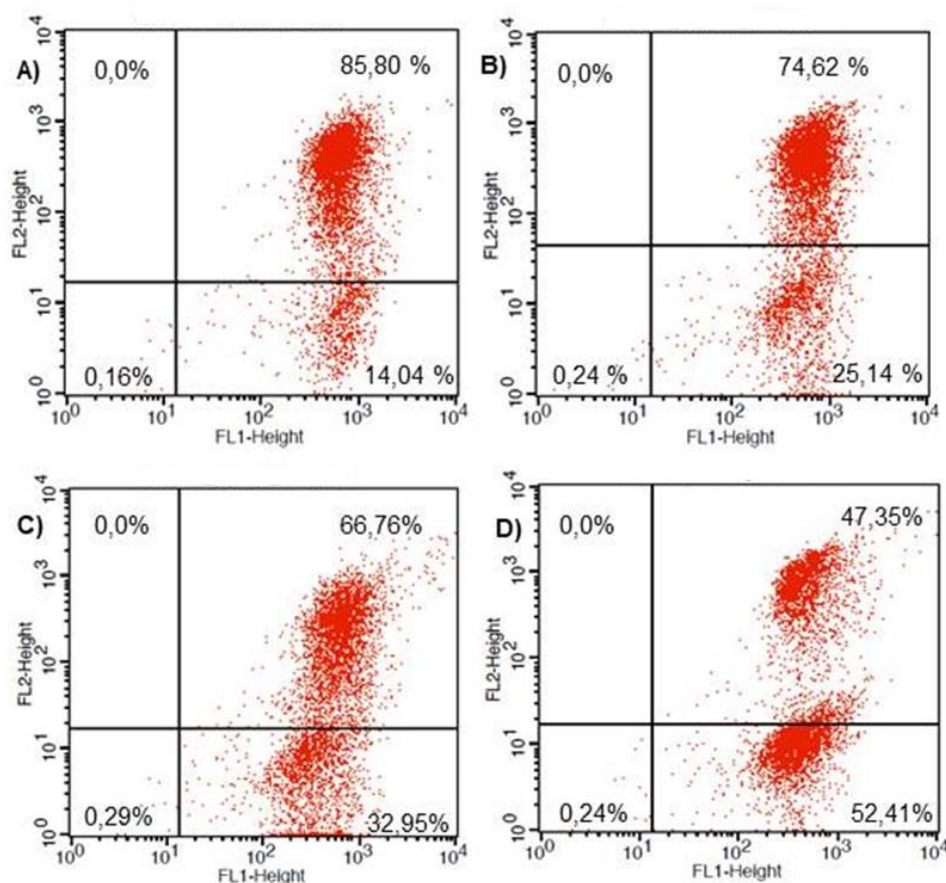


Figura 10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial marcadas com a sonda fluorescente JC-1 foram analisadas por citometria de fluxo após incubação por 48h. **A)** Controle negativo; **B)** Células tratadas com 2,4 µmol/L de H04; **C)** Células tratadas com 4,8 µmol/L de H04 e **D)** Células tratadas com controle positivo Cisplatina.

As células da linhagem BxPc-3 foram tratadas com o composto de cobre **H04** nas concentrações de 2,4 µmol/L e 4,8 µmol/L (**Figura 10B** e **Figura 10C**), resultando em 25,14% e 32,95% das células, respectivamente, apresentando comprometimento da integridade mitocondrial, evidenciado pela perda do potencial de membrana. Como controle positivo, a cisplatina, em concentração significativamente mais elevada (32 µmol/L), induziu esse mesmo efeito em 52,41% das células (**Figura 10C**). Esses dados evidenciam que o composto **H04**, mesmo em concentrações substancialmente menores, é capaz de promover alterações importantes na membrana mitocondrial, sugerindo seu

potencial em modular a via intrínseca da apoptose de forma eficaz. Além disso, a perda do potencial de membrana mitocondrial pode estar relacionada ao aumento do estresse oxidativo induzido pelo tratamento, corroborando sua possível atuação como agente pró-apoptótico com mecanismo mitocondrial.

A via intrínseca resulta inevitavelmente na alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial externa (MOMP), um evento considerado irreversível na apoptose. A perda do potencial mitocondrial leva à liberação do citocromo C, uma proteína chave na fosforilação oxidativa. Sua liberação desencadeia a formação do apoptossoma, complexo formado pelo citocromo C e pela proteína Apaf-1. O apoptossoma, por sua vez, ativa a pró-caspase 9, que posteriormente facilita a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7. Esse conjunto de reações resulta na clivagem do DNA e na formação dos corpos apoptóticos (Carneiro; El-Deiry, 2020).

Estudos anteriores demonstram que o potencial da transmembrana mitocondrial e os níveis de ATP diminuem em resposta ao cobre, assim como a fissão mitocondrial que leva à disfunção mitocondrial, além disso, a taxa de apoptose também foi proporcional ao nível de cobre no meio de crescimento. Ou seja, demonstraram que compostos de cobre podem induzir apoptose e autofagia por meio de estresse oxidativo mediado por disfunção mitocondrial, levando à perda do $\Delta\Psi_m$ (Kang Z, et al, 2019). Ademais, verificou-se que complexos de cobre com afinidade mitocondrial são capazes de promover a dissipação do $\Delta\Psi_m$, culminando em apoptose mediado por p53 em células hepáticas, por exemplo, de maneira semelhante, a cisplatina é amplamente reconhecida por induzir apoptose via intrínseca, associada à geração de espécies reativas de oxigênio e ao comprometimento da função mitocondrial (Xue X, et al, 2012).

Em consonância com a literatura, o composto **H04** demonstrou capacidade de induzir a permeabilização da membrana mitocondrial, mesmo em baixas concentrações (2,4 $\mu\text{mol/L}$ e 4,8 $\mu\text{mol/L}$), apresentado na **Figura 10B** e **Figura 10C**. Embora o percentual de células com a membrana mitocondrial comprometida seja inferior ao observado com a cisplatina, vale ressaltar que esta última foi utilizada em concentrações significativamente mais altas (32 $\mu\text{mol/L}$), apresentado em **Figura 10D**. Esse resultado evidencia a eficácia do composto **H04** na ativação de mecanismos essenciais para a indução da via intrínseca da apoptose. Esses achados reforçam o potencial terapêutico do composto **H04** como um agente capaz de modular processos celulares críticos, como

a morte celular programada, mesmo quando utilizado em concentrações inferiores às de tratamentos tradicionais, como a cisplatina.

CAPÍTULO II – Estabelecimento de células –tronco tumorais de adenocarcinoma pancreático a partir de modelo heterotípico xenográfico

1. Introdução

O câncer de pâncreas é um dos tipos mais agressivos e letais de câncer, frequentemente diagnosticado em estágios avançados, quando as opções de tratamento são mais limitadas. Devido ao diagnóstico tardio e à rápida progressão da doença, o câncer de pâncreas apresenta uma taxa de sobrevivência em cinco anos inferior a 9%, uma das mais baixas entre os cânceres sólidos (Observatório Global do Câncer, 2025). Esse panorama evidencia a necessidade urgente de métodos de detecção precoce, bem como o desenvolvimento de terapias mais eficazes, que possam melhorar as taxas de sobrevivência e oferecer melhores perspectivas para os pacientes. Nos últimos anos, avanços na tecnologia têm possibilitado novas abordagens terapêuticas, como a terapia direcionada e a imunoterapia, proporcionando alternativas mais precisas e personalizadas para os pacientes. Contudo, apesar dessas inovações, os tratamentos ainda enfrentam limitações significativas em termos de eficácia, e a resistência terapêutica continua a ser um grande desafio, dificultando a erradicação completa da doença e a melhoria das taxas de cura a longo prazo (Lee, Su Yeon et al, 2017).

As células-tronco cancerígenas (CTCs), um pequeno subconjunto celular dentro dos tumores, possuem características de autorrenovação e proliferação contínua, e desempenham um papel crucial na tumorigênese, metástase e na manutenção da heterogeneidade tumoral (Mitchell, Kelly et al, 2023). A complexidade dos tumores vai além das células malignas, envolvendo uma variedade de tipos celulares, como células imunes e estromais, o que contribui para uma considerável heterogeneidade intra- e intertumoral (Cavalli, Florence MG et al, 2017). Embora as análises transcriptômicas tradicionais tenham proporcionado valiosos insights sobre o crescimento e evolução tumoral, elas podem não capturar adequadamente sinais de grupos celulares cruciais para o desenvolvimento do tumor. Esses estados celulares essenciais, como as CTCs e as células imunes envolvidas nas respostas terapêuticas, são fundamentais para entender

o comportamento tumoral e o sucesso das abordagens terapêuticas (Mitchell, Kelly et al, 2023).

Diante disso, a investigação das características das CTCs no câncer de pâncreas torna-se essencial. Estudar essas células é fundamental para entender os mecanismos específicos desse nicho celular no microambiente tumoral. Com isso, é possível estabelecer novas relações e estratégias terapêuticas, utilizando modelos murinos para simular interações complexas entre o microambiente tumoral e as células. Essas interações podem ajudar a identificar novos alvos terapêuticos e abordagens para tratar tumores altamente agressivos e resistentes, como o câncer pancreático. Um entendimento mais aprofundado do comportamento das CTCs poderá abrir caminho para tratamentos mais personalizados e inovadores.

2. Revisão Bibliográfica

2.2. Células-tronco cancerígenas

As células-tronco cancerígenas foram descobertas pela primeira vez em 1990, representam um pequeno grupo de células cancerígenas que compartilham características das células-tronco normais, como a autorrenovação e a pluripotência (Batler, et al, 2017; Bonnet, et al, 1997). Elas constituem uma pequena subpopulação dentro da massa tumoral, sendo sua origem ainda não completamente elucidada (Keyvani, et al, 2019), e surgem a partir de mutações nos genomas de células-tronco normais. Essas células representam a origem do tumor e geralmente correspondem a uma fração extremamente pequena da massa tumoral total (aproximadamente 0,01–2%), o que as torna particularmente difíceis de ser eliminadas por terapias convencionais. Além disso, possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos de tecidos maduros, incluindo músculos, ossos e órgãos, sendo essenciais para o desenvolvimento normal do organismo (Sun, et al, 2019). Essas células passam continuamente por ciclos de replicação e maturação. Embora apresentem mecanismos únicos de proteção contra mutações, estas ainda podem ocorrer, podendo resultar em consequências graves, como o desenvolvimento do câncer. Atualmente, muitos tratamentos oncológicos focam na redução da massa tumoral como um todo, sem atingir especificamente as CTCs, o que pode comprometer a eficácia terapêutica e favorecer a recorrência do câncer (Walcher, et al, 2020).

A hipótese das células-tronco cancerígenas é apoiada por várias descobertas importantes: (i) as CTCs representam uma subpopulação menor de células cancerígenas dentro de um tumor, mas exibem potencial tumorigênico quando implantadas em camundongos imunodeficientes; (ii) as CTCs podem ser identificadas e isoladas com base em marcadores de superfície específicos; (iii) os tumores derivados de CTCs contêm uma mistura heterogênea de células tumorigênicas e não tumorigênicas do tumor original; e (iv) as CTCs podem ser transplantadas em série por várias gerações, demonstrando sua capacidade de autorrenovação (Hanahan et al., 2022; Krishnamurthy et al., 2012).

Uma hipótese em relação ao seu surgimento propõe que as CTCs derivam de células-tronco adultas normais que adquiriram alterações epigenéticas e genéticas. (Nimmakayala, et al, 2019). Alternativamente, essas células podem originar-se a partir de células diferenciadas maduras por meio de diversos mecanismos, incluindo instabilidade genômica, transferência horizontal de genes e modificações no microambiente tumoral (Atashzar, et al, 2020).

Além disso, células cancerígenas diferenciadas podem sofrer desdiferenciação e adquirir características de CTCs em resposta a fatores como estresse, hipóxia, lesões ou exposição à radiação ionizante (Nimmakayala, et al, 2019). Evidências indicam que a transição epitelial-mesenquimal (EMT) desempenha um papel fundamental nesse processo, conferindo às células um fenótipo semelhante ao das CTCs, permitindo-lhes autorrenovação e diferenciação em diversos tipos celulares dentro do tumor (Wang, et al, 2019). Também se postula que as CTCs possam emergir por meio da fusão celular ou da reprogramação metabólica de células não-CTCs, contribuindo para a progressão tumoral e a heterogeneidade do câncer (Atashzar, et al, 2020).

Dois principais modelos buscam explicar a origem, progressão e heterogeneidade dos tumores: o modelo estocástico (ou modelo de evolução clonal) e o modelo hierárquico (ou modelo das células-tronco cancerígenas). No modelo estocástico, todas as células tumorais são consideradas biologicamente homogêneas, possuindo o mesmo potencial de desenvolvimento e a capacidade de impulsionar a progressão tumoral (Afify, et al, 2019). Esse modelo postula que mutações oncogênicas adquiridas por células somáticas diferenciadas normais levam à hiperplasia e contribuem para a expansão clonal (Melzer, et al, 2017). O acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas nessas células pode aumentar a agressividade do

tumor, favorecendo sua invasividade e resistência ao tratamento. Como consequência, ocorre a progressão tumoral e o aumento de sua heterogeneidade (Rich, et al, 2016).

O modelo hierárquico postula que apenas uma subpopulação específica de células cancerígenas possui potencial tumorigênico – as células-tronco cancerígenas. Segundo esse modelo, a iniciação tumoral ocorre quando uma célula-tronco normal escapa da regulação e se transforma em uma CTCs, sendo considerada a célula de origem do tumor (Melzer, et al, 2017; Plaks, et al, 2015). Além disso, esse modelo sugere a existência de uma hierarquia de diferenciação celular dentro do tumor, na qual as CTCs são responsáveis por sustentar todas as demais populações celulares tumorais (Atashzar, et al, 2020).

Entretanto, um modelo alternativo, baseado na plasticidade celular, integra conceitos dos modelos hierárquico e estocástico, propondo que as células cancerígenas podem transitar entre estados de células-tronco e células diferenciadas (Wang, et al, 2018). Nesse contexto, a capacidade de desdiferenciação celular pode ser herdada (como sugerido pelo modelo hierárquico) ou adquirida por meio de mutações (de acordo com o modelo estocástico). Assim, segundo o modelo de plasticidade, células tumorais diferenciadas podem readquirir características de CTCs por meio de mecanismos intrínsecos e/ou em resposta a estímulos do microambiente tumoral (Królewska-Daszczyńska, et al, 2022).

A intensa proliferação celular é uma característica comum das CTCs. A progressão do câncer depende fortemente da ativação das vias AKT, mTOR e MAPK/ERK, que induzem a expressão aumentada de proteínas responsáveis pelo ciclo celular. Essas vias de sinalização também desempenham um papel crucial, como será detalhado na próxima seção. De fato, a aquisição do fenótipo de célula-tronco está frequentemente associada ao aumento da proliferação. Por outro lado, intervenções que inibem esse fenótipo também comprometem o potencial proliferativo das células (Tersteege, et al, 2023; LI, Yarui et al, 2022; García-Gómez, et al, 2022; Hanahan, et al, 2011).

As CTCs são frequentemente apontadas como um dos principais fatores responsáveis pela resistência a múltiplos fármacos. Esse fenômeno está parcialmente relacionado à sua capacidade de permanecer em estado de quiescência, evitando os efeitos das terapias anticancerígenas (Chen, et al, 2016). Por exemplo, CTCs hepatocelulares CD13⁺ predominam na fase G0 do ciclo celular e demonstram

resistência ao 5-fluorouracil, uma vez que esse fármaco atua principalmente inibindo a replicação do DNA (Haraguchi, et al, 2010). Além disso, CTCs podem minimizar o acúmulo intracelular de agentes terapêuticos por meio da superexpressão de transportadores ALDH e da família ABC (ATP-Binding Cassette). Essas células também apresentam maior eficiência na reparação do DNA e na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), reduzindo a apoptose induzida pelo estresse gerado por quimioterapia ou radioterapia (Huang, et al, 2020). Por fim, as CTCs contribuem para a formação de um nicho imunossupressor, que dificulta a penetração de agentes terapêuticos e compromete a eficácia da imunoterapia. Os mecanismos específicos envolvidos na resistência a quimioterapia, radioterapia, terapia-alvo e imunoterapia serão explorados nas próximas seções (Plaks, et al, 2015).

De modo a analisar a progressão do câncer, vale ressaltar que a metástase do câncer é um processo complexo que ocorre em cinco etapas principais: escape celular, intravasamento, sobrevivência na circulação, extravasamento e crescimento no novo local (Majidpoor, Jamal; Mortezaee, Keywan, 2021). Em tumores de origem epitelial, estudos mostram que a transição epitélio-mesenquimal (EMT) desempenha um papel fundamental nesse processo metastático. Além disso, a EMT pode induzir a geração de células-tronco em células epiteliais (Mittal, et al, 2018) evidenciando uma forte relação entre EMT e CTCs. No nível molecular, diversas vias de sinalização, como WNT/ β -Catenina, Notch, PI3K/AKT, Hedgehog e NF- κ B, estão envolvidas na aquisição das características mesenquimais das células cancerígenas. Essas mesmas vias também são essenciais para a indução e manutenção do fenótipo de células-tronco (Liao, Wen-Ting et al, 2014).

As vias de sinalização mais estudadas para as CTCs, são respectivamente: WNT/ β -Catenina, conhecida por seu envolvimento em vários processos fisiológicos e doenças, é evolutivamente conservada (Rim, Ellen Youngsoo; Clevers, Hans; Nusse, Roel, 2022), a via de sinalização *hedgehog* clássica (conhecida como: “Caminho do Ouriço”) abrange várias cascatas (Zhang, Yunxiao; Beachy, Philip A, 2023), a via *Notch* (Via do “Entalhe”) compreende vários componentes principais: o receptor Notch, o ligante Notch, o CBF-1, o supressor de sem pelos, Lag (CSL), a proteína de ligação ao DNA e genes alvo a jusante. via NF- κ B, que consiste em várias cascatas, é ativada quando as células encontram vários estímulos, levando à degradação da proteína I-kappa B (I κ B) pela ativação da cinase I κ B. A via JAK/STAT consiste em três

componentes principais: receptores relacionados à tirosina quinase que recebem sinais, tirosina quinase JAK que transmite sinais e fatores de transcrição STAT (XUE, Chen et al, 2023), a via PI3K/AKT, como um fator essencial na via PI3K/AKT, a AKT sofre mudanças estruturais e ativação pela PI3K, que subsequentemente modula uma cascata de substratos a jusante para regular vários comportamentos celulares (Glaviano, Antonino et al, 2023) e a Via PPAR, onde os PPARs, pertencentes à família de receptores hormonais nucleares, são receptores ativados por ligantes que regulam vários processos metabólicos, como o metabolismo de gordura e glicose. Existem três subtipos principais: PPAR α , PPAR δ/β (PPARD) e PPAR γ (PPARG) (Montaigne, David et al, 2021).

A formação e manutenção das CTCs envolvem interações complexas e altamente reguladas entre diversas vias de sinalização (Yu, Y. et al, 2021). Tumores que apresentam alta expressão das vias de sinalização *Notch* e *Hedgehog* demonstram uma característica de maior estaminalidade, frequentemente associada a um microambiente hipóxico e à ativação de células T reguladoras (Chang, Wai Hoong; Lai, Alvina G, 2019). A estaminalidade das CTCs, bem como sua capacidade de autorrenovação, são sustentadas pela interação sinérgica entre múltiplas vias de sinalização. Nesse contexto, estudos indicam que a interleucina 6 (IL-6) e o óxido nítrico (NO), secretados por células supressoras derivadas da medula óssea (MDSCs), ativam as vias de sinalização STAT3 e Notch em células tumorais de câncer de mama, promovendo, de maneira conjunta, a indução da formação de CTCs. Esses achados destacam a complexidade das interações moleculares que sustentam o comportamento estaminal das CTCs e sua contribuição para a progressão tumoral (Wang, Bo et al, 2020).

Considerando o papel crucial das células-tronco cancerígenas na possível recidiva tumoral e nos mecanismos de resistência, esforços significativos de pesquisa estão sendo direcionados para identificar e tratar as CTCs. No entanto, a identificação de antígenos ou biomarcadores específicos para essas células continua a ser um desafio considerável. Os biomarcadores potenciais para CTCs, identificados por meio de vias metabólicas e de sinalização alteradas, podem ser amplamente divididos em duas categorias: marcadores de superfície celular e marcadores intracelulares. Os marcadores de superfície celular, especialmente as proteínas de transporte e os receptores de sinalização, têm recebido destaque devido ao seu potencial para facilitar o diagnóstico e

a entrega precisa de agentes terapêuticos diretamente às CTCs (Gisina, A., et al, 2023; Ding, Xi-wei; WU, et al, 2010).

2.3 Biomarcadores de células-tronco cancerígenas de pâncreas

Os marcadores de células-tronco cancerígenas desempenham um papel crucial na identificação e caracterização de subpopulações celulares altamente resistentes, que são responsáveis pela progressão, metástase e recorrência do tumor. Esses marcadores podem ser utilizados para prever a resposta ao tratamento, como a quimioterapia, e também podem estar associados à gravidade do tumor, além de se correlacionarem com a resposta à radiação. Dessa forma, podem ser fundamentais para prever o prognóstico dos pacientes após a radioterapia (Chu, X., et al., 2024). Proteínas como CD44, CD24 e ALDH1, entre outras, são frequentemente empregadas para isolar células-tronco cancerígenas (CTCs) em diversos tipos de câncer, permitindo a análise de suas propriedades biológicas e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas e eficazes (LEE, Su Yeon et al, 2017). Vários biomarcadores já estão sendo estudados, como ilustrado na **Figura 11**. Vale ressaltar que as diferenças entre os marcadores de CTCs em tumores sólidos e aqueles em malignidades hematopoiéticas estão principalmente na variação dos marcadores de superfície celular (Chu, X., et al., 2024).

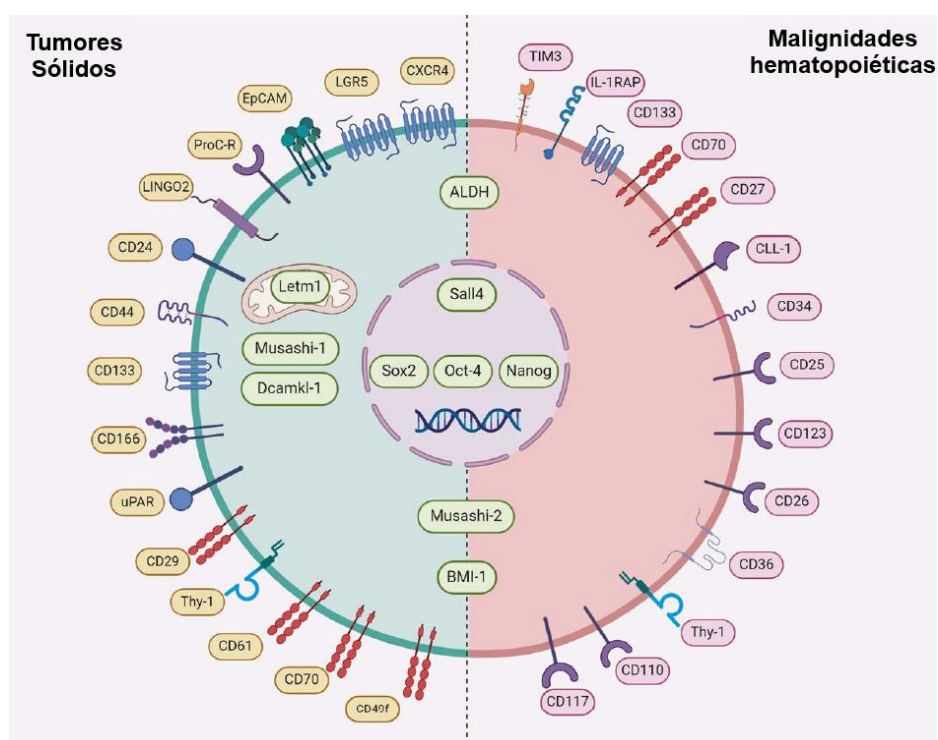


Figura 11 - Biomarcadores para células-tronco cancerígenas em tumores sólidos e malignidades hematopoiéticas. Os biomarcadores para CTCs podem ser classificados conforme o tipo de tumor: tumores sólidos (à esquerda), malignidades hematopoiéticas (à direita) ou ambos (no centro). Esses biomarcadores podem ser divididos em dois grupos principais: marcadores de superfície celular e marcadores intracelulares. Dentro dos marcadores intracelulares, há uma subdivisão entre fatores de transcrição, que atuam no núcleo, e moléculas localizadas no citoplasma. A distinção mais significativa entre os biomarcadores de tumores sólidos e os de malignidades hematopoiéticas está nos marcadores de superfície celular. Imagem adaptada de: (Chu, X., et al,2024).

Os nichos das células-tronco cancerígenas são identificados em diversos locais e desempenham um papel essencial na manutenção, autorrenovação e regulação da diferenciação dessas células. Acredita-se que esses nichos sejam modulados por mecanismos tanto intrínsecos quanto extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos, destacam-se os reguladores de pluripotência, como OCT4, Sox2, Nanog, c-MYC e KLF4 (Nagaraju, G. et al, 2023). Ressalta-se ainda, que certos marcadores de CTCs não são aplicáveis a todos os tipos de malignidade, apesar de sua expressão em uma ampla variedade de tecidos. Por exemplo, embora as ALDHs estejam presentes em diversos tecidos humanos e sejam consideradas um marcador de CTCs em vários tipos de câncer, suas atividades não têm papel funcional nas propriedades semelhantes a células-tronco em células de câncer de tireoide anaplásico. Além disso, os marcadores de CTCs, como CD133 e CD44, frequentemente estão superexpressos em tumores estromais gastrointestinais (GISTs), mas não podem ser utilizados para distinguir CTCs de células não-CTCs, nesse tipo de câncer, por exemplo (Rim, E. et al, 2022).

Importantes avanços na compreensão da biologia do tumor pancreático forneceram insights sobre os perfis genéticos e epigenéticos que fundamentam a complexidade e heterogeneidade do câncer pancreático (Patil K. et al, 2021). Os tumores pancreáticos sólidos são organizados hierarquicamente e apresentam uma subpopulação distinta de CTCs (Wei H, et al, 2011). A origem celular exata das células-tronco cancerígenas no adenocarcinoma pancreático (PaCTCs) ainda é incerta; no entanto, devido à sua semelhança funcional com células-tronco normais, é plausível que elas se originem de células-tronco ou progenitoras específicas de tecidos, células-tronco derivadas da medula óssea (BMDCs) ou mesmo de células adultas desdiferenciadas devido a mutações genéticas (Ishiwata T, et al, 2018; Reya T, et al, 2001).

Contribuindo para a busca de uma maior compreensão no comportamento das PaCTCs, uma série de marcadores de superfície celular têm sido utilizados como uma

ferramenta para o isolamento dessas células e além disso caracterização, juntamente por essas células exibirem uma infinidade de marcadores como descrito na literatura (Patil, et al, 2021; Bunger, S., et al, 2012). Apesar dos avanços na compreensão da biologia das células-tronco cancerígenas, muitos de seus atributos ainda não são totalmente compreendidos. Devido à heterogeneidade presente nas CTCs e às dificuldades técnicas associadas ao isolamento dessas populações celulares específicas, diversas metodologias têm sido aplicadas para enriquecer o isolamento de CTCs a partir de células cancerígenas heterogêneas na massa tumoral do pâncreas. Atualmente, as estratégias utilizadas para esse fim estão limitadas ao uso de marcadores de superfície celular (como EpCAM, CD133, CD44, CXCR4, ABCG2, CCR7, Oct4, Sox2 e Nanog), ensaios funcionais (como formação de esferoides, formação de colônias, atividade de ALDHs, e ensaio de SP), além do ensaio de aldefluor e do método de corante Hoechst-33,342 (Hsieh, M et al, 2020; Kahlert, C. et al, 2011).

Em se tratando desses marcadores, os mais utilizados são, o cluster de diferenciação CD44, CD24 (Ikenaga, N., et al. 2010; Li, C., et al. 2007), CD133 (também conhecido como prominina-1), o receptor de quimiocina CXC tipo 4 (Hoque, Saminur et al, 2023; Hermann, PC, et al, 2007) c-Met e a molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM, também chamada de antígeno específico epitelial, ESA) (Hoque, Saminur et al, 2023; Patil, et, al, 2021). Esses marcadores têm sido associados a características específicas das CTCs, como a capacidade de autorrenovação, invasão e resistência às terapias. Contudo, a compreensão aprofundada do papel e da interação desses marcadores nas populações de CTCs ainda é limitada e, em alguns casos, contraditória. Além disso, a ausência de consenso sobre uma assinatura molecular "global" que possa classificar de maneira definitiva essas populações em câncer pancreático reflete as complexidades e variabilidades presentes nesse campo de estudo (Patil, et, al, 2021). A identificação de um conjunto de marcadores específicos e universalmente aceitos para a caracterização das CTCs em câncer de pâncreas permanece um desafio, o que dificulta o desenvolvimento de terapias direcionadas mais eficazes.

As PaCTCs potenciais foram inicialmente identificadas como uma subpopulação de células tumorais com os marcadores CD44+, CD24+ e ESA+, correspondendo a cerca de 0,2% a 0,8% das células totais, e apresentando um potencial tumorigênico significativamente maior. O fenótipo CD44+ CD24+ ESA+ mostrou uma capacidade

até 100 vezes maior de iniciar tumores, em comparação com células cancerígenas não tumorigênicas, a partir de um número muito pequeno de células classificadas, suficientes para induzir tumores histologicamente semelhantes ao câncer pancreático primário em camundongos imunocomprometidos (Patil, K., Khan, FB, Akhtar, S. et al, 2021). É importante destacar que as células CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ demonstraram características típicas de células-tronco, como autorrenovação, habilidade de gerar progênie fenotipicamente diversa (diferenciada) e uma expressão aumentada da molécula de sinalização *Sonic Hedgehog*. Apesar de algumas limitações identificadas no estudo, esses achados abriram novas perspectivas de pesquisa na biologia das PaCTCs (Chu, X., et al., 2024; LI, Cet al, 2007).

2.4 Modelo experimental de tumores murinos

Diversos modelos animais foram desenvolvidos com o objetivo de esclarecer questões relacionadas ao câncer *in vivo*. Camundongos nus são usados como receptores para xenoenxertos de células tumorais humanas (Panaampon, J, et al, 2021). A utilização de camundongos como ferramentas para estudos biológicos é amplamente difundida, especialmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. (Pantaleão, C. et al ,2010). Esse uso é justificado por várias razões, como o fato de as linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, com características bem documentadas e monitoradas ao longo de várias gerações. Além disso, esses modelos compartilham semelhanças genéticas e fisiológicas com os seres humanos, o que permite o estudo de múltiplos aspectos da doença. Para que um modelo tumoral murino seja eficaz no estudo da tumorigênese, ele deve atender a critérios essenciais: origem e progressão clonal do tumor, evidências de progressão tumoral, patologia e histologia semelhantes à doença humana, a capacidade de investigar aspectos da invasão tecidual e o papel da resposta imune contra tumores, padrões de expressão gênica e a possibilidade de testar terapias antitumorais (Moraes, L 2018).

Em trabalhos anteriores no nosso grupo, foi padronizado modelos de tumores xenográficos, nessas análises, de acordo com Silva (2020), a experimentação foi conduzida utilizando camundongos BALB/c nude, com o objetivo de avaliar a formação tumoral em resposta a diferentes concentrações de células de carcinoma pancreático BxPC-3. Três concentrações distintas de células (5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6) foram

testadas em três grupos de dois animais, com idades entre 6 e 8 semanas. Cada grupo recebeu injeções subcutâneas dorsais de células suspensas em 50µL de PBS. Para uma análise mais robusta, o experimento com a concentração de 1×10^6 células foi repetido em um grupo maior ($n=6$). Após 30 dias, o volume tumoral foi determinado pela fórmula $V = (C \times L^2) / 2$, conforme descrito por Tsirmoula et al. (2012).

Dessa forma, os resultados obtidos indicaram uma considerável heterogeneidade entre os volumes tumorais nas diferentes concentrações testadas. No grupo inoculado com 5×10^5 células, um dos animais desenvolveu uma lesão de 210,7 mm³, enquanto o outro não apresentou lesão aparente. Para o grupo que recebeu 5×10^6 células, apesar de ambos os animais apresentarem lesões, os volumes tumorais foram substancialmente diferentes (277,9 mm³ e 142,5 mm³). Por outro lado, o grupo inoculado com 1×10^6 células demonstrou um resultado mais promissor, com ambos os animais desenvolvendo lesões de volumes semelhantes (189,6 mm³ e 180,9 mm³). Este resultado foi posteriormente confirmado por um experimento repetido com seis animais, onde os tumores formados apresentaram volumes homogêneos, variando entre 180,3 mm³ e 190,4 mm³ (Silva, M., 2020).

Esses dados sugeriram que a concentração de 1×10^6 células BxPC-3 induziu o desenvolvimento de tumores mais homogêneos, o que pode ser um indicativo de uma melhor adequação dessa concentração para a formação de tumores consistentes em modelos murinos. A heterogeneidade observada nas concentrações mais altas de células pode refletir a variabilidade biológica dos camundongos ou a complexidade da interação entre as células tumorais e o microambiente. Tais resultados se tornaram importantes para a compreensão da dinâmica tumoral em modelos experimentais e forneceram uma base para a utilização desses modelos em estudos de terapias antitumorais. Referências essas utilizadas no desenvolvimento desta pesquisa.

3. Justificativa

A investigação das células-tronco cancerígenas no contexto do adenocarcinoma pancreático possui grande relevância científica e clínica, uma vez que essas células estão fortemente associadas à resistência aos tratamentos, à recorrência tumoral e ao potencial metastático. O adenocarcinoma ductal pancreático é uma das neoplasias mais letais, com taxa de sobrevida em cinco anos inferior a

10%, e está frequentemente associado a um diagnóstico tardio e à ineficácia dos tratamentos convencionais (Di Carlo C. et al, 2018). As PaCSCs são caracterizadas por sua elevada plasticidade e capacidade de autorrenovação, o que lhes confere propriedades metabólicas, metastáticas e de quimiorresistência distintas. Compreender os mecanismos moleculares e as vias de sinalização que sustentam esses processos malignos é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas capazes de superar as limitações dos tratamentos atualmente disponíveis. (Nagaraju, G. et al, 2023).

Diante da complexidade do comportamento tumoral, as células-tronco cancerígenas se destacam como elementos-chave na compreensão da progressão do câncer, resistência a terapias e recorrência da doença. Estudar essa população celular proporciona uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos que sustentam a heterogeneidade tumoral, além de contribuir para a identificação de alvos terapêuticos ainda pouco explorados. No contexto de tumores altamente agressivos, como o adenocarcinoma pancreático, o estudo das CTCs se torna ainda mais relevante, uma vez que pode direcionar o desenvolvimento de terapias mais eficazes e personalizadas, com potencial real de impacto clínico. Assim, investigar as vulnerabilidades específicas das CTCs representa um passo crucial para a superação dos desafios terapêuticos atuais e para a construção de estratégias inovadoras no combate ao câncer.

4. Objetivos

- **Objetivo Geral**

Estabelecimento de células – tronco tumorais de adenocarcinoma pancreático (BxPc-3) a partir de um modelo experimental de tumores murinos (Balb/c nude).

- **Objetivos específicos**

1. Estabelecer o cultivo *in vitro* em repicadas das células oriundas do tumor (BxPc-3 parental);
2. Realizar a análise histopatológica dos tumores;
3. Identificar e analisar a expressão de marcadores de células-tronco cancerígenas por meio da marcação de anticorpos na citometria de fluxo;

4. Analisar a viabilidade celular (IC_{50}) frente ao tratamento com os compostos de cobre (H04) e a cisplatina, por meio do ensaio de MTT
5. Determinar e quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio, utilizando o pré tratamento com NAC no ensaio de MTT e realização a marcação com a sonda de fluorescência DCHF -DA.;
6. Analisar indícios de morte celular (Ensaio de Anexina V, associada à marcação de Iodeto de Propídeo).

5. Materias e Métodos

5.1 Experimentação *in vivo*

5.1.1 Animais

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil) sob o protocolo número 349. Camundongos *Balb/c nude* machos (com idades entre 3 e 4 semanas), fornecidos pelo biotério central da UENF, foram mantidos em gaiolas ventiladas com temperatura e umidade controladas, sob um ciclo de luz de 12 horas claro/12 horas escuro, com acesso irrestrito a ração e água.

5.1.2 Desenvolvimento de lesões tumorais

A indução do modelo tumoral heterotópico xenográfico com células de adenocarcinoma pancreático (BxPC-3) foi realizada em camundongos imunodeficientes da linhagem *Balb/c nude*. Para a indução do tumor, todos os camundongos foram sedados por via intraperitoneal com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (85 mg/kg), ambos diluídos em PBS. Os animais receberam injeções subcutâneas dorsais de células Bxpc-3 (1×10^6) suspensas em 50 μ L de PBS. Após 30 dias do inóculo, os volumes tumorais (mm^3) foram retirados para realização do cultivo *in vitro*.

5.1.3 Análises hitopatológicas

As amostras obtidas a partir do modelo murino foram encaminhadas para o Hospital Veterinário – LMPA – Setor Anatomia Patológica Veterinária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – RJ, para as análises histopatológicas. O material para análise foi em múltiplas amostras medindo cerca de 0,5 cm de

consistência macia, formato irregular e de coloração branca acondicionadas em frasco único contendo formol neutro tamponado a 10%.

5.2 Cultivo celular *in vitro* dos tumores sólidos originários do modelo experimental de tumores murinos

Para estabelecer o cultivo celular a partir dos tumores sólidos do modelo, os tumores foram fragmentados mecanicamente. Os fragmentos foram então colocados em placas para Cultura Celular (32,8 mm) e mantidos em 2 mL de meio suplementado. O meio utilizado consistia em 87% de DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-Glutamina e 1% de penicilina com estreptomicina. A cultura primária foi estabelecida com base no crescimento das células derivadas do fragmento de tecido; assim, as células que sobreviveram ao processo de desagregação e aderiram à placa formaram a primeira monocamada. À medida que a cultura se expandia, ela era repicada para gerar um estoque com até cinco passagens. Essa célula denominamos como CSC –BxPc-3, para diferenciação da célula BxPc-3 (Parental). Assim ela será mencionada ao decorrer do trabalho.

5.3 Caracterização de células-tronco cancerígenas com marcação de anticorpos

As células derivadas do modelo experimental murino foram semeadas e coletadas em uma densidade de 5×10^5 células por amostra. Cada amostra foi ressuspensa em 100 μ L de tampão de citometria e incubada por 5 minutos a 4°C com 5,0 μ L de Anti-CD16/CD32 de Camundongo (Bloco BD Fc de Camundongo™) (*BD Pharmingen*™). Em seguida, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos: PE Mouse Anti-CD44 Humano (*BD Pharmingen*™), PE Mouse Anti-Humano CD24 (*BD Pharmingen*™), PE Mouse Anti-Humano EpCAM (*BD Pharmingen*™), APC Mouse Anti-HLA-ABC Humano (*BD Pharmingen*™), além de controles isotípicos IgG1 BALB/c de camundongo, κ e IgG2a de camundongo, κ (*BD Pharmingen*™). As amostras foram incubadas por 30 minutos em ambiente escuro a 4°C, centrifugadas ao término desse período e submetidas a duas lavagens em 500 μ L de tampão de citometria. Após as lavagens, as amostras foram ressuspensas em 300 μ L para a leitura final.

5.4 Análise da viabilidade celular, avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)

Os procedimentos desses ensaios foram especificados no **Capítulo I**, itens: **5.3**, **5.5** e **5.6**.

6. Resultados e Discussões

6.1 Indução de tumores no modelo experimental murino e caracterização de células tronco tumorais com marcação de anticorpos.

A reprodutibilidade dos modelos murinos de câncer estabelece uma base sólida para investigações mais racionais, favorecendo a compreensão dessa patologia e possibilitando o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes para seu controle. Deste modo, modelos tumorais são desenvolvidos a partir de implantes xenográficos dos tumores humanos em camundongos imunologicamente comprometidos (Pantaleão, *et al*, 2010).

Após a inoculação das células da linhagem BxPC-3 de adenocarcinoma pancreático, os camundongos foram monitorados diariamente para acompanhar o desenvolvimento dos nódulos tumorais. Semanalmente, foram registradas fotografias para documentar o crescimento tumoral, como especificado na **Figura 12**. Observou-se que os nódulos começaram a atingir tamanhos significativos a partir da segunda semana e, após 28 dias, estavam adequados para a remoção e análises posteriores.

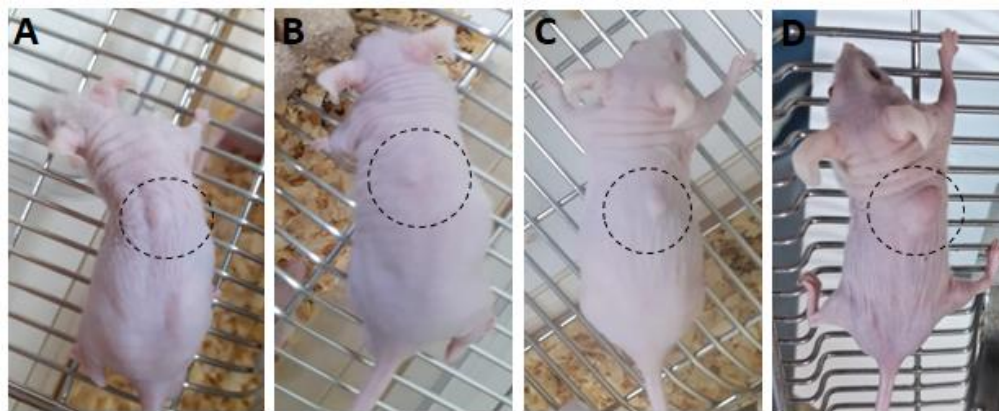
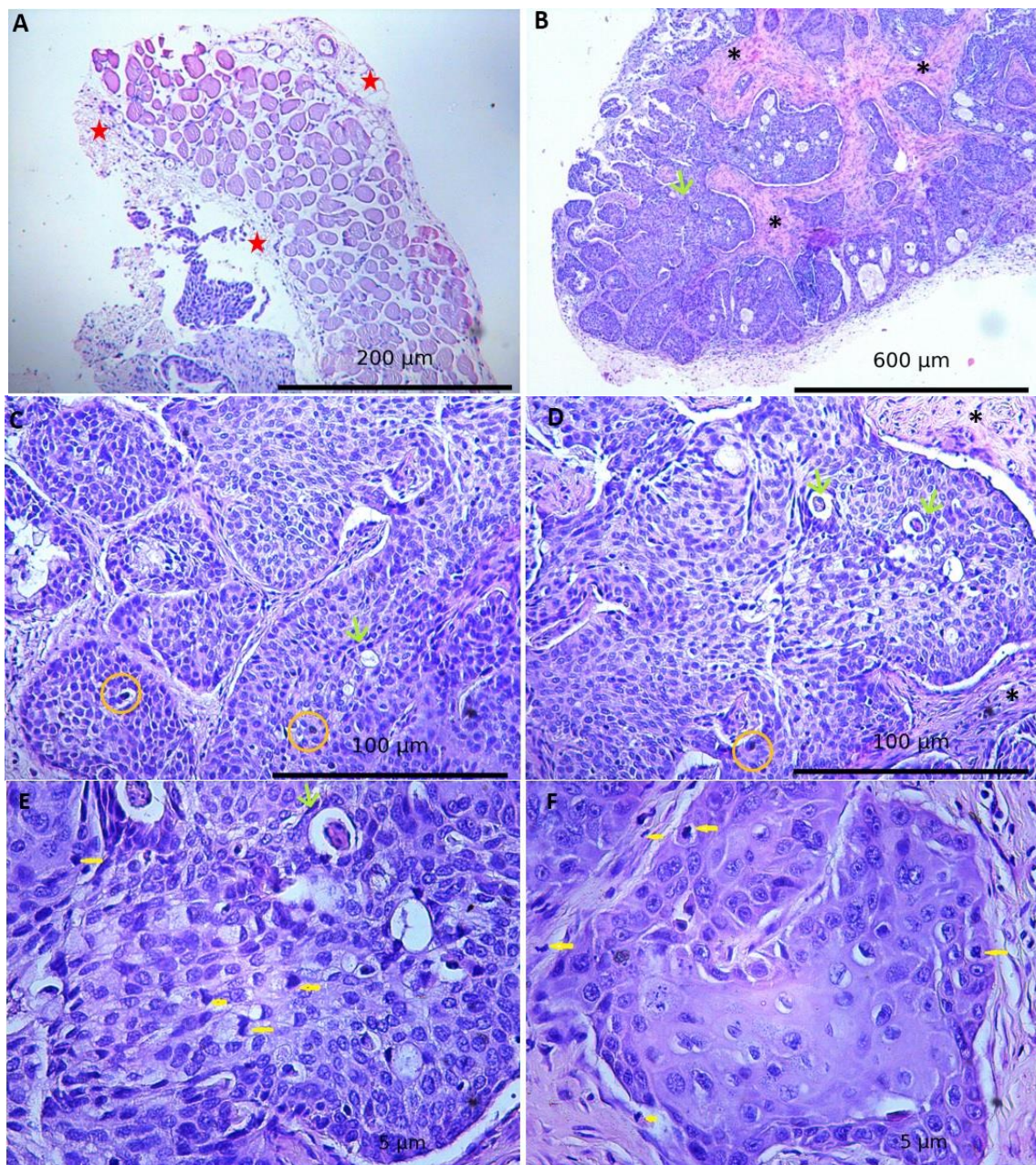


Figura 12 – Acompanhamento do crescimento tumoral em camundongos Balb/c nude. Tumor formado com injeções subcutâneas dorsais de células (1×10^6). Quatro semanas após a injeção das células BxPc-3 apareceram em 5 dos 5 camundongos NOD/SCID. (A) Zero dias de inoculação, (B) Sete dias de inoculação. (C) Quatorze dias de inoculação e (D) Vinte e oito dias de inoculação.

Após a remoção dos tumores, estes foram selecionados para cultivo celular e análises histopatológicas. A análise histopatológica, especificada na **Figura 12**, foi realizada com o objetivo de investigar a arquitetura tecidual, a presença de células neoplásicas, alterações no microambiente tumoral e possíveis semelhanças morfológicas com o adenocarcinoma pancreático humano. Além disso, buscou-se avaliar características tumorigênicas, como proliferação celular, angiogênese e infiltração de células inflamatórias, bem como possíveis influências do modelo *in vivo* sobre o comportamento do tumor. Essas análises foram fundamentais para validar a adequação do modelo experimental e compreender melhor os mecanismos envolvidos na progressão tumoral.



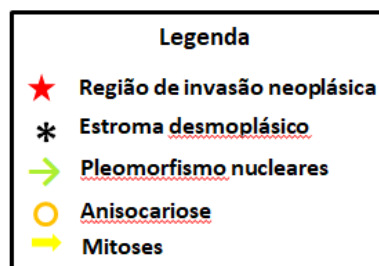


Figura 13 - Histopatologia no H/E, em secções do tumor Bxpc-3 induzido em Balb C/ Nude.

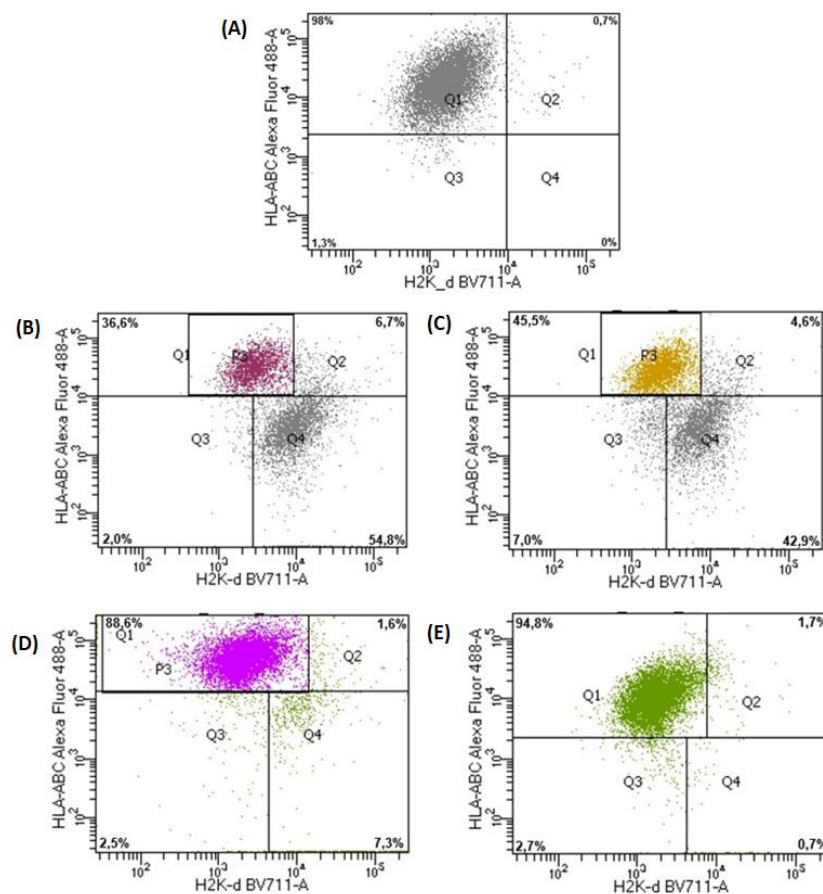
A avaliação histopatológica das secções das amostras analisadas, coradas em Hematoxilina e Eosina (H/E), evidenciou um processo neoplásico maligno caracterizado por uma intensa proliferação de células epiteliais. Essas células apresentavam um padrão arquitetônico predominantemente sólido, com citoplasma eosinofílico de bordas pouco delimitadas. Os núcleos celulares variaram de formato arredondado a oval e exibiram acentuado pleomorfismo, indicando (Meuten, D, 2020), a heterogeneidade morfológica pronunciada. Adicionalmente, foi observada anisocariose, perda de polaridade celular e hipercromatismo nuclear (**Figura 13C** e **Figura 13D**) representando características que reforçam o comportamento maligno da neoplasia.

Os cânceres exibem características conhecidas que os dotam de maior sobrevivência e capacidade proliferativa, frequentemente como resultado de mutações desestabilizadoras. As células que formam a massa tumoral apresentam diferentes níveis de diferenciação, sendo pouco semelhantes ao tecido de origem. Elas são anaplásicas, pleomórficas, possuem núcleo hipercromático e exibem uma proliferação atípica, com potencial invasivo e metastático. Embora o conhecimento sobre a fisiologia das células cancerígenas esteja bem estabelecido, as causas biológicas desse fenótipo ainda estão sendo investigadas (López-lázaro, 2018; Sinha, 2018).

O índice mitótico elevado foi uma característica marcante (**Figura 13E** e **Figura 13F**), com a identificação de 14 mitoses em 10 campos de grande aumento (FN22/40x), correspondendo a uma área total de 2,37 mm². Esse achado sugere uma intensa atividade proliferativa das células tumorais. Além disso, foram identificados campos de invasão neoplásica em tecidos musculares adjacentes (**Figura 13A**), evidenciando a capacidade infiltrativa do tumor e reforçando seu potencial agressivo. E a formação de um estroma desmoplásico (**Figura 13B**), conferindo um tecido de sustentação (conjuntivo fibroso) na formação do tumor, característica essa presente na progressão do

câncer de pâncreas (Meuten, D., 2020). Tais achados histopatológicos são críticos para o diagnóstico preciso e prognóstico da lesão, além de fornecer subsídios importantes para a escolha de abordagens terapêuticas mais adequadas.

Após o estabelecimento do cultivo celular das células primárias derivadas dos tumores, foram mantidas em cultura diferentes passagens celulares (P0 – cultura primária, P1, P2 e P3) com o objetivo de avaliar a expressão de marcadores de células-tronco cancerígenas ao longo das passagens. Para essa análise, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo, permitindo a detecção e quantificação da expressão dos marcadores CD44, CD24, CD133 e EpCAM. As avaliações foram conduzidas utilizando as células-tronco cancerígenas derivadas da linhagem BxPC-3 (CSCs-*BxPC-3*) em diferentes passagens (P0, P1, P2 e P3) e comparadas com a linhagem BxPC-3 parental, utilizada como controle. Essa abordagem permitiu identificar variações na expressão dos marcadores ao longo do tempo, auxiliando na caracterização do fenótipo das CSCs e na compreensão de sua estabilidade e plasticidade em cultura, como exemplificado na **Figura 14**.



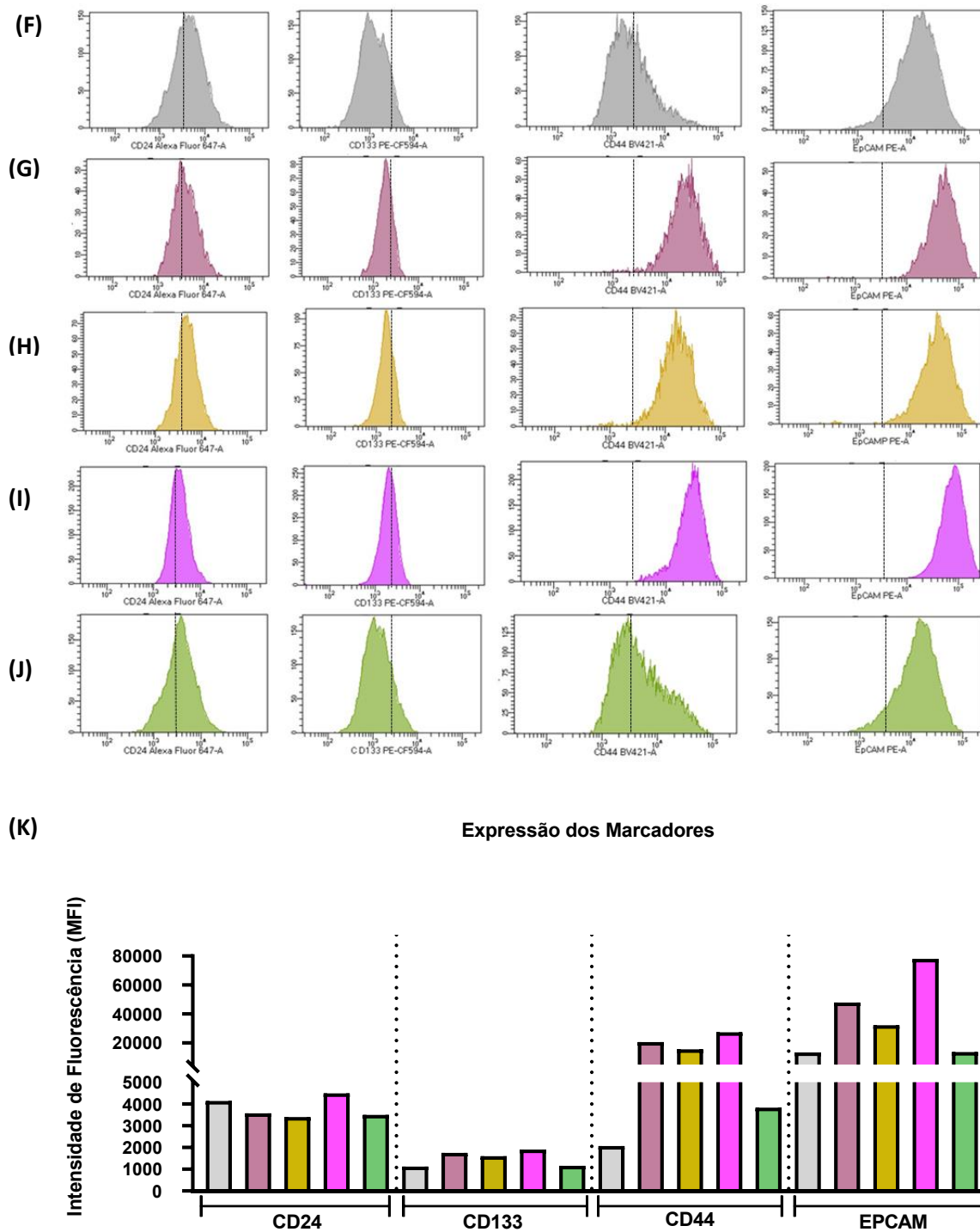


Figura 14: Percentual de células *CSC-BxPC-3* que expressam os marcadores HLA-ABC (Alexa Fluor 488-A) e H2K-d (BV711-A), analisado por citometria de fluxo. (A) Controle BxPC-3 parental, (B) *CSCs-BxPC-3* (P0), (C) *CSCs-BxPC-3* (P1), (D) *CSCs-BxPC-3* (P2), (E) *CSCs-BxPC-3* (P3). A intensidade de Fluorescência (MFI) apresentadas em (F) referente a BxPc-3, (G) *Csc-Bxpc-3* (P0), (H) *CSCs-BxPC-3* (P1), (H) *CSCs-BxPC-3* (P2) e (J) *CSCs-BxPC-3* (P3). Em (K), quantificação da intensidade de fluorescência expressa por cada marcador: CD24, CD133, CD44 e EPCAM.

A análise dos marcadores HLA-ABC (Alexa Fluor 488-A) e H2K-d (BV711-A) foi realizada para avaliar a possível infiltração de células de origem murina no modelo de inoculação e, conseqüentemente, determinar o percentual de células humanas provenientes da linhagem parental. As populações evidenciadas representam a fração de células humanas analisadas, permitindo a posterior avaliação da marcação de anticorpos para células tumorais.

Na linhagem parental BxPC-3 (**Figura 14A**), responsável pela iniciação do tumor, observou-se que 98% das células analisadas expressavam o marcador HLA-ABC, um conjunto de antígenos leucocitários humanos (HLA) pertencentes à classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-I), confirmando a origem humana das células. Ao analisar as passagens da CSC-BxPC-3, observou-se que, na cultura primária (**Figura 14 B**), 54,6% das células ainda expressavam o marcador H2K-d, uma proteína MHC-I característica de camundongos BALB/c, enquanto 36,6% já apresentavam expressão de HLA-ABC, indicando uma transição na composição celular. Com o avanço das passagens, houve uma redução progressiva na expressão de H2K-d e um aumento da população de células HLA-ABC positivas, conforme segue:

- **P1:** 42,9% H2K-d e 45,5% HLA-ABC
- **P2:** 7,3% H2K-d e 88,6% HLA-ABC
- **P3:** 0,7% H2K-d e 94,8% HLA-ABC

Esses resultados sugerem uma progressiva eliminação das células de origem murina ao longo das passagens, resultando em uma população predominantemente humana nas passagens mais avançadas. A partir da população celular identificada, sem a expressão de H2k-d, a mesma foi analisada quanto a expressão dos marcadores de células tronco tumorais: CD24, CD133, CD44 e Epcam. De acordo com a literatura, esses marcadores constantemente são expressão em linhas tumorais de câncer de pâncreas e já são muito estudados para a identificação de célula tronco tumorais (Phi, L.T.H., *et al*, 2018 e Jiangbing Zhou & Ying Zhang, 2008). A hipótese das células-tronco cancerígenas é importante para melhor entender as características biológicas intrínsecas do câncer pancreático. Isso sugere que a progressão do tumor é iniciada e conduzida por um pequeno subconjunto de células indiferenciadas com a capacidade de autorrenovação e diferenciação em diferentes populações tumorais integradas e heterogêneas (Wei HJ, *et al*, 2011).

Dessa forma, para avaliar a expressão dos marcadores mencionados na população de células controle e nas diferentes passagens das CSC-*BxPC-3*, foi realizada a marcação com anticorpos específicos, seguida da análise por citometria de fluxo, onde a intensidade de fluorescência foi utilizada como medida da expressão dos marcadores, como explicitado nos itens **(F)**, **(G)**, **(H)**, **(I)** e **(J)**, da **Figura 14**. A linhagem controle BxPC-3 demonstrou expressão significativa para todos os marcadores testados. Os valores de fluorescência média – MFI observados foram: 4.138 (MFI) para CD24, 2.069 (MFI) para CD44, 13.448 (MFI) para EpCAM e 1.126 (MFI) para CD133. Esses resultados indicam que a linhagem de adenocarcinoma pancreático já possui uma subpopulação com características de células-tronco cancerígenas, o que pode estar associado ao seu potencial de resistência terapêutica e capacidade de disseminação.

Dentre os marcadores analisados, observou-se uma fluorescência expressivamente elevada para EpCAM, um achado relevante, visto que esse marcador está diretamente envolvido na adesão celular e no potencial migratório das células tumorais. A alta expressão de EpCAM na linhagem BxPC-3 sugere uma dinâmica migratória versátil, na qual as células podem alternar entre modos de migração coletiva e individual. Estudos demonstram que as células BxPC-3 apresentam plasticidade fenotípica, sendo capazes de migrar tanto de forma coordenada em grupos celulares, facilitando a invasão tecidual, quanto de maneira individual, utilizando protrusões citoplasmáticas semelhantes a filopódios para atravessar a matriz extracelular (Kim *et al.*, 2020). Essa capacidade de alternar entre diferentes estratégias migratórias pode contribuir para a agressividade do tumor e sua capacidade de metastatização, tornando essas células um modelo relevante para estudos sobre invasão tumoral e terapias direcionadas.

Na análise das CSCs-*BxPC-3* na passagem P0 (**Figura 14G**), observou-se um ligeiro aumento na expressão de CD133, enquanto o marcador CD44 apresentou um aumento expressivo, com intensidade de fluorescência quase 10 vezes superior à observada no controle. Esse resultado indica uma forte superexpressão dessa população celular, embora ainda em menor grau quando comparada à linhagem controle.

As células cancerígenas primárias exibem um potencial migratório aprimorado em relação às células metastáticas de adenocarcinoma pancreático, o que pode estar diretamente associado à plasticidade fenotípica e à presença de células-tronco cancerígenas. A migração dessas populações de CSCs pode desempenhar um papel

crucial na agressividade do câncer de pâncreas, uma vez que essas células apresentam maior capacidade de invasão tecidual, resistência ao estresse do microambiente tumoral e potencial para iniciar novos focos tumorais à distância (Park, Dr. *et al*, 2020). Dessa forma, a alta expressão de CD44 reforça sua relevância como um marcador associado à adesão celular, interação com a matriz extracelular e promoção da transição epitélio-mesenquimal, processos essenciais para a disseminação tumoral. A expressão do CD44 apresentou valores expressivos desde a passagem primária das CSC-*BxPC-3* até a segunda passagem (**Figura 14I**), evidenciando que as células do modelo experimental mantêm significativamente esse marcador característico. Esse achado sugere que as CSCs-*BxPC-3* preservam um fenótipo altamente aderente e com potencial migratório ao longo das primeiras passagens.

No entanto, a partir da terceira passagem celular, observou-se uma leve redução na expressão de CD44, indicando uma possível transição fenotípica em direção a características mais próximas das células do controle. Essa diminuição pode estar associada a um processo de adaptação ao cultivo *in vitro*, no qual a população celular pode sofrer seleção e perder gradualmente algumas propriedades associadas à plasticidade tumoral (Zhao S., *et al*, 2017). Ainda assim, a expressão persistente de CD44 ao longo das passagens iniciais reforça sua importância como um marcador-chave na manutenção das propriedades das células-tronco cancerígenas e na regulação de sua capacidade invasiva.

No que se refere à expressão de CD133, tanto as passagens das CSC-*BxPC-3* quanto a linhagem parental *BxPC-3* apresentaram valores de MFI relativamente semelhantes. Observou-se um discreto e pouco expressivo aumento da fluorescência nas passagens P0, P1 e P2, seguido de um declínio em P3. Esse comportamento reforça a relevância da presença positiva desse marcador, visto que a literatura aponta sua associação com características de células-tronco cancerígenas.

Estudos demonstram que a superexpressão de CD133 em células de câncer pancreático está diretamente relacionada à indução de propriedades de células-tronco, além de promover a transição epitélio-mesenquimal (EMT), facilitando a invasão e a metástase por meio da ativação da via NF- κ B (Yasuhiro Sakai *et al.*, 2017; Nomura A *et al.*, 2015). Além disso, uma revisão publicada em 2020 destaca que as células-tronco cancerígenas, identificadas pela expressão de CD133, estão presentes desde os estágios iniciais do desenvolvimento tumoral no câncer de pâncreas e possuem forte relação com

a progressão da doença. Esse estudo sugere que a presença dessas células pode ser um fator prognóstico relevante, embora os mecanismos envolvidos ainda precisem ser mais bem investigados (Rodrigues, et al., 2020).

No contexto das células-tronco cancerígenas, o CD24 é considerado um marcador relevante. Estudos indicam que a expressão de CD24 está associada à capacidade de iniciação tumoral e resistência a terapias convencionais. Por exemplo, em câncer de mama, o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ tem sido identificado como característico de células-tronco cancerígenas, sugerindo uma relação entre a expressão desses marcadores e a agressividade tumoral (Rabinovich, I. et al, 2018). Na análise da marcação de CD24, observou-se que as CSCs-BxPC-3 apresentaram um padrão semelhante ao observado para CD133, embora em uma proporção ligeiramente mais elevada, podendo assim dizer, quase que o dobro. No entanto, ambos os marcadores não exibiram superexpressão quando comparados à linhagem controle e nem com os outros marcadores analisados: CD44 e EPCAM. Ainda assim, é importante ressaltar que a presença desse marcador foi evidente, indicando que as populações analisadas possuem CD24 em sua membrana, o que reforça sua associação com características de células-tronco cancerígenas.

Além disso, a superexpressão de CD24 tem sido associada à resistência a agentes quimioterápicos em diversas linhagens celulares. Por exemplo, células leucêmicas com expressão de CD24 mostraram resistência à doxorrubicina, possivelmente devido à ativação das vias Wnt/ β -catenina e PI3K/Akt (Panagiotou E, et al, 2022). Embora a intensidade de expressão possa variar, a presença de CD24 em BxPC-3 reforça sua utilidade como modelo para estudos relacionados a terapias direcionadas e compreensão da biologia das células-tronco cancerígenas no câncer de pâncreas.

A análise de citometria de fluxo demonstrou que as células estabelecidas *in vitro*, a partir do tumor no modelo murino *in vivo*, embora apresentassem um percentual significativo de células infiltradas de origem murina nas passagens iniciais (P0 e P1), tornaram-se progressivamente mais refinadas ao longo das passagens subsequentes. Esse refinamento resultou não apenas na predominância de células humanas, mas também em uma expressão marcante dos principais marcadores de células-tronco cancerígenas descritos na literatura para o câncer de pâncreas.

Esse ensaio se mostrou de extrema importância, pois evidenciou a presença de uma população celular predominantemente humana (cerca de 94,8% das células expressando HLA-ABC). Além disso, observou-se uma redução progressiva da população murina até a segunda passagem, acompanhada por uma superexpressão de CD44 e EpCAM, além da expressão relevante de CD133 e CD24 – marcadores intimamente associados à progressão tumoral. Esses achados sugerem que, ao final do processo de estabilização, aproximadamente 95% das células em cultura apresentam características de células-tronco cancerígenas, reforçando seu papel na agressividade e resistência terapêutica do câncer de pâncreas.

6.2 Análise da viabilidade celular e avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para compreender os mecanismos pelos quais as CSCs respondem ao tratamento com complexos metálicos, realizamos ensaios utilizando o composto **H04** e a cisplatina, conforme mencionado no **Capítulo I**. O objetivo foi avaliar a viabilidade celular, conforme apresentado na **Tabela 1**, e a possível indução de morte celular por apoptose. Para isso, realizamos um ensaio de MTT com a presença de NAC e sem a presença de NAC e além disso, analisamos a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em BxPC-3 (controle) e CSC-*BxPC-3*, por citometria de fluxo.

No ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-di-fenil brometo de tetrazolina), a viabilidade celular foi avaliada quando combinada com o tratamento das células CSC – *BxPc-3* com o composto **H04** e a cisplatina. Para além disso, foi avaliado juntamente a presença de produção de espécies de reativas de oxigênio durante o tratamento de 48 horas, especificado na **Figura 15** a seguir:

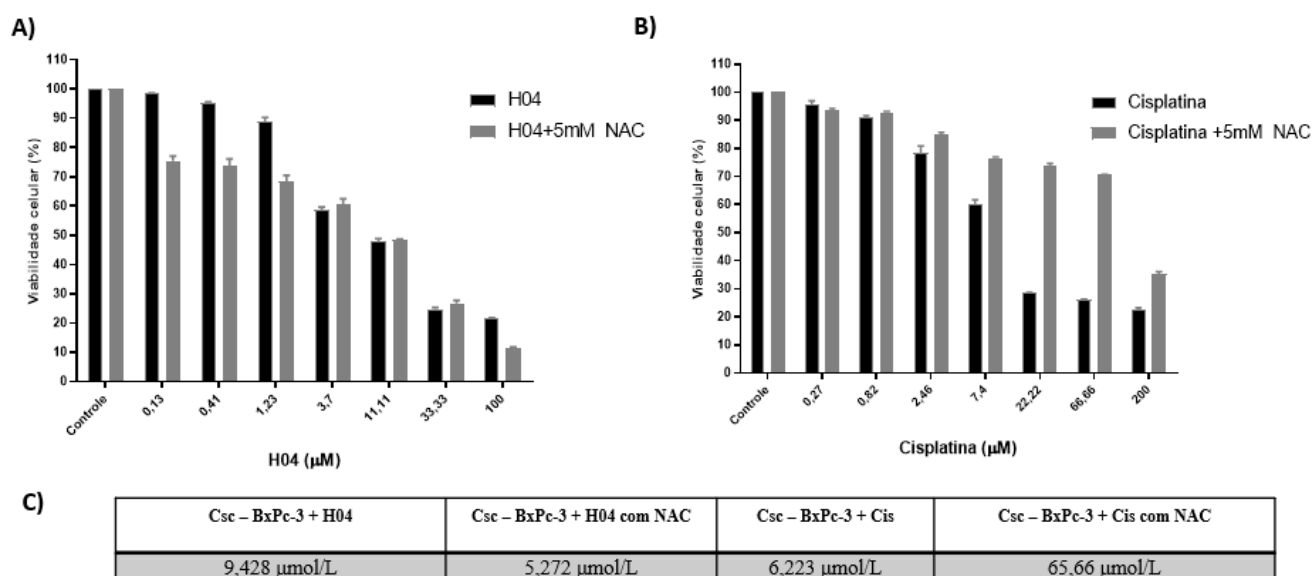


Figura 15 - Concentração inibitória para 50% (IC₅₀) das células pertencentes à linhagem CSC - BxPc-3 quando tratadas com H04 e Cisplatina na presença e ausência do antioxidante NAC. (n=3,) em (A) Concentrações realizadas em diluição seriada por três, valores de viabilidade celular expressões em porcentagens para o tratamento com o composto H04 com e sem a presença de NAC. (B) Concentrações realizadas em diluição seriada por três, valores de viabilidade celular expressões em porcentagens para o tratamento com o composto cisplatina com e sem a presença de NAC. Em (C) Valores de IC₅₀ encontrados a partir do tratamento com o composto H04 e a cisplatina, com e sem o pré tratamento de NAC.

O envolvimento de ROS e a viabilidade celular frente ao composto de cobre e cisplatina foram confirmadas no ensaio colorimétrico de MTT. As células CSC - BxPc-3 que foram incubadas em diferentes concentrações de cisplatina com o antioxidante NAC por 2 horas apresentavam maior viabilidade celular em comparação com as mesmas concentrações que não foram submetidas ao tratamento prévio com NAC, com uma diferença significativa de 6,22 μmol/L para 65,66 μmol/L (**Figura 15C**). Esses resultados indicam que o NAC inibe a atividade citotóxica da cisplatina devido a inibição de ROS. Curiosamente, o pré-tratamento das CSCs - BxPc-3 com NAC resultou em uma redução do IC₅₀ de 9,428 μmol/L para 5,272 μmol/L do composto **H04** (**Figura 15C**), sugerindo uma sensibilização das células ao tratamento. Apesar do NAC ser classicamente reconhecido como um antioxidante e protetor celular, em alguns contextos tumorais, a modulação do estresse oxidativo pode interferir em vias sinalizadoras essenciais para a manutenção do fenótipo tumoral e da resistência a drogas. Assim, a diminuição da carga oxidativa basal promovida pelo NAC pode ter comprometido mecanismos de defesa celular, tornando as CSCs - BxPc-3 mais suscetíveis à ação citotóxica do composto de cobre. Suposição possível também seria

que, ao reduzir os níveis de ROS com NAC, pode ter ocorrido uma desregulação de vias pró-sobrevivência, enfraquecendo a célula e tornando-a mais vulnerável ao composto de cobre.

De acordo com estudos realizados com três linhagens de câncer humano foram expostas à combinação de 1 mM de NAC e 10 $\mu\text{mol/L}$ de CuCl_2 . Essa dose fixa reduziu a viabilidade celular da linhagem de câncer pancreático Panc-1 em $84 \pm 2\%$, e das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e T47D em $62 \pm 4\%$ e $64 \pm 6\%$ respectivamente, resultados consistentes que também foram observados na linhagem de câncer de ovário A2780 (Zheng, et al, 2014). Além disso, estudos conduzidos em membranas lipídicas artificiais demonstraram que o NAC interage com fosfolipídios de carga negativa, um efeito que pode favorecer a penetração de nanopartículas de cobre através das membranas. Dessa forma, tanto a modificação eletroquímica dos íons de cobre e a consequente geração de espécies reativas de oxigênio, quanto a interação direta com a membrana plasmática, parecem estar envolvidos nos mecanismos que levam ao dano irreversível da membrana e à morte celular, em resposta à redução de metais presentes em compostos orgânicos e inorgânicos contendo cobre (Tsymbal AS, et al, 2021).

Posteriormente a esta análise qualitativa de indução de ROS pelo tratamento e a análise de viabilidade celular frente aos compostos, foi realizado o ensaio de DCFH – DA, para que fosse realizado uma observação qualitativa da expressão do estresse oxidativo causada pelo tratamento. No ensaio de citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com os compostos, as células foram marcadas com a sonda DCFH-DA, e a MFI foi quantificada.

Como mostrado na **Figura 16A**, as CSC-BxPC-3 tratadas com **H04** nas concentrações de 2,4 $\mu\text{mol/L}$ e 4,8 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram MFI de 118,33 e 123,53, respectivamente. Já a cisplatina (32, $\mu\text{mol/L}$) apresentou MFI de 142,17, enquanto o controle exibiu um MFI significativamente maior, de 212,28, indicando uma redução nos níveis de ROS após o tratamento.

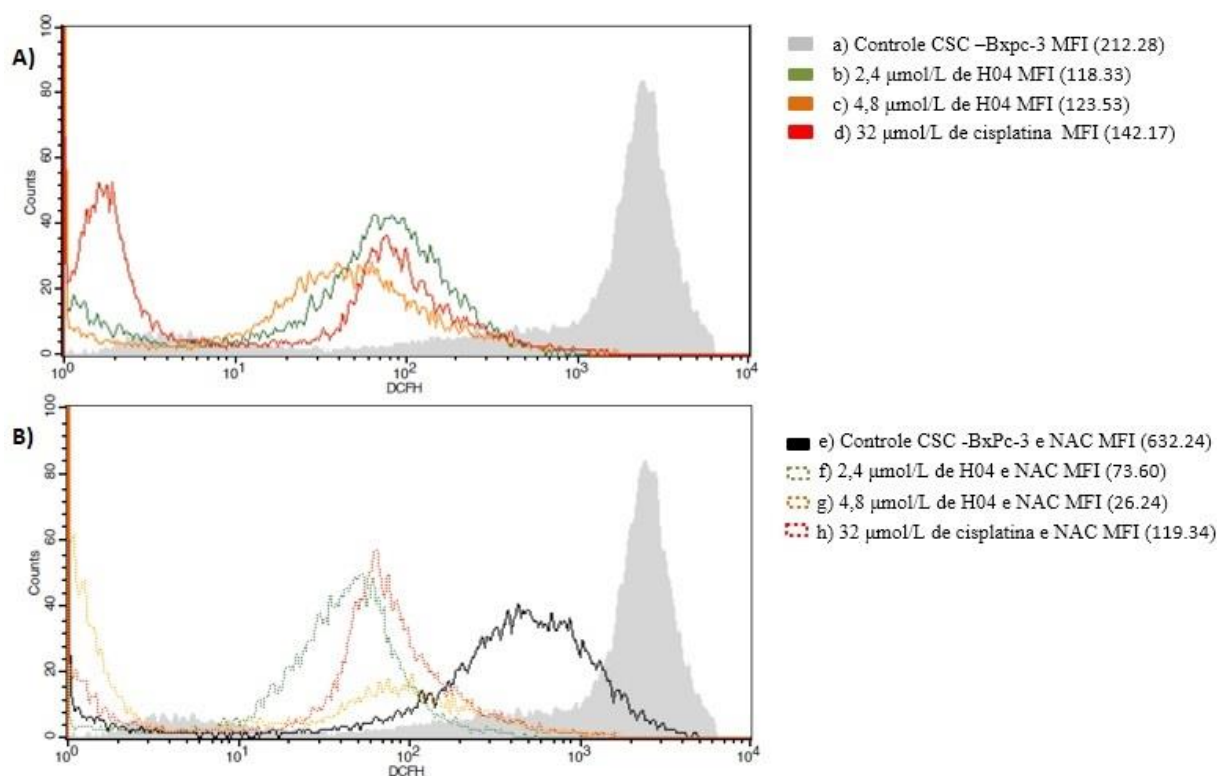


Figura 16: Análise da produção de ROS em células CSC - *Bxpc-3* por citometria de fluxo após tratamento com cisplatina por 24 horas. (A) Células não tratadas; (B) Células tratadas com 2,4 μmol/L de H04; (C) Células tratadas com 4,8 μmol/L de H04; (D) Células tratadas com 32 μmol/L de cisplatina; (E) Células tratadas com NAC; (F) Células tratadas com 1,2 μmol/L de H04 e NAC e (G) Células tratadas com 2,4 μmol/L de H04 e NAC; (H) Células tratadas com 32 μmol/L de cisplatina e NAC.

Além disso, na **Figura 16B**, observamos que, ao adicionar NAC (N-acetilcisteína, um antioxidante) às CSC-*BxPC-3*, o controle BxPC-3 apresentou um MFI de 632,24, enquanto as células tratadas com **H04** (2,4 μmol/L e 4,8 μmol/L) exibiram uma redução expressiva na fluorescência (MFI de 73,60 e 26,24, respectivamente). Já as CSC-*BxPC-3* tratadas com cisplatina e NAC apresentaram um MFI de 119,34, sugerindo que o NAC atenuou parcialmente a geração de ROS induzida pelos tratamentos. Tais evidências demonstram que o composto **H04** induz uma elevação na produção de ROS, este é um indicativo de que o efeito do seu composto está, pelo menos em parte, relacionado ao aumento de estresse oxidativo. Estudos mostram que altos níveis de cobre diminuem a atividade de enzimas como glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e catalase (CAT), além de reduzir os níveis de tióis proteicos e não proteicos, sugerindo um aumento no estresse oxidativo (França, et al, 2023). Como o NAC é um antioxidante que repõe os níveis de glutathione (GSH) e neutraliza ROS, sua inibição do efeito sugere que a toxicidade do composto para as células tumorais depende da geração de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, vale

ressaltar que este ensaio elucidou que o composto **H04** possui uma capacidade maior de interferência a produção de ROS, sendo superior quando comparado com a cisplatina mesmo em concentrações significativamente menores.

Embora a cisplatina tenha induzido uma produção proporcionalmente menor de espécies reativas de oxigênio em comparação com o composto **H04**, tornou-se relevante investigar sua produção em diferentes concentrações. Essa análise visa compreender o comportamento das células *CSC-Bxpc-3* em resposta a esse fármaco amplamente utilizado e bem estabelecido no tratamento do câncer. A atividade anticâncer dos complexos de platina (II) é comumente associada à interação com as bases nitrogenadas do DNA, formando adutos que inibem a replicação, geram quebras nas fitas e causam codificação incorreta, levando à apoptose e à inibição da síntese de RNA e proteínas (Ortega et al., 2021). Contudo, as interações com o DNA não são os únicos mecanismos envolvidos, sendo também relevante o direcionamento de proteínas citosólicas para induzir a apoptose (Ortega et al., 2021; Zhou et al., 2002;). Estudos sobre as possíveis vias de ação desses derivados de platina demonstraram que a coordenação de ligantes de ácido carboxílico, atuando como moduladores redox nas posições axiais do centro Pt (IV), potencializa os efeitos antiproliferativos. Esse aumento ocorre por meio da combinação de interações diretas com o DNA e da geração de espécies reativas de oxigênio (Murilo, et al, 2022). Para isso avaliar essas possíveis interações foram realizadas o ensaio com DCFH-DA, permitindo a quantificação da produção de ROS em diferentes concentrações do fármaco, conforme apresentado na **Figura17**.

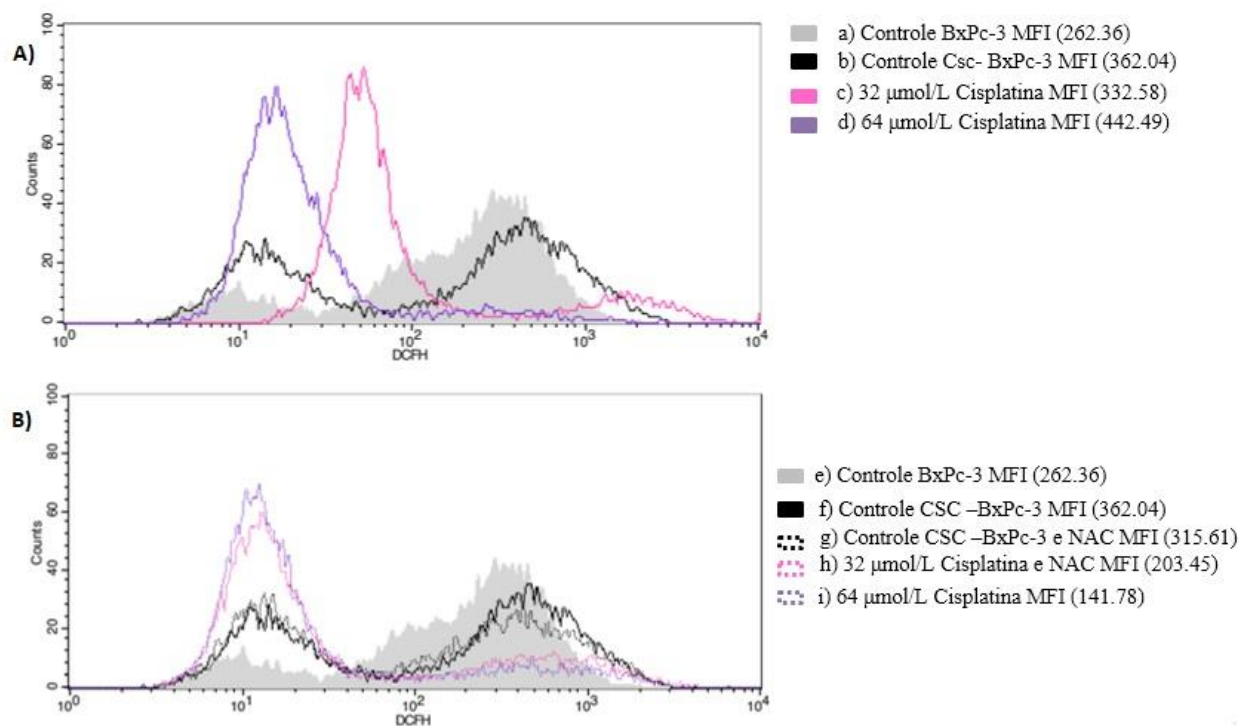


Figura 17: Análise da produção de ROS em células CSC - *Bxpc-3* por citometria de fluxo após tratamento com cisplatina por 24 horas. (A) Células não tratadas Bxpc-3; (B) Células não tratadas CSC- Bxpc-3; (C) Células tratadas com 32 $\mu\text{mol/L}$ de cisplatina; (D) Células tratadas com 64 $\mu\text{mol/L}$ de cisplatina; (E) Células não tratadas Bxpc-3; (F) Células não tratadas CSC- Bxpc-3; (G) Células tratadas com NAC; (H) Células tratadas com 32 $\mu\text{mol/L}$ de Cisplatina e NAC e (I) Células tratadas com $\mu\text{mol/L}$ de Cisplatina e NAC.

Nesta segunda análise, após 24 horas de tratamento, como mostrado na **Figura 17A**, as CSC-BxPC-3 tratadas com cisplatina nas concentrações de 32 $\mu\text{mol/L}$ e 64 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram MFI de 332,58 e 442,49, respectivamente. Já a cisplatina (**Figura 17B**) quando associada ao NAC apresentou MFI de 203,45 para o tratado com 32 $\mu\text{mol/L}$ e MFI de 141,78 para a concentração de 64 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados obtidos demonstram que a cisplatina mantém um padrão consistente de comportamento em diferentes concentrações na linhagem CSC-Bxpc-3. No entanto, quando administrada em conjunto com o NAC, observa-se uma interferência significativa na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse achado sugere que o NAC exerce um efeito modulador sobre o estresse oxidativo induzido pela cisplatina, possivelmente atenuando seu impacto citotóxico. Além disso, os dados reforçam que, mesmo em células-tronco cancerígenas, a cisplatina é capaz de promover um aumento na produção de ROS, corroborando seu papel na indução do estresse oxidativo como um dos mecanismos centrais de sua atividade antitumoral.

6.3 Avaliação do processo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)

A apoptose é um processo altamente regulado, caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas específicas, como encolhimento celular, formação de protrusões na membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e modificações na superfície celular. Diversas metodologias foram desenvolvidas para avaliar a fragmentação do DNA, um evento tardio nesse processo. No entanto, a identificação precoce da apoptose é essencial para a compreensão dos mecanismos iniciais que desencadeiam essa via, permitindo uma análise mais precisa dos eventos moleculares envolvidos na regulação da morte celular programada (Crowley, L, et al, 2016). Desta forma este ensaio, representado na **Figura 18**, baseia-se no princípio de que a fosfatidilserina (PS), um fosfolípido normalmente restrito a face citoplasmática da membrana plasmática, sofre translocação para a superfície celular durante a apoptose. Já o iodeto de propídio tem um papel fundamental na diferenciação entre células apoptóticas e células necrosadas ou em necroptose.

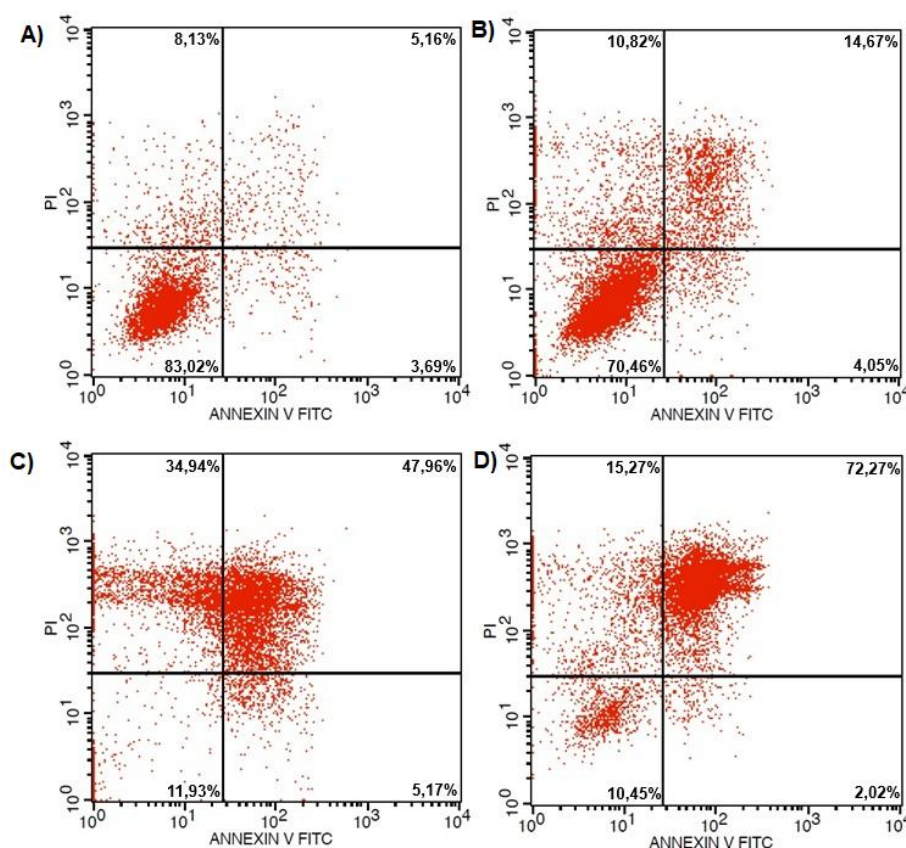


Figura18 Análise do tipo de morte induzido pelo composto de cobre H04 através da exposição de fosfatidilserina (PS) e marcação com anexina V e iodeto de propídio em células da linhagem CSC - BxPc-3. (A) Células não tratadas; (B) Células tratadas com 2,4 $\mu\text{mol/L}$ de H04; (C) Células tratadas com 4,8 $\mu\text{mol/L}$ de H04; (D) Células tratadas com 32 $\mu\text{mol/L}$ de cisplatina. (n=3).

Os dados obtidos por meio da marcação com anexina V e PI indicam que o composto **H04** induz um efeito apoptótico significativo nas células-tronco cancerígenas CSC-BxPc-3. Conforme demonstrado no histograma (**Figura 18B e Figura 18C**), as células foram tratadas com concentrações de 2,4 $\mu\text{mol/L}$ e 4,8 $\mu\text{mol/L}$ do composto de cobre, além de 32 $\mu\text{mol/L}$ de cisplatina. Na concentração de 2,4 $\mu\text{mol/L}$, (**Figura 18B**) 14,67% das células apresentaram exposição de fosfatidilserina, evidenciada pela ligação à anexina V. Já na concentração de 4,8 $\mu\text{mol/L}$, (**Figura 18C**) 47,96% das células exibiram dupla marcação por anexina e PI, indicando necrose secundária. No caso da cisplatina, observou-se que, na concentração de 32 $\mu\text{mol/L}$ (**Figura 18D**), 72,27% das células apresentaram um padrão de marcação semelhante ao do composto de cobre, porém com uma proporção significativamente maior. Em concentrações maiores, observa-se a dupla marcação anexina/PI. Esse fenômeno é conhecido como necrose secundária. Por se tratar de um ensaio *in vitro*, a ausência de fagócitos em paralelo com maior atividade citotóxica do composto, induz uma necrose secundária.

A exposição da fosfatidilserina na membrana celular, evidenciada pela marcação positiva para anexina V, confirma a ativação do programa apoptótico nessas células, um achado consistente com a literatura sobre mecanismos de morte celular induzido por complexos metálicos (Elmore, 2007). A observação de um aumento na dupla marcação anexina V⁺/PI⁺ em concentrações mais elevadas do composto sugere a ocorrência de necrose secundária, um fenômeno que pode ser atribuído à progressão do processo apoptótico sem a remoção eficiente das células mortas. Essa progressão ocorre especialmente em sistemas *in vitro*, onde a ausência de fagócitos impede a depuração das células apoptóticas, permitindo que a integridade da membrana celular seja comprometida e levando à captação de PI (Wlodkowic et al., 2011).

Além disso, o aumento da atividade citotóxica do composto de cobre pode estar potencializando o estresse oxidativo celular, acelerando a perda da integridade da membrana plasmática e favorecendo a transição da apoptose para necrose secundária. Estudos anteriores indicam que complexos metálicos, especialmente aqueles à base de cobre, podem gerar espécies reativas de oxigênio amplificando os danos celulares e contribuindo para a indução de apoptose seguida de necrose em células tumorais (Santini et al., 2014).

Portanto, os resultados reforçam o potencial do composto **H04** como um agente citotóxico eficiente contra células-tronco cancerígenas. No entanto, para uma

caracterização mais detalhada de seus mecanismos de ação, seria interessante a realização de ensaios complementares, como a avaliação da ativação de caspases e a análise do potencial de membrana mitocondrial. Isso permitiria uma compreensão mais aprofundada sobre os eventos celulares desencadeados pelo composto.

Conclusões gerais

- Nas análises gerais com tipos variados de linhagens celulares tumorais os compostos de cobre (H04) e o ligante (H03) evidenciaram efeitos citotóxicos promissores, apresentando em sua maioria valores de IC_{50} menores que $3,0 \mu\text{mol/L}$, sendo o composto H04, mais ativo na maioria das linhagens;
- O composto de platina (H18) não demonstrou efeitos citotóxicos promissores se comparados com a cisplatina, fármaco padrão e nem com o composto H04, não sendo assim utilizado nas análises seguintes;
- Na realização do índice de Seletividade (IS), o composto H04 em relação às células PBMC, indicou uma seletividade marcante para células tumorais pancreáticas, o que reforçou seu potencial como agente quimioterápico promissor para o tratamento do câncer de pâncreas;
- O composto de cobre H04 demonstrou capacidade de induzir fragmentação do DNA em concentrações relativamente baixas, especificamente em $2,4 \mu\text{mol/L}$ e $4,8 \mu\text{mol/L}$, sugerindo uma interação significativa com um dos eventos-chave associados à apoptose. Esses achados indicam que o composto pode ativar vias apoptóticas dependentes de dano ao DNA, reforçando seu potencial como agente antitumoral;
- Com ensaio de Anexina V e Iodeto de Propídeo, o composto de cobre (H04) também induziu a exposição de fosfatidilserina e o aumento da permeabilidade da membrana celular, características associadas à indução de morte celular;
- A pesquisa investigou os mecanismos de apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidos pelo composto de cobre H04 em células BxPC-3. Os resultados indicaram que H04 promove a despolarização mitocondrial e aumento da geração de ROS, sugerindo ativação da via

intrínseca de apoptose e envolvimento do estresse oxidativo. Em concentrações elevadas, o composto demonstrou um efeito bifásico, inicialmente agindo como antioxidante e posteriormente induzindo um efeito pró-oxidante, o que pode refletir uma dinâmica redox dependente da concentração e do tempo de exposição. Esses achados destacam a complexidade dos mecanismos de ação do H04, com implicações para o entendimento dos efeitos redox no metabolismo celular.

- As células CSC-BxPC-3 expressaram marcadores clássicos de células-tronco cancerígenas (CD24, CD44, CD133 e EpCAM), mas apresentaram perda progressiva desse fenótipo com as repicagens, sendo recomendado o uso até a segunda passagem (P2) para análises mais representativas. Comparadas à linhagem parental, as CSC-BxPC-3 mostraram maior sensibilidade ao composto de cobre H04, com indução de apoptose em concentrações menores que as da cisplatina, sugerindo o potencial do H04 como agente seletivo contra células-tronco cancerígenas
- O tratamento com o composto de cobre resultou em aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), detectado pelo DCFH-DA e parcialmente revertido pelo antioxidante N-acetilcisteína, indicando que o estresse oxidativo contribui diretamente para a citotoxicidade do composto.

CAPÍTULO III – Ensaios pré-clínicos de células-tronco cancerígenas direcionadas por complexos de coordenação baseados em metais: uma revisão sistemática

1. Justificativa

A realização desta análise justifica-se pelas evidências crescentes de que as células-tronco cancerígenas (CTCs) constituem uma subpopulação essencial dentro do microambiente tumoral, desempenhando um papel central na manutenção da heterogeneidade celular, na progressão tumoral, na resistência terapêutica e na recidiva do câncer. A compreensão mais aprofundada das interações entre essas células e o microambiente tumoral pode revelar alvos terapêuticos mais específicos e eficazes. Nesse contexto, esta pesquisa propõe uma abordagem comparativa voltada à avaliação do potencial citotóxico de compostos de coordenação metálicos sobre as CTCs, com o objetivo de investigar sua capacidade de eliminar seletivamente essa subpopulação celular e, assim, contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e duradouras no combate ao câncer.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Sistematizar e organizar artigos científicos por meio da metodologia Prisma, a fim de analisar ensaios in vitro com células tronco tumorais tratadas com complexos metálicos.

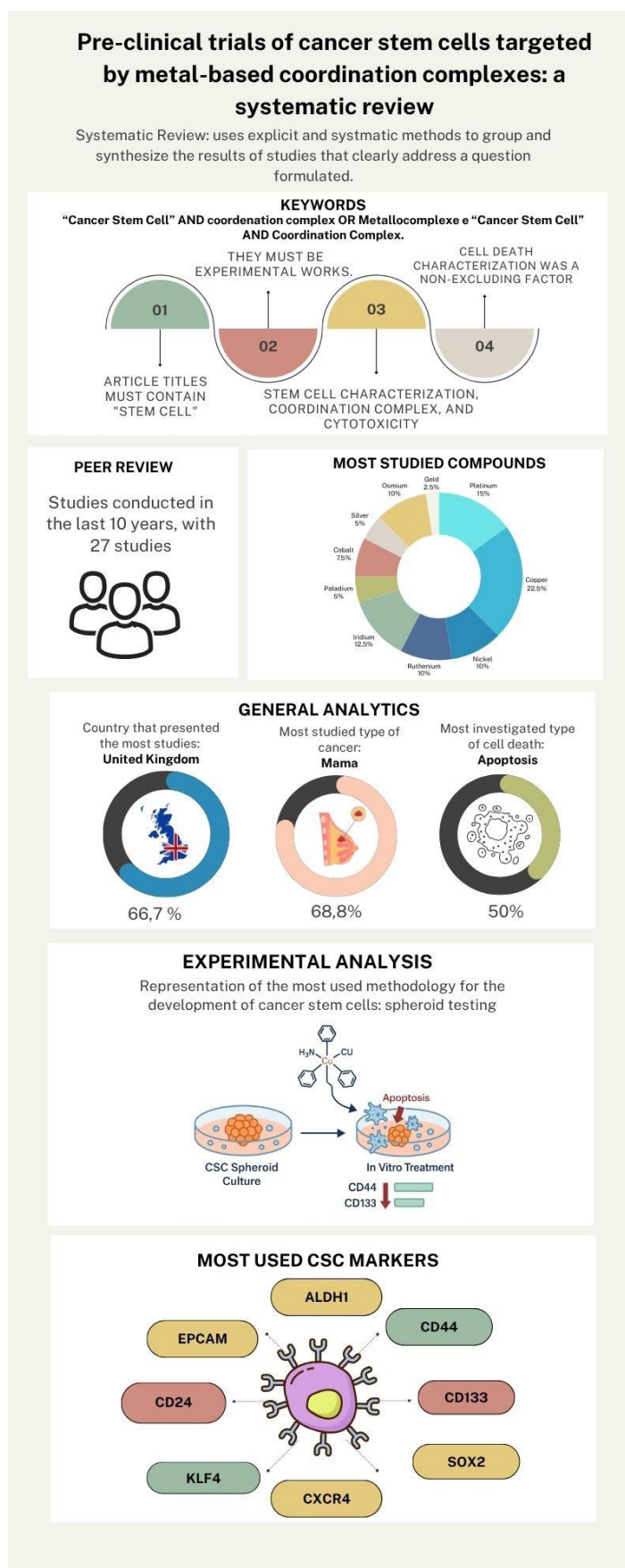
2.2 Objetivos Específicos:

- 1- Utilizar a metodologia Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) para seleção dos artigos para análise
- 2- Compreender o papel das células tronco tumorais no microambiente tumoral
- 3- Analisar o potencial dos compostos metálicos em células troncos tumorais e
- 4- Analisar os marcadores de células troncos tumorais mais comumente utilizados para os estudos.

3. Resultados e Discussões

A organização de dados agrupados a partir da metodologia PRISMA deu origem a um artigo que revisão sistemática que está exemplificado no **APÊNDICE 1 e II** deste trabalho.

4. Resumo gráfico da revisão sistemática



8 Referências Bibliográficas

1. ALMAGDE, L. A.; TANG, X.; MIER, J. S.; et al. Inflammatory microenvironment and the failure of programmed cell death machinery in metastatic cancer. *Cancer Research*, v. 70, n. 12, p. 4927–4939, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0346>.
2. ALMEIDA, R. A. Recent advances in the design of copper complexes for anticancer therapy. *Bioorganics & Medicinal Chemistry*, v. 31, p. 73–81, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.115020>.
3. ALONSO-CURBELO, D.; HO, Y. J.; BURDZIAK, C.; et al. Metabolic reprogramming and its role in the metastatic process of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 21, p. 259–273, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00411-1>.
4. BAKHOUM, S. F. et al. DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation. *Cancer Discovery*, v. 4, p. 128, 2014.
5. BASLER, T.; et al. Metal complexes in cancer therapy: Role of coordination with the central metal ion. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 216, p. 111289, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111289>
6. BERGAMASCHI, A. et al. Assinatura da matriz extracelular identifica subgrupos de câncer de mama com diferentes resultados clínicos. *Journal of Pathology*, v. 214, p. 357–367, 2008.
7. BEZERRA, A.C.M. Análises biológicas, in vitro, do composto de coordenação de cobre na atividade antineoplásica. Orientação: Milton Masahiko Kanashiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2021. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.
8. BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial regulation of apoptosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 12, n. 7, p. a036508, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036508>.
9. BORGES, F. V. Avaliação in vitro da atividade antitumoral de compostos de coordenação de ferro. Franz Viana Borges, orientação: Milton Masahiko Kanashiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2008, p. 104. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.
10. Bunger, S., et al. (2012). As linhas celulares de carcinoma pancreático refletem a frequência e a variabilidade dos marcadores de células-tronco do câncer em tecido clínico. *European Surgical Research*, 49 (2), 88–98
11. CALLERY, M. P. et al. Avaliação pré-tratamento de câncer pancreático ressecável e ressecável limítrofe: consenso de especialistas. *Annals of Surgical Oncology*, v. 16, p. 1727–1733, 2009. DOI: 10.1245/s10434-009-0408-6. PMID: 19396496.
12. CÂNCER DE PÂNCREAS: avanços cirúrgicos e desafios na prática atual – uma revisão integrativa. *Ciências da Saúde*, v. 29, ed. 141, 10 dez. 2024.
13. CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. The apoptosome and caspase activation: Implications for the regulation of apoptosis and cancer therapy. *Oncogene*, v. 39, p. 5647–5655, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01423-7>
14. CAVALLI, Florence MG et al. Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups. *Cancer cell*, v. 31, n. 6, p. 737-754. e6, 2017.

15. CHANG, Wai Hoong; LAI, Alvina G. Aberrations in Notch-Hedgehog signalling reveal cancer stem cells harbouring conserved oncogenic properties associated with hypoxia and immunoevasion. **British journal of cancer**, v. 121, n. 8, p. 666-678, 2019.
16. CHARI, S. T. et al. Consórcio de Iniciativa de Detecção Precoce. Iniciativa de Detecção Precoce: um ensaio clínico avaliado de triagem baseado em algoritmos em pacientes com hiperglicemia e diabetes de início recente para detecção precoce de adenocarcinoma ductal pancreático. *Contemporary Clinical Trials*, v. 113, p. 106659, 2022. DOI: 10.1016/j.cct.2021.106659. PMID: 34954100.
17. CHEN, X.; YU, C.; KANG, R.; TANG, D. Metabolismo do ferro na ferroptose. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 590226, 2020.
18. CHEN, X.; YU, C.; KANG, R.; TANG, D. The role of iron metabolism and ROS in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 580343, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580343>
19. Chu, X., Tian, W., Ning, J. et al. Células-tronco cancerígenas: avanços no conhecimento e implicações para a terapia do câncer. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 170 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01851-y>
20. CIVETTA, L.; CIVETTA, M. Genes envolvidos na regulação do ciclo celular e apoptose no câncer. *Journal of Cellular Biology*, v. 22, n. 3, p. 131–140, 2011.
21. COSTA, L. A.; et al. Dados sobre internações e óbitos por adenocarcinoma pancreático no Brasil: Análise de abril de 2023 a abril de 2024. *Revista Brasileira de Oncologia*, v. 46, p. 112–118, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbo.2024.01.011>
22. DARDING, M.; MEIER, P. IAPs: guardiões de RIPK1. *Cell Death & Differentiation*, v. 19, n. 1, p. 58–66, 2012.
23. DARLING, S. et al. Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. *Biochemical Society Transactions*, v. 45, p. 1125–1136, 2017.
24. DEL CHIARO, Marco et al. Advances in the management of pancreatic cancer. *BMJ*, v. 383, 2023.
25. DI CARLO, C.; BRANDI, J.; CECCONI, D. Pancreatic cancer stem cells: Perspectives on potential therapeutic approaches of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Stem Cells*, v. 10, n. 11, p. 172–182, 2018.
26. DING, Xi-wei; WU, Jun-hua; JIANG, Chun-ping. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. **Life sciences**, v. 86, n. 17-18, p. 631-637, 2010.
27. DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of non-apoptotic cell death. *Cell*, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.
28. ELIAS, E. E.; LYONS, B.; MURUVE, D. A. Piroptose: Mecanismos e implicações na morte celular. *Cell Death & Differentiation*, v. 30, p. 513–524, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01020-w>
29. ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, p. 495–516, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
30. ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.

31. FEITELSON, M. A. et al. Proliferação sustentada no câncer: mecanismos e novos alvos terapêuticos. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35 Supl., p. S25–S54, 2015.
32. FERLAY, J. et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 29 abr. 2025.
33. FRANÇA, L. C. K. et al. Avaliação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes e de parâmetros de estresse oxidativo em células de linhagem de astroglioma expostas a elevadas concentrações de cobre. 2023. [Detalhes adicionais como periódico, volume, páginas ou instituição seriam necessários para uma formatação completa.]
34. GARCÍA, A. M. *Mecanismos de apoptose e sua importância no desenvolvimento celular e homeostase*. *Revista de Biologia Celular*, v. 45, n. 2, p. 150–165, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biolcell.2012.02.008>.
35. Gisina, A., Kim, Y., Yarygin, K. & Lupatov, A. O CD133 pode ser considerado um biomarcador prognóstico em oncologia: prós e contras. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 17398 (2023)
36. GLAVIANO, Antonino et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular cancer*, v. 22, n. 1, p. 138, 2023.
37. GONÇALVES, M. R.; SOUSA, T. L.; ALMEIDA, F. P. *Mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer pancreático*. *Revista Brasileira de Oncologia*, v. 20, n. 2, p. 101–110, 2024.
38. GONCZY, P. Centrosomes and cancer: revisiting a long-standing relationship. *Nature Reviews Cancer*, v. 15, p. 639–652, 2015.
39. GOUTIOU, M.; et al. Mitochondrial integrity and ATP production: Implications for cellular viability under oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 24, p. 1011–1022, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.14803>.
40. [GLOBAL CANCER OBSERVATORY]. *Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 29 abr. 2025
41. HANAHAN, D. Marcas do câncer: novas dimensões. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
42. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. As características do câncer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
43. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Marcas do câncer: a próxima geração. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
44. Hermann, PC, et al. (2007). Populações distintas de células-tronco cancerígenas determinam o crescimento tumoral e a atividade metastática no câncer pancreático humano. *Cell Stem Cell*, **1** (3), 313–323.
45. HIDALGO, M. Copper-based complexes in cancer therapy: A review of their efficacy and mechanisms of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 187, p. 111994, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.111994>
46. HOQUE, Saminur et al. Cancer stem cells (CSCs): key player of radiotherapy resistance and its clinical significance. *Biomarkers*, v. 28, n. 2, p. 139-151, 2023.

47. HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN. Câncer de pâncreas. 2025. Disponível em: <https://www.einstein.br/n/glossario-de-saude/cancer-de-pancreas>. Acesso em: 27 abr. 2025.
48. HSIEH, Mei Jen et al. Inactivation of APC Induces CD34 upregulation to promote epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell traits in pancreatic cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4473, 2020.
49. Huang, L., Guo, Z., Wang, F., Fu, L., & Wang, Y. (2021). Muta  o KRAS: De indrog  vel a drogado na terapia do câncer. *Frontiers in Oncology**, 11, 694878. [doi:10.3389/fonc.2021.694878](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.694878).
50. HURVITZ, S. A. et al. Respostas patológicas e moleculares ao trastuzumabe neoadjuvante e/ou lapatinibe em um ensaio clínico randomizado de fase II em câncer de mama HER2-positivo (TRIO-US B07). *Nature Communications*, v. 11, p. 5824, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19494-2>.
51. HUYGHE, J.; PRIEM, D.; BERTRAND, M. J. M. Pontos de verifica  o de morte celular na via TNF. *Trends in Immunology*, v. 44, n. 8, p. 628–643, 2023.
52. HUYGHE, J.; PRIEM, D.; BERTRAND, M. J. M. TNF receptor signaling in inflammation, survival, and cell death: Pathophysiological roles and therapeutic potential. *Journal of Inflammation*, v. 21, n. 1, p. 39, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12950-024-00301-w>.
53. Ikenaga, N., et al. (2010). Caracteriza  o da expressão de CD24 em neoplasias mucinosas papilares intraductais e carcinoma ductal do pâncreas. *Patologia Humana*, 41 (10), 1466–1474.
54. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 29 abr. 2025.
55. INSTITUTO VENCER O CÂNCER. Tipos de tratamento. 2024. Disponível em: <https://vencerocancer.org.br/o-que-e-cancer/tipos-de-tratamento/>. Acesso em: 28 abr. 2025.
56. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: IARC, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 29 abr. 2025.
57. ISHIWATA, T. et al. Células-tronco do c  ncer pancreático: Características e métodos de detec  o. *Pathology Oncology Research*, v. 24, n. 4, p. 797–805, 2018.
58. JAMASBI, E. et al. O ciclo celular, o desenvolvimento do c  ncer e a terapia. *Molecular Biology Reports*, v. 49, p. 10875–10883, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07788-1>.
59. JARIYAL, Heena et al. Advancements in cancer stem cell isolation and characterization. **Stem cell reviews and reports**, v. 15, p. 755-773, 2019.
60. JIANGBING, Z.; ZHANG, Y. Cancer stem cells: Models, mechanisms and implications for improved treatment. *Cell Cycle*, v. 7, n. 10, p. 1360–1370, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4161/cc.7.10.5953>.
61. JOHNSON, K. A. Mechanisms of mitochondrial outer membrane permeabilization in apoptosis. *Journal of Cell Biology*, v. 234, n. 5, p. 571–585, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.2024.03>.

62. JOHNSON, L.; SAROSIEK, K. A. Papel da apoptose intrínseca nos resultados de saúde da exposição ambiental. *Trends in Molecular Medicine*, v. 30, n. 1, p. 56–73, 2024.
63. JOST, P. J.; VUCIC, D. Regulação da morte celular e imunidade por XIAP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 12, n. 8, a036426, 2020.
64. KAHLERT, Christoph et al. Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. **BMC cancer**, v. 11, p. 1-10, 2011.
65. KALONI, D. et al. Família de proteínas BCL-2: alvos atraentes para terapia do câncer. *Apoptosis*, v. 28, n. 1–2, p. 20–38, 2023.
66. KALONI, D.; DIEPSTRATEN, S. T.; STRASSER, A.; KELLY, G. L. The role of BH3-only proteins in apoptosis regulation and cancer. *Cell Death & Differentiation*, v. 30, p. 33–47, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00998-z>
67. KALYANARAMAN, B. Mitochondria and ROS in cancer: Mechanisms of action and therapeutic strategies. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 174, p. 124–133, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.010>.
68. KANG, Z.; et al. Copper compounds induce apoptosis and autophagy through oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction, leading to loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). *Cell Death & Disease*, v. 10, n. 4, p. 219, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1453-9>
69. KASTRINOS, F. et al. Risco de câncer de pâncreas em famílias com síndrome de Lynch. *JAMA*, v. 302, p. 1790–1795, 2009. DOI: 10.1001/jama.2009.1529. PMID: 19861671.
70. KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. O amadurecimento da autofagia mediada por chaperonas. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 6, p. 365–381, 2018.
71. KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>. Acesso em: 29 abr. 2025.
72. KIM, S. S. et al. Avaliação retrospectiva da resposta ao tratamento em pacientes com câncer pancreático não metastático usando TC e CA 19-9. *Radiology*, v. 303, p. 548–556, 2022. DOI: 10.1148/radiol.212236. PMID: 35258374.
73. KIMURA, T. et al. Carcinoma de células acinares pancreáticas com componente de adenocarcinoma ductal: relato de caso e análise da histogênese do tumor. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 18, p. 238, 2020. DOI: 10.1186/s12957-020-02014-3.
74. KIRKEGÅRD, J.; MORTENSEN, F. V.; CRONIN-FENTON, D. Pancreatite crônica e risco de câncer de pâncreas: uma revisão sistemática e meta-análise. *American Journal of Gastroenterology*, v. 112, p. 1366–1372, 2017. DOI: 10.1038/ajg.2017.218. PMID: 28762376.
75. KLEIN, A. P. et al. Risco prospectivo de câncer de pâncreas em famílias com câncer de pâncreas familiar. *Cancer Research*, v. 64, p. 2634–2638, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3823. PMID: 15059921.
76. KOLBRINK, B.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, F. A.; MURPHY, J. M.; KRAUTWALD, S. Necroptosis: Mechanisms and therapeutic potential. *Cell*

- Death & Differentiation*, v. 30, p. 453–463, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01002-w>.
77. KOLBRINK, B.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, F. A.; MURPHY, J. M.; KRAUTWALD, S. Papel da necroptose na saúde e doença renal. *Nature Reviews Nephrology*, v. 19, n. 5, p. 300–314, 2023.
 78. LAKHANI, S. A.; MASUD, A.; KUIDA, K.; et al. The role of IAPs in apoptosis and cancer: Inhibitor of apoptosis proteins and their role in caspase inhibition. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 269–276, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc1841>
 79. LEE, Su Yeon et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. **Molecular cancer**, v. 16, p. 1-25, 2017.
 80. LEE, Y. J.; et al. The dual role of N-acetylcysteine in cancer therapy: Antioxidant in the early phase and pro-oxidant after prolonged exposure. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 67, p. 181–188, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1477-2>.
 81. LI, J. et al. A inibição combinada de cinases aurora e Bcl-xL induz apoptose por meio de proteínas selecionadas somente BH3. *Journal of Biological Chemistry*, v. 299, n. 2, p. 102875, 2023.
 82. LI, J. et al. Ferroptose: passado, presente e futuro. *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 2, p. 88, 2020.
 83. LI, J.; CHEN, C. H.; O'NEILL, K. L.; et al. Apoptotic signaling and cancer therapies targeting the BCL-2 family. *Cancer Research*, v. 83, n. 2, p. 221–235, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2854>
 84. LIU, K. et al. O papel do CDC25C na regulação do ciclo celular e na terapia clínica do câncer: uma revisão sistemática. *Cancer Cell International*, v. 20, p. 213, 2020.
 85. LIU, S. et al. Autofagia: regulador da morte celular. *Cell Death & Disease*, v. 14, n. 10, p. 648, 2023.
 86. LIU, X. et al. A gasdermina D ativada pelo inflamossomo causa piroptose pela formação de poros de membrana. *Nature*, v. 535, n. 7610, p. 153–158, 2016.
 87. LOCKHEAD, S. et al. A aparente necessidade de síntese proteica durante a fase G2 se deve à ativação do ponto de verificação. *Cell Reports*, v. 32, p. 107901, 2020.
 88. LUGO, A. et al. Alto risco excessivo de câncer de pâncreas para baixa frequência e duração do tabagismo: uma revisão abrangente e meta-análise. *European Journal of Cancer*, v. 104, p. 117–126, 2018. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.09.007. PMID: 30347287.
 89. LUSTOSA, Amanda et al. Imunoterapia no tratamento do câncer: avanços recentes e futuras direções na oncologia. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 10, n. 3, p. 813–820, 2024. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/13211>. Acesso em: 28 abr. 2025.
 90. MACIEL, L.L.F. Estudo in vitro das alterações morfo-funcionais de células de câncer de pulmão, tratadas com composto de coordenação de cobre. Orientação: Milton Masahiko Kanashiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2016. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia,

- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.
91. MAHENDIRAN, D.; et al. Copper(I) phosphine complexes as cytotoxic and antiangiogenic agents: In vivo antitumor activity and reduced toxicity. *Inorganic Chemistry*, v. 57, p. 8763–8773, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01601>.
 92. MAISONNEUVE, P.; LOWENFELS, A. B. *Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies*. International Journal of Epidemiology, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 186–198, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ije/dyu240>. Acesso em: 29 abr. 2025.
 93. MANDAL, R. Necroptosis and its regulation: Mechanisms and implications in disease. *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 6, p. 444, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02924-1>.
 94. MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Revisão anual de biologia do câncer. Annual Review of Cancer Biology, 2020. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio. [Link incompleto, favor revisar].
 95. MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. M. Controle do ciclo celular no câncer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, p. 74–88, 2022.
 96. MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, v. 9, n. 4, p. 217–222, 2019.
 97. MAXWELL, J. T. Chemotherapy and its impact on normal and cancerous cells. *Cancer Research Journal*, v. 80, n. 6, p. 1017–1026, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.2926>.
 98. MENDOZA, E. N.; CIRIOLI, M. R.; CICCARONE, F. Genomic instability and tumor aggressiveness: Mechanisms and implications for cancer therapy. *Cancer Research and Therapeutics*, v. 45, p. 92–104, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cancerres.2025.02.004>.
 99. MIAO, R. et al. A permeabilização de Gasdermin D das membranas mitocondriais interna e externa acelera e aumenta a piroptose. *Immunity*, v. 56, n. 11, p. 2523–2541.e8, 2023.
 100. MISHRA, S. et al. Programmed necrosis and autophagic cell death in cancer: Implications for therapy. *Cell Death & Disease*, v. 9, p. 121, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0177-5>
 101. MITCHELL, Kelly et al. WDR5 representa um alvo terapeuticamente explorável para células-tronco cancerígenas em glioblastoma. **Genes & Development**, v. 37, n. 3-4, p. 86-102, 2023.
 102. MONTAIGNE, David; BUTRUILLE, Laura; STAELS, Bart. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 12, p. 809-823, 2021.
 103. MORCELLI, S. R. et al. Synthesis, characterization and antitumoral activity of new cobalt(II) complexes: Effect of the ligand isomerism on the biological activity of the complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 161, p. 73–82, 2016.
 104. MOREIRA, R. O. et al. Modulating the antitumoral activity by the design of new platinum(II) compounds: Synthesis, characterization, DFT,

- ultrastructure and mechanistic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 194, p. 200–213, 2019.
105. MURILLO, M. I.; GAIDDON, C.; LE LAGADEC, R. Direcionamento do equilíbrio redox intracelular por complexos metálicos para terapia anticâncer. *Frontiers in Chemistry*, v. 10, p. 967337, 2022.
 106. Naba, A. et al. O matrisoma: definição *in silico* e caracterização *in vivo* por proteômica de matrizes extracelulares normais e tumorais. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.014647 (2012).
 107. NAGARAJU, G. P. et al. Compreendendo os mecanismos moleculares que regulam a formação de células-tronco do câncer pancreático, a *stemness* e a quimiorresistência: uma breve visão geral. In: *Seminars in Cancer Biology*. Amsterdam: Academic Press, 2023. p. 67–80.
 108. NAGATA, S.; SAKURAGI, T.; SEGAWA, K. Regulation of exposure of phosphatidylserine on apoptotic cells and its significance in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, p. 101–112, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0227-0>
 109. NAM, H. J.; NAYLOR, R.; VAN DEURSEN, J. M. Centrosome dynamics as a source of chromosomal instability. *Trends in Cell Biology*, v. 25, p. 65–73, 2015.
 110. NOMURA, A. et al. CD133 initiates tumors, induces epithelial-mesenchymal transition and aumenta metastasis in pancreatic cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 8313–8322, 2015. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3228>.
 111. OBSERVATÓRIO GLOBAL DO CÂNCER. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 17 mar. 2021.
 112. Oren, M., & Rotter, V. (2019). Introdução: O supressor tumoral p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(3), a036053. doi:10.1101/cshperspect.a036053
 113. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Câncer. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 29 abr. 2025.
 114. ORTEGA, E. et al. Targeting translation: a promising strategy for anticancer metallodrugs. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 446, p. 214129, 2021.
 115. PANAGIOTOU, E. et al. CD24: A novel target for cancer immunotherapy. *Journal of Personalized Medicine*, v. 12, n. 8, p. 1235, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm12081235>.
 116. PARASCANDALO, A.; LAUKKANEN, M. O. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production in cancer cells: Mechanisms and therapeutic implications. *Journal of Cell Science and Therapy*, v. 9, p. 150–160, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000412>
 117. PARK, H. et al. Células de câncer pancreático primário e metastático apresentam potenciais migratórios diferenciais. *Pancreas*, v. 49, n. 1, p. 128–134, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001459>.
 118. PARVEEN, S.; et al. Advances in metal-based therapeutics for cancer treatment. *Biometals*, v. 32, p. 727–740, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00193-x>.

119. PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptose e seu papel na inflamação. *Nature*, v. 517, n. 7534, p. 311–320, 2015.
120. PATIL, K. et al. A plasticidade das células-tronco do câncer pancreático: implicações na resistência terapêutica. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 40, p. 691–720, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09979-x>.
121. PHI, L. T. H. et al. Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells International*, v. 2018, Article ID 5416923, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>.
122. POON, R. Y. C. Controle do ciclo celular: um sistema de osciladores interligados. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ), v. 2329, p. 1–18, 2021.
123. POON, R. Y. C. Controle do ciclo celular: um sistema de osciladores interligados. *Methods in Molecular Biology*, v. 2329, p. 1–18, 2021.
124. POWERS, S. K.; NELSON, W. B.; HUDSON, M. B. The role of mitochondria in cell death: Implications for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, v. 21, p. 92–104, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.02.001>
125. QIAN, Z.; SHEN'ER, C.; et al. Mechanisms of apoptosis evasion in tumor cells: a comprehensive review. *Cancer Cell Biology*, v. 20, p. 1–15, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/ccb.2024>.
126. RABINOVICH, I. et al. Tumores de mama que superexpressam HER2 estão associados ao fenótipo de células-tronco cancerígenas CD44+/CD24-. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 54, p. 310–318, 2018.
127. REBOURS, V. et al. Risco de adenocarcinoma pancreático em pacientes com pancreatite hereditária: uma série nacional exaustiva. *American Journal of Gastroenterology*, v. 103, p. 111–119, 2008. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01597.x. PMID: 18184119.
128. REYA, T. et al. Células-tronco, câncer e células-tronco cancerígenas. *Nature*, v. 414, n. 6859, p. 105–111, 2001.
129. RIM, Ellen Youngsoo; CLEVERS, Hans; NUSSE, Roel. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators. **Annual review of biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 571-598, 2022.
130. RODRIGUES, C. J. S. et al. Marcadores de células-tronco cancerígenas associados ao desenvolvimento e fenótipo agressivo no câncer de pâncreas. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 5, ed. 10, v. 12, p. 102–122, out. 2020. DOI: 10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/saude/cancer-de-pancreas. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/cancer-de-pancreas>. Acesso em: 29 abr. 2025.
131. RODRIGUEZ, D. A. et al. A interação entre RIPK1 e FADD controla a letalidade e a inflamação perinatais. *Cell Reports*, v. 43, n. 6, p. 114335, 2024.
132. Sabapathy, K., & Lane, DP (2018). Targeting terapêutico de p53: Todos os mutantes são iguais, mas alguns mutantes são mais iguais do que outros. **Nature Reviews Oncologia Clínica**, 15(1), 13-30. [doi:10.1038/nrclinonc.2017.151]
133. SAKAI, Yasuhiro; HONG, Seung-Mo; AN, Soyeon; et al. CD133 expression in well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: a potential

- predictor of progressive clinical courses. *Human Pathology*, v. 61, p. 148-157, 2017. ISSN 0046-8177. DOI: 10.1016/j.humpath.2016.10.022.
134. SANGEETHA, S.; et al. Synthesis and characterization of copper(II) complexes with 2-methyl-8-hydroxyquinoline and tri/diimine co-ligands: Anticancer activity and mechanistic insights. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 122, p. 108261, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108261>.
 135. SANTINI, C. et al. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chemical Reviews*, v. 114, n. 1, p. 815–862, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr400135x>.
 136. SANTOS, A. F. et al. Análise do efeito do cobre em células de câncer de pâncreas: relação entre complexos metálicos e indução de apoptose. *Pancreas*, v. 49, p. 653–661, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001702>.
 137. SEVER, AIM; ALDERSON, T. R.; RENNELLA, E.; et al. Apoptotic caspase activation and the apoptosome in cell death signaling. *Cell Death & Differentiation*, v. 30, n. 5, p. 929–943, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-023-00734-4>.
 138. SHAHAR, N.; LARISCH, S. Caspase-3 and -7 activation in programmed cell death: Mechanisms and implications for cancer therapies. *Cellular Death & Disease*, v. 11, p. 359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2550-3>.
 139. SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, K.; et al. Inflammation drives caspase-11 activation of GSDMD and pyroptosis. *Nature*, v. 526, p. 66–71, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature15514>.
 140. SILVA, M.B. Avaliação da atividade antineoplásicas in vitro e in vivo de complexos de cobre II com ligantes n,o-doadores. 2020. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.
 141. SIQUEIRA, P.R. Avaliação in vitro da atividade antineoplásica dos compostos de coordenação de cobalto e de ferro. Orientação: Milton Masahiko Kanashiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2020. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós- Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.
 142. TANG, D. et al. Ferroptose: mecanismos moleculares e implicações para a saúde. *Cell Research*, v. 31, n. 2, p. 107–125, 2021.
 143. TANG, D.; LIU, W.; WANG, M.; et al. The role of FADD and caspase 8 in death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, p. 6827–6837, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010443>.
 144. TSVETKOV, P.; COY, S.; PETROVA, B.; et al. Copper induces cell death through cuproptosis. *Nature*, v. 606, p. 774–778, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04839-2>.
 145. TSYMBAL, S. A. et al. Copper-Containing Nanoparticles and Organic Complexes: Metal Reduction Triggers Rapid Cell Death via Oxidative Burst. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 20, p. 11065, 2021.
 146. VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, v. 10, n. 8, p. 789–799, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1087>.
 147. WALTER, F. M.; SHARP, D.; SINGER, M.; HAMILTON, W. Symptoms and diagnostic time in cancer patients: a cross-sectional study. *The*

- Lancet Oncology*, v. 17, n. 6, p. 693–701, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30071-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30071-5).
148. WANG, Bo et al. BRCA1-associated protein inhibits glioma cell proliferation and migration and glioma stem cell self-renewal via the TGF- β /PI3K/AKT/mTOR signalling pathway. **Cellular Oncology**, v. 43, p. 223-235, 2020.
 149. WANG, L.; KLIONSKY, D. J.; SHEN, H. M. Os mecanismos e funções emergentes da microautofagia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 24, n. 3, p. 186–203, 2023.
 150. WANG, Y.; TJANDRA, N. Insights estruturais de tBid, o Bid ativado por caspase-8 e seu domínio BH3. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 50, p. 35840–35851, 2013.
 151. WANG, Y.; TJANDRA, N. SMAC/DIABLO as a functional link between intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 4, p. 236–244, 2013.
 152. WEI, H. J. et al. Expressão de CD44, CD24 e ESA em linhagens de células de adenocarcinoma pancreático varia com o microambiente local. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, v. 10, n. 4, p. 428–434, 2011.
 153. WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: Cytometry in studies of programmed cell death. *Methods in Cell Biology*, v. 103, p. 55–98, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8>.
 154. WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 30, p. 87, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.
 155. XUE, Chen et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 8, n. 1, p. 204, 2023.
 156. YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Autofagia de mamíferos: maquinaria molecular central e regulação de sinalização. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 22, n. 2, p. 124–131, 2010.
 157. YAO, R.; SHEN, J. Autophagy and its role in cellular maintenance and recycling. *Journal of Cell Biology*, v. 222, p. e202303008, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.202303008>
 158. Yu, Y. et al. Visando uma enzima de dessaturação lipídica, SCD1, elimina seletivamente células-tronco do câncer de cólon por meio da supressão da sinalização Wnt e NOTCH. *Cells* **10**, 106 (2021)
 159. YUE, Q.; GAO, G.; ZOU, G.; YU, H.; ZHENG, X. Produtos naturais como tratamento adjuvante para câncer de pâncreas: tendências e avanços recentes. *BioMed Research International*, [S.l.], v. 2017, p. 1–13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/8412508>.
 160. ZHANG, J.; et al. Targeting antioxidant programs to enhance ROS-induced cell death in cancer therapy. *Redox Biology*, v. 47, p. 102181, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102181>

161. ZHANG, Yunxiao; BEACHY, Philip A. Cellular and molecular mechanisms of Hedgehog signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 9, p. 668-687, 2023.
162. ZHAO, S. et al. CD44 expression level and isoform contributes to pancreatic cancer cell plasticity, invasiveness, and response to therapy. *Clinical Cancer Research*, v. 22, n. 22, p. 5592–5604, 2016. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3115.
163. ZHENG, J. et al. N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer Letters*, v. 298, n. 2, p. 186–194, 2010.
164. ZHOU, J.; ZHANG, Y. Cancer stem cells: models, mechanisms and implications for improved treatment. *Cell Cycle*, v. 7, n. 10, p. 1360–1370, 2008. DOI: 10.4161/cc.7.10.5953.
165. ZHOU, R.; VANDER HEIDEN, M. G.; RUDIN, C. M. A exposição genotóxica está associada a alterações na captação e no metabolismo da glicose. *Cancer Research*, v. 62, n. 12, p. 3515–3520, 2002.
166. ZONG, Y.; WU, H.; XIE, Y.; ZHU, J.; LIU, Y. Emerging roles of exosomes in pancreatic cancer diagnosis, progression, and therapy. *International Journal of Biological Sciences*, v. 16, n. 5, p. 872–880, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.39348>.

APÊNDICE A

Systematic Review

Preclinical Trials of Cancer Stem Cells Targeted by Metal-Based Coordination Complexes: A Systematic Review

Ana Caroline Mafra Bezerra, Lucas Elohim Cardoso Viana Baptista, Maria Núbia Alencar Couto and Milton Masahiko Kanashiro * 

Center for Biosciences and Biotechnology, Darcy Ribeiro State University of Northern Fluminense, Campos dos Goytacazes 28013-602, Brazil; bezerra.bio.mp.mac@pq.uenf.br (A.C.M.B.); lucas.elohim2010@gmail.com (L.E.C.V.B.); nubia@uenf.br (M.N.A.C.)

* Correspondence: kmilton@uenf.br

Abstract

Background/Objective: Cancer stem cells (CSCs) are a self-renewing subpopulation within tumors that contribute to heterogeneity and resistance to conventional cancer therapies, including chemotherapy and radiotherapy. Despite growing interest in CSCs as therapeutic targets, effective compounds against these cells remain limited. This systematic review aims to assess the potential of metal-based coordination complexes as anti-CSC agents in preclinical models. **Methods:** A systematic literature search was conducted following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. Twenty-seven original in vitro studies were included, all evaluating the cytotoxic effects of metal-based compounds on cancer cell lines enriched with CSC subpopulations. To ensure methodological rigor, all articles underwent a critical appraisal by independent reviewers who resolved discrepancies through consensus, and only studies meeting pre-defined quality criteria were included. **Results:** Several metal complexes, particularly copper-based compounds, demonstrated significant cytotoxicity toward CSCs, mainly through the induction of apoptosis. Breast cancer was the most frequently studied tumor type. Many studies reported modulation of CSC-related markers, including EPCAM, CD44, CD133, CD24, SOX2, KLF4, Oct4, NOTCH1, ALDH1, CXCR4, and HES1, suggesting effects on CSC maintenance pathways. Most studies were conducted in the United Kingdom and relied on in vitro models. **Conclusions:** Metal coordination complexes, especially those containing copper, show promise as therapeutic agents targeting CSCs. However, further in vivo studies and mechanistic investigations are essential to advance their translational potential.

Keywords: cancer stem cell; coordination complex; cancer treatment; systematic review



Academic Editors: Hassan Bousbaa and Zhiwei Hu

Received: 23 April 2025

Revised: 21 June 2025

Accepted: 7 July 2025

Published: 18 July 2025

Citation: Bezerra, A.C.M.; Baptista, L.E.C.V.; Couto, M.N.A.; Kanashiro, M.M. Preclinical Trials of Cancer Stem Cells Targeted by Metal-Based Coordination Complexes:

A Systematic Review. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 931. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17070931>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer remains a major global public health concern. Over the past decade, its incidence has risen by 20%, and by 2030, more than 25 million new cases are projected. Cancer surveillance plays a critical role in planning, monitoring, and evaluating control measures [1]. According to the World Health Organization [2], over 35 million new cancer cases are expected by 2050, representing a 77% increase compared to the 20 million cases estimated in 2022. This rapid rise in the global cancer burden reflects not only population aging and growth but also increased exposure to risk factors, many of which are linked to socioeconomic development.

Among the multiple factors contributing to cancer progression and treatment failure, cancer stem cells (CSCs) have gained significant attention due to their central role in tumor heterogeneity, therapy resistance, recurrence, and metastasis [3,4]. Conventional chemotherapy and radiotherapy can effectively reduce the size of primary solid tumors and, when combined with surgery, eliminate the majority of cancer cells. However, CSCs often survive these treatments and can regenerate tumors, frequently displaying enhanced metastatic potential.

CSCs represent a fraction of cancer cells endowed with the abilities of self-renewal and differentiation into various progenitor cells, which sustain tumor growth *in vivo*. Their heterogeneity is reflected by distinct cell surface markers and their ability to undergo phenotypic plasticity, enabling them to adapt to microenvironmental changes and therapeutic stress [5–7]. Additionally, the clonal evolution model suggests that tumor cells initially share biological similarities but evolve into distinct clones through genetic and epigenetic alterations, resulting in differences in aggressiveness, invasiveness, and resistance to therapies [8–10].

The CSC hypothesis has been supported by several key observations: CSCs form a small fraction of the tumor mass but are capable of initiating tumor formation when transplanted into immunodeficient mice; they can be identified and isolated by specific surface markers; tumors originating from CSCs contain both tumorigenic and non-tumorigenic cells; and CSCs can be serially transplanted, demonstrating their self-renewal capacity [11,12]. Despite advancements in CSC research, the isolation, expansion, and *in vitro* study of undifferentiated CSCs, as well as the development of effective chemical agents targeting these cells, remain challenging.

Emerging features, such as phenotypic plasticity, epigenetic reprogramming, polymorphic microbiomes, and cellular senescence, have also been identified as key contributors to tumor progression [11,13,14]. Phenotypic plasticity allows CSCs to switch between epithelial and mesenchymal states, facilitating invasion and metastasis. These processes are regulated by genomic instability and epigenetic modifications, including DNA methylation and chromatin remodeling. Additionally, senescence, a state of irreversible growth arrest, can act as a barrier to malignant transformation but may also contribute to tumor progression under certain conditions.

CSCs have developed multiple mechanisms to survive environmental and therapeutic stress, including enhanced DNA repair capabilities, hyperactivation of cell cycle checkpoints, overexpression of DNA damage response proteins, increased activity of transmembrane drug efflux pumps, and the ability to enter quiescent states while maintaining basal metabolic activity [15,16]. These mechanisms are closely associated with therapy resistance, further complicating cancer treatment efforts [17–19].

Therefore, effective cancer treatment must target both differentiated cancer cells and CSCs. Although progress has been made in identifying specific CSC characteristics, such as surface markers and signaling pathways, no clinically approved therapies have successfully eliminated CSCs at therapeutic doses despite extensive research efforts. In recent years, metal-based compounds have emerged as a promising strategy to overcome this challenge owing to their unique physicochemical properties and diverse cytotoxic mechanisms, including induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis [20,21].

Nevertheless, the limited efficacy of current anticancer metallodrugs against CSCs remains a significant obstacle, as most agents are primarily effective against differentiated tumor cells [22]. While platinum-based and other metal-containing drugs have shown restricted activity on CSCs, certain metal coordination complexes, particularly those containing copper, have demonstrated promising preclinical results. Despite substantial advancements in stem cell research, the role of CSCs in cancer recurrence and therapy

resistance is not yet fully elucidated, highlighting the need for continued research. In this context, the present systematic review categorizes and analyzes preclinical studies investigating the effects of metal-based coordination compounds on CSCs, employing the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) methodology to assess their potential therapeutic relevance across various cancer types.

Recent reviews have highlighted the therapeutic potential of metal-based coordination compounds against cancer stem cells, emphasizing their cytotoxicity, apoptotic mechanisms, and modulation of key CSC pathways, such as Wnt/ β -catenin, Notch, and PI3K/Akt/mTOR [23–25]. These studies have provided valuable insights into the anti-cancer activity of metals, including copper, ruthenium, platinum, and iridium, particularly in models of breast cancer and mammosphere-forming CSCs. While these reviews offer comprehensive overviews, they often rely on narrative approaches or thematic grouping without the methodological rigor needed to minimize selection bias. In contrast, the present study introduces a systematic review conducted in accordance with PRISMA guidelines, enabling a more refined and reproducible selection of eligible studies. By applying pre-defined inclusion criteria and critically appraising methodological quality, this review not only consolidates preclinical data on the cytotoxic effects of coordination complexes in CSC-enriched models but also identifies gaps in selectivity and toxicity profiles. This systematic approach distinguishes it from prior reviews by enhancing analytical specificity and providing a robust framework for guiding future translational research.

2. Materials and Methods

This systematic review was prospectively registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) database under the registration number [ID1066596]. The protocol followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines to ensure transparency and methodological rigor.

2.1. Search Strategy

The systematic review followed the PRISMA guidelines [26]. The search strategy was applied to multiple electronic databases, including PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar. The primary databases (PubMed, Scopus, Web of Science) were selected because they index peer-reviewed, high-quality scientific literature relevant to biomedical and pharmaceutical sciences. Google Scholar was also included to enhance coverage by capturing gray literature, conference proceedings, and early-stage studies not yet indexed in traditional databases; however, all such records were carefully screened to ensure scientific rigor and peer-review status.

A bibliographic search was conducted in PubMed, Nature, Scielo, and Google Scholar between 11 December 2023 and 12 December 2023, with an update on 27 January 2025. The general breakdown of item quantities is specified in (Supplementary Table S1). Both searches used the terms “Cancer Stem Cell” and “Coordination Complex” and included various related keywords (detailed in a Supplementary Table). The keyword combinations used were [“Cancer Stem Cell” AND coordination complex OR metallocomplex] and [“Cancer Stem Cell” AND coordination complex], applied mainly in PubMed and Nature databases. This strategy identified 290 articles, with 1 duplicate excluded (see Figure 1). The search strategy aimed to be broad enough to avoid missing relevant studies while prioritizing high-quality indexed sources to ensure consistency of peer-reviewed content.

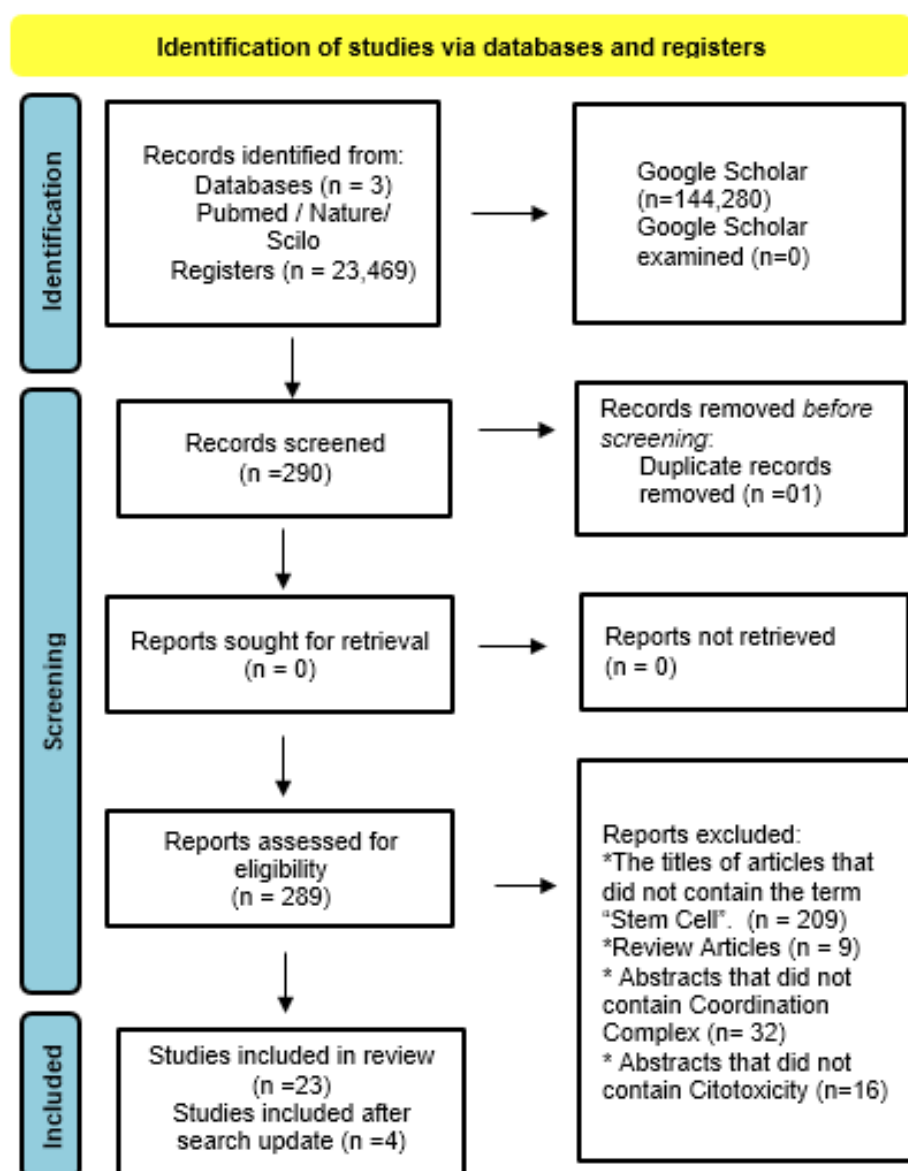


Figure 1. PRISMA diagram of the systematic review. The retrieval process is illustrated, covering the stages of identification, screening, eligibility assessment, and inclusion of studies. A total of 23,469 studies were initially identified through database searches. After removing duplicates, 289 records were screened by title and abstract. Subsequently, 23 full-text articles were assessed for eligibility, resulting in 27 studies included in the qualitative synthesis. In the excluded reports, articles whose abstracts did not contain the following were excluded: Titles with the term cancer stem cells present, literature review articles, abstracts that do not specify the coordination complex and that do not contain cytotoxicity assays. Note that *n* indicates the number of studies included at each stage. This diagram provides a clear overview of the study selection and reasons for exclusion throughout the process.

2.2. Study Selection and Data Extraction

The results were exported for title, abstract, and full-text screening. The inclusion criteria were (1) article titles containing the term "Stem Cell"; (2) original experimental studies involving coordination complexes; and (3) abstracts addressing stem cell characterization, coordination complexes, and cytotoxicity. Studies focusing on cell death characterization were also considered, regardless of exclusion criteria. After screening, 20 articles underwent full-text evaluation, of which 3 met all criteria and were included. The PRISMA flowchart in Figure 1 details the study identification, inclusion, and exclusion process.

The data extracted included information on stem cells and coordination complexes, such as country of origin and year of publication, experimental methods, types of coordination compounds used, stem cell characteristics, cancer cell lines studied, types and mechanisms of induced cell death, and contributions to the preclinical evaluation of metal-pharmaceutical treatments targeting stem cells.

2.3. Assessment of Methodological Quality of Included Articles

Currently, there is no defined methodological tool for bias analysis in systematic reviews of in vitro preclinical trials. Many studies adapt existing criteria from platforms that evaluate randomized or non-randomized clinical trials, adjusting their analyses according to their individual criteria. Due to the particularities of preclinical studies, it is difficult to establish questions for critical analysis of these studies, since their quality depends on the type of experimental model used.

From this perspective, this review applied the criteria recommended for basic research in epidemiology within preclinical studies, as they were best suited for the analysis conducted [27], Explained in (Supplementary). These criteria are detailed in the Supplementary Materials and associated with Likert-scale statements for accurate analysis. Three independent reviewers (AB, LE, and MC) evaluated all selected articles to ensure consistency and quality in the analysis, aligning with the parameters established for this review. Articles that did not achieve at least 50% agreement on positive statements (“I completely agree” and/or “Agree”) were classified as low quality and excluded from further analysis (Supplementary Table S2 and Graph S1). A survey of all experiments carried out by the research of the analyzed articles was also carried out and these were grouped and presented in the Supplementary Table S3.

3. Results

• Systematic Review

The PRISMA flowchart in Figure 1 describes the process of identifying, including, and excluding studies. Article selection was made from studies conducted in the last 10 years, with 27 studies (Table 1) selected based on the PRISMA criteria, as detailed in the Supplementary Materials. The overall percentage data are provided, with corresponding illustrations in Figure 2. For experimental analyses, the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] cell viability assay was used in 100% of the studies to assess the cytotoxicity of metal complexes, while other techniques are described in the Supplementary Materials. All studies also explored the potential mechanisms of action of the complexes. The results were categorized into the following: Characteristics of the metal complexes: Detailed descriptions of their structural properties, chemical compositions, and relevant characteristics; Cytotoxicity in stem cells and cancer stem cells: Assessment of the effects on normal and cancer stem cells, their influence on stem cell markers, and the types of cell death analyzed. General characteristics are categorized in Table 2.

Table 1. Articles selected for the systematic review following the application of the PRISMA methodology.

Selected Articles	Year
1. A Breast Cancer Stem Cell-Selective, Mammospheres-Potent Osmium (VI) Nitrido Complex	2014
2. The Breast Cancer Stem Cell Potency of Copper (II) Complexes Bearing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Their Encapsulation Using Polymeric Nanoparticles	2016
3. Cancer Stem Cell and Bulk Cancer Cell Active Copper (II) Complexes with Vanillin Schiff Base Derivatives and Naproxen	2017
4. A Reactive Oxygen Species-Generating, Cyclooxygenase-2 Inhibiting, Cancer Stem Cell-Potent Tetranuclear Copper (II) Cluster	2017

Table 1. Cont.

Selected Articles	Year
5. Induction of Necroptosis in Cancer Stem Cells Using a Nickel (II)-Dithiocarbamate Phenanthroline Complex	2017
6. Highly Charged, Cytotoxic, Cyclometalated Iridium (III) Complexes as Cancer Stem Cell Mitochondriotropics	2018
7. Diflunisal-Adjoined Cobalt (III)-Polypyridyl Complexes as Anti-Cancer Stem Cell Agents	2018
8. Modulating the Chemical and Biological Properties of Cancer Stem Cell-Potent Copper (II)-Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Complexes	2019
9. An Anticancer Os (II) Bathophenanthroline Complex as a Human Breast Cancer Stem Cell-Selective, Mammosphere Potent Agent That Kills Cells by Necroptosis	2019
10. A Triangular Platinum (II) Multinuclear Complex with Cytotoxicity Towards Breast Cancer Stem Cells	2019
11. Platinum (IV) Derivatives with Cinnamate Axial Ligands as Potent Agents Against Both Differentiated and Tumorigenic Cancer Stem Rhabdomyosarcoma Cells	2020
12. Breast Cancer Stem Cell Potency of Nickel (II)-Polypyridyl Complexes Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs	2020
13. Identification of Two Mitochondrial-Targeting Cyclometalated Iridium (III) Complexes as Potent Anti-Glioma Stem Cell Agents	2020
14. The Discrete Breast Cancer Stem Cell Mammosphere Activity of Group 10-Bis (Azadiphosphine) Metal Complexes	2020
15. A Tri-Metallic Palladium Complex with Breast Cancer Stem Cell Potency	2020
16. Inhibition of 3D Colon Cancer Stem Cell Spheroids by Cytotoxic Ru(II)-p-Cymene Complexes of Mesalazine Derivatives	2020
17. Combination of Histone Deacetylase Inhibitor with Cu (II) 5,5-Diethylbarbiturate Complex Induces Apoptosis in Breast Cancer Stem Cells: A Promising Novel Approach	2021
18. A Dithiacyclam-Coordinated Silver (I) Polymer with Anti-Cancer Stem Cell Activity	2021
19. An Osteosarcoma Stem Cell-Potent Nickel (II)-Polypyridyl Complex Containing Flufenamic Acid	2022
20. Dipyrrophenazine Iridium (III) Complex as a Phototoxic Cancer Stem Cell Selective, Mitochondria Targeting Agent	2022
21. A Bioinspired Redox-Modulating Copper (II)-Macrocyclic Complex Bearing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs with Anti-Cancer Stem Cell Activity	2022
22. The Bulk Breast Cancer Cell and Breast Cancer Stem Cell Activity of Binuclear Copper (II)-Phenanthroline Complexes	2023
23. A Breast Cancer Stem Active Cobalt (III)-Cyclam Complex Containing Flufenamic Acid with Immunogenic Potential	2023
24. Dinuclear Gold (I) Complexes Based on Carbene and Diphosphane Ligands: Bis [2-(Dicyclohexylphosphano)ethyl]amine Complex Inhibits Proteasome Activity, Decreases Stem Cell Markers and Spheroid Viability in Lung Cancer Cells	2023
25. Targeting Cancer Stem Cell OXPHOS with Tailored Ruthenium Complexes as a New Anti-Cancer Strategy	2024
26. An Immunogenic Anti-Cancer Stem Cell Bi-Nuclear Copper (II)-Flufenamic Acid Complex	2024
27. Cobalt (III)-Macrocyclic Scaffolds with Anti-Cancer Stem Cell Activity	2024

Table 2. Summary of characteristics of the included studies.

First Author (Year)	Country	Cancer Type	CSC Markers	Coordination Complex ¹	Type of Cell Death ²
Fang, 2024 [28]	UK	Breast cancer	–	[Co(1,4,7,11-tetraazacyclotetradecane)Cl ₂] ⁺ [Co(1-oxa-4,8,12-triazacyclotetradecane)Cl ₂] ⁺	Induces cell death (unspecified)
Fang, 2024 [29]	UK	Breast cancer	–	[Co(cyclam)Cl ₂] ⁺ , [Co(oxacyclam)Cl ₂] ⁺	Apoptosis
Li, 2024 [30]	UK	Breast cancer	–	Cu (II)–flufenamic acid complexes	Induces cell death (unspecified)
Alcalá, 2024 [31]	Spain	Pancreatic, colorectal, osteosarcoma	CD133, EpCAM, CXCR4, NOTCH1,	Ru (II) complexes	Induces cell death (unspecified)
Casagrande, 2023 [32]	Italy	Lung cancer	CD133, ALDH1, CD44	Dinuclear Au(I) complex	Apoptosis
Singh, 2023 [33]	UK	Breast cancer	–	Cu (II)–terpyridine complexes	Apoptosis

Table 2. Cont.

First Author (Year)	Country	Cancer Type	CSC Markers	Coordination Complex ¹	Type of Cell Death ²
Osei, 2023 [34]	UK	Breast cancer	C117	Cu (II)–phenanthroline complexes	Apoptosis
Passeri, 2022 [35]	UK	Osteosarcoma	C117	Ni (II)–flufenamic acid + phenanthroline complexes	Necroptosis
Markova, 2022 [36]	Czech Republic	Rhabdomyosarcoma	CD133	Ir (III)–benzimidazole complex	Necrosis
Johnson, 2022 [37]	UK	Breast cancer	–	Cu (II)–cyclam + NSAID complexes	Induces cell death (unspecified)
Erkisa, 2021 [38]	Turkey	Breast cancer	–	Cu (II)–valproic acid–barbital complex	Apoptosis
Johnson, 2021 [39]	UK	Breast cancer	–	Polymeric Ag(I) complex	Apoptosis
Peng, 2020 [40]	China	Glioblastoma	–	Cyclometalated Ir(III) complexes	Apoptosis
Acharya, 2020 [41]	India	Colon cancer	SOX2, KLF4, Oct4, HES1	[Ru(p-cymene)X ₂] ₂ (X = Cl, I)	Induces cell death (unspecified)
Feld, 2020 [42]	UK	Breast cancer	–	Ni (II)–NSAID complexes	Necroptosis
Xiao, 2020 [43]	UK	Breast cancer	–	Pt(II), Pd(II), Ni(II) complexes	Apoptosis
Zajac, 2020 [44]	Czech Republic	Rhabdomyosarcoma	CD44, CD133	Pt(NH ₃) ₂ (OH)(cinn)Cl ₂ complexes	Induces cell death (unspecified)
Eskandari, 2020 [45]	UK	Breast cancer	–	Trimetallic Pd complex	Apoptosis
Shin, 2019 [46]	UK	Breast cancer	–	Cu–NSAID complex	Apoptosis
Zhang, 2019 [47]	UK	Breast cancer	–	Copper (II) coordination complexes containing NSAIDs	Apoptosis
Novohradsky, 2019 [48]	Czech Republic	Breast cancer	C44 and CD24	Os (II)/Ru (II)–p-cymene–bphen–dca complex Cobalt	Induces cell death (unspecified)
Abe, 2018 [49]	UK	Breast cancer	–	(III)–diflunisal–polypyridyl complex Iridium	Apoptosis
Laws, 2018 [50]	UK	Breast cancer	–	(III)–polypyridyl–pyridinium complex	Apoptosis
Lu, 2017 [51]	UK	Breast cancer	–	Copper (II)–vanillin–naproxen Schiff base complex	Induces cell death (unspecified)
Lu, 2017 [52]	UK	Breast cancer	–	Tetranuclear copper (II) complex	Induces cell death (unspecified)
Eskandari, 2016 [53]	UK	Breast cancer	–	Copper (II)–phenanthroline–NSAID complex	Induces cell death (unspecified)
Suntharalingam, 2014 [54]	USA	Breast cancer	CD44	Osmium (VI) Nitrido complex	Apoptosis

¹ Coordination complex: Only simplified names are presented here; detailed formulae and structures are available in the Supplementary Materials. ² Type of cell death: If not specified in the original study, classified as “Induces cell death (unspecified)”.

Subsequently, we assessed the biological relevance of the synthesized compounds and their effects on stem cells. All the reviewed studies employed the MTT assay to evaluate cell viability following treatment with the synthesized complexes. This approach provided insights into the cytotoxic potential of the compounds and their ability to impact stem cell populations, highlighting their therapeutic prospects in cancer research. These analyses are specified in Table 3.

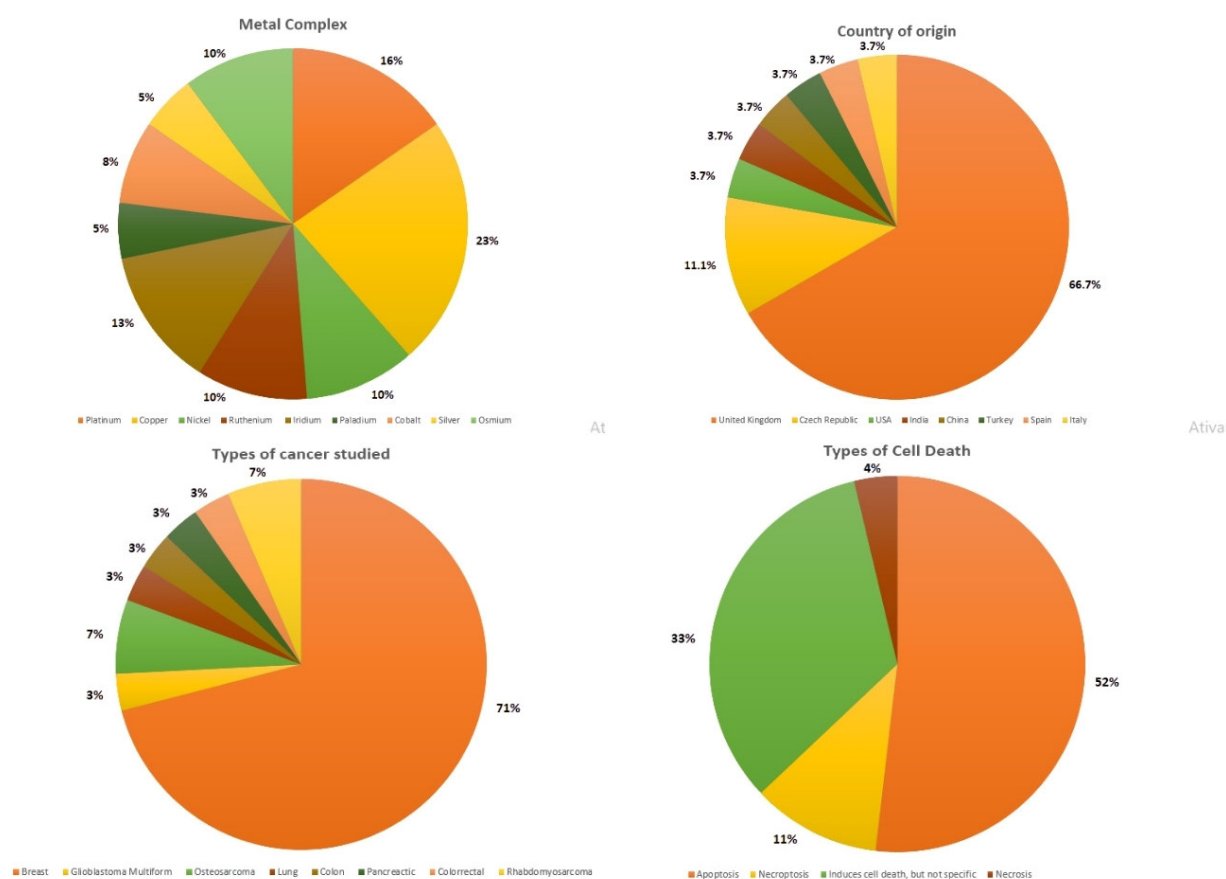


Figure 2. Graphical representations showcasing the percentages of general characteristics extracted from the analyzed articles. These characteristics include the country of origin of studies, the types of cancers investigated, the metal complexes examined, and the types of cell death identified in the analysis results.

Table 3. Values of IC₅₀/μM tested on cancer lines and stem cells.

Studies Examining Breast Cancer				
First author	Complex	HMLER-shEcad mammospheres ²		
Xiao, 2020 [43]	Nickel (II) complex	2.98 ± 0.03		
	Palladium (II) complex	0.97 ± 0.09		
	Platinum (II) complex	0.24 ± 0.02		
First author	Complex	HMLER	HMLER-shEcad ¹	
Suntharalingam, 2014 [54]	Osmium (VI) Nitrido complex (1)	11.20 ± 0.48	4.91 ± 0.86	
	Osmium (VI) Nitrido complex (2)	14.58 ± 0.20	16.06 ± 4.12	
	Osmium (VI) Nitrido complex (3)	82.80 ± 18.43	53.99 ± 2.45	
Lu, 2017 [51]	Copper (II) complexes with vanillin Schiff base derivatives and NSAIDs:	37.6 ± 3.3	36.0 ± 4.6	
Lu, 2017 [52]	Tetranuclear copper (II) complexes:	8.3 ± 0.5	8.4 ± 0.1	
Eskandari, 2016 [53]	Cu (bathocuproinedisulfonic acid disodium) (indomethacin) ₂ complex:	0.31 ± 0.01	0.22 ± 0.01	
First author	Complex	HMLER	HMLER-shEcad ¹	HMLER-shEcad mammospheres ²
Abe, 2018 [49]	Diflunisal–adjoined cobalt (III) polypyridyl complexes	3.9 ± 0.2	2.1 ± 0.1	22.8 ± 2.7
	Mono-platinum complex	5.01 ± 0.03	7.01 ± 0.06	14.50 ± 0.91
	Dinuclear platinum complex	2.59 ± 0.09	2.35 ± 0.01	16.00 ± 0.56
	Tri-platinum (II) complex	2.24 ± 0.01	1.26 ± 0.03	4.55 ± 0.02
Feld, 2020 [42]	Nickel (II)-3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline complexes bearing NSAID	2.74 ± 0.06	1.83 ± 0.11	55.40 ± 0.42
Fang, 2024 [28]	[Co(1,4,7,11-tetraazacyclotetradecane)Cl ₂] ⁺	4.64 ± 0.25	1.83 ± 0.32	51.46 ± 1.49
	[Co(1-oxa-4,8,12-triazacyclotetradecane)Cl ₂] ⁺	13.86 ± 0.01	3.09 ± 0.01	55.04 ± 3.23
Eskandari, 2020 [45]	Tri-metallic palladium	2.24 ± 0.01	1.26 ± 0.03	4.55 ± 0.02
Singh, 2023 [33]	Copper (II) complexes with aryl-sulfonamide-functionalized terpyridine ligands	0.85 ± 0.04	0.69 ± 0.12	3.44 ± 0.03
	Cobalt (III): [Co(1,4,7,11-tetraazacyclotetradecano)Cl ₂] ⁺	4.64 ± 0.25	1.83 ± 0.32	51.46 ± 1.49
	Cobalt (III): [Co(1-oxa-4,8,12 triazacyclotetradecano)Cl ₂] ⁺	13.86 ± 0.01	3.09 ± 0.01	55.04 ± 3.23
	Binuclear copper (II) complex comprising two copper (II) centers bound to flufenamic acid	3.57 ± 0.03	3.04 ± 0.09	9.17 ± 2.47
Li, 2024 [30]	Binuclear Cu(II) complex with two Cu(II) centers coordinated to 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline	0.31 ± 0.01	0.38 ± 0.17	0.74 ± 0.11
	Cobalt (III)–cyclam complex attached to two flufenamic acid moieties	0.27 ± 0.03	0.18 ± 0.003	0.27 ± 0.02
	Trans-dichloro (cyclam)-cobalt(III) chloride	>100	>100	>133

Table 3. Cont.

Studies Examining Breast Cancer							
First author	Complex	HMLER	HMLER-shEcad ¹		HMLER-shEcad mammospheres ²	MDA-MB-231	
Passeri, 2022 [35]	Nickel (II)–dithiocarbamate phenanthroline complexes	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.2		2.3 ± 0.2	3.3 ± 1.2	
First author	Complex	HMLER	HMLER-shEcad ¹	HMLER-shEcad mammo-spheres ²	U2OS	HepG2	
Laws, 2018 [50]	Iridium (III) complexes bearing polypridyl and charged 1-methyl-2-(2-pyridyl) pyridinium ligands	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.1	21.0 ± 0.2	18.5 ± 3.0	65.4 ± 4.8	
First author	Complex	MCF-7	MCF-7 CD44+/CD24– ₁₅		SKBR-3	SKBR-3 CD44+/CD24– ¹⁶	
Novohradsky, 2019 [48]	Os (II) complex [Os(p-cym)(bphen)(dca)]PF ₆ and its Ru analog	2.6 ± 0.4	0.58 ± 0.07		1.0 ± 0.2	0.32 ± 0.09	
First author	Complex	HMLER	HMLER-shEcad ¹		HMLER-shEcad mammospheres ²	HEK 293	
Osei, 2023 [34]	Copper (II)–phenanthroline complexes	0.03 ± 0.001	0.08 ± 0.004		0.11 ± 0.001	0.09 ± 0.003	
First author	Complex	HMLER	HMLER-shEcad ¹	HMLER-shEcad mammo-spheres ²	BEAS-2B	MCF10A	HEK 293
Johnson, 2021 [39]	Silver (I) polymeric complex	4.58 ± 0.14	4.02 ± 0.35	12.95 ± 1.35	8.66 ± 0.48	10.12 ± 0.74	34.31 ± 0.10
Johnson, 2022 [37]	Copper (II)–dithiacyclam and copper (II)–cyclam complexes bearing NSAIDs	20.7 ± 0.2	12.5 ± 0.4	Nt* ¹⁷	57.1 ± 0.9	92.2 ± 1.2	57.2 ± 1.0
Studies Examining Osteosarcoma							
First author	Complex	U2OS			U2OS-MTX ³	OSC-osteosphere ⁴	
Passeri, 2022 [35]	Nickel (II)–flufenamic acid complexes with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline	25.16 ± 0.40			26.90 ± 0.71	2.97 ± 0.04	

Table 3. Cont.

Studies Examining Breast Cancer								
Studies Examining Rhabdomyosarcoma								
First author	Complex	MCF-7 CD44− ⁵	MCF-7 CD44+ ⁶	RD CD133− ⁷		RD CD133+ ⁸		
Zajac, 2020 [44]	<i>cis,trans,cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ (OH)(cinn)Cl ₂] (1)	12 ± 2	17 ± 1	8.4 ± 0.1		12.0 ± 0.7		
	<i>cis,trans,cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ (cinn) ₂ Cl ₂] (2)	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.22 ± 0.04		0.31 ± 0.06		
First author	Complex	MRC-5 ⁹			DR ¹⁰			
Markova, 2022 [36]	Ir (III) compound photoactivated by visible light of the type [Ir(C [∧] N) ₂ (dppz)][PF ₆] where C [∧] N = 1-methyl-2-(2'-thienyl)benzimidazole	0.8 ± 0.1			0.046 ± 0.002			
Studies Examining Glioblastoma Multiforme								
First author	Complex	GSC-3# ¹¹	GSC-12# ¹²	GSC-18# ₁₃	U87	U251	HAC	293T
Peng, 2020 [40]	Ir (III) (1)	9.05 ± 0.9	5.26 ± 0.5	7.14 ± 0.7	20.58 ± 2.1	20.66 ± 2.2	29.44 ± 3.0	28.71 ± 2.8
	Ir (III) (2)	7.55 ± 0.8	5.40 ± 0.5	8.80 ± 0.78	31.04 ± 3.2	27.15 ± 2.8	27.87 ± 2.5	26.25 ± 2.6
Studies Examining Colorectal Cancer								
First author	Complex	HT-29	MIAPaCa- ₂	HepG2		MDA-MB-231		
Acharya, 2020 [41]	Ru (II)–p-cymene complex of an imidazole-mesalazine Schiff base (I)	3.2 ± 0.3	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.3		2.9 ± 0.4		
	Ru (II)–p-cymene complex of an imidazole-mesalazine Schiff base (II)	2.6 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.4		2.2 ± 0.2		
Studies Examining Lung Cancer								
First author	Complex	A549			A549-MCTSs ¹⁴			
Casagrande, 2023 [32]	Dinuclear gold(I) carbene complexes with IPr and diphosphane ligands (Dppe, Dppp, DCyPA)	0.13 ± 0.05			0.95 μM			

¹ HMLER-shEcad: Human mammary epithelial cells with E-cadherin silencing, used to model cancer-stem-cell-like phenotypes. ² HMLER-shEcad mammospheres: Spheroid cultures derived from HMLER-shEcad cells, enriched in CSCs due to anchorage-independent growth. ³ U2OS-MTX: Methotrexate-resistant U2OS subline, used to assess drug resistance. ⁴ OSC-osteosphere: Ovarian cancer stem-like spheroids, typically enriched in CSC characteristics. ⁵ MCF-7 CD44[−]: CD44-negative subpopulation of the MCF-7 breast cancer cell line. ⁶ MCF-7 CD44⁺: CD44-positive MCF-7 subpopulation with increased stemness and tumorigenic potential. ⁷ RD CD133[−]: CD133-negative RD rhabdomyosarcoma cells. ⁸ RD CD133⁺: CD133-positive subpopulation of RD cells, used to identify CSC traits. ⁹ MRC-5: Non-tumorigenic human lung fibroblast cell line used as a control for toxicity. ¹⁰ DR: Drug-resistant phenotype of unspecified cancer cell lines used to assess chemoresistance. ¹¹ GSC-3#: Glioblastoma stem-like cell line 3, patient-derived and enriched for CSC markers. ¹² GSC-12#: Glioblastoma stem-like cell line 12, used in studies on therapy resistance. ¹³ GSC-18#: Glioblastoma stem-like cell line 18, relevant for CSC-targeted research. ¹⁴ A549-MCTSs: Multicellular tumor spheroids derived from A549 lung carcinoma cells, mimicking 3D tumor architecture. ¹⁵ MCF-7 CD44⁺/CD24[−]: Subpopulation of MCF-7 breast cancer cells expressing CD44 and lacking CD24, commonly used as a CSC-enriched model. ¹⁶ SKBR-3 CD44⁺/CD24[−]: Subpopulation of SKBR-3 breast cancer cells with CD44 expression and CD24 depletion, indicative of CSC-like properties. ¹⁷ Nt[†]: Not tested. Note: The molecular structures of the complexes—Osmium(VI) nitride complexes (1–3), Ir(III) (1), and Ir(III) (2)—were not specified in the original article analyzed. These compounds are identified numerically for the purposes of this study.

3.1. Analysis of the Characteristics of Metal Complexes

3.1.1. Platinum

Platinum (II) complexes, such as cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin, are commonly used in clinical settings to treat different types of cancers. Considerable effort has been dedicated to elucidating their cellular and molecular mechanisms of action [56]. The primary therapeutic impact of platinum (II) agents stems from their capacity to form covalent bonds with DNA, causing structural distortions [57]. This prevents DNA replication and transcription, ultimately inducing programmed cell death. However, despite their efficacy, platinum (II) drugs present notable limitations. These include systemic toxicity and side effects arising from their inability to differentiate between rapidly dividing cancer cells and healthy proliferating cells [58]. Moreover, acquired or inherent resistance renders them ineffective against certain tissue types, increasing the likelihood of cancer recurrence [59,60].

Indeed, numerous independent in vitro and in vivo studies have demonstrated that cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin tend to enrich rather than deplete CSCs within heterogeneous tumor populations [56]. This phenomenon is mainly attributed to elevated levels of DNA-repair-associated factors (such as BRCA1, ATR, ATM, and Chk1) and platinum-related drug efflux pumps (such as ATP-binding cassette transporters) in CSCs [61]. Despite these challenges, significant research efforts continue to increase the efficacy of platinum-based complexes, particularly in CSCs. Although progress is being made in developing such complexes that can target cancer cells and CSCs at clinically relevant concentrations, only a few platinum complexes have shown substantial promise to date.

Among these are a platinum(II) complex, $\text{trans-[PtCl}_2(2\text{-(2-hydroxyethyl)pyridine})_2]$, and three platinum(IV) complexes: $\text{cis,trans,cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{OH})(\text{cinnamic acid})\text{Cl}_2]$, $\text{cis,trans,cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{cinnamic acid})_2\text{Cl}_2]$, and $\text{cis,trans,cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{t-cinnamate})(\text{oleate})\text{Cl}_2]$. These compounds effectively reduced the viability of breast and rhabdomyosarcoma CSCs in vitro at micro- or submicromolar concentrations [62]. Furthermore, a synthesized platinum complex $[\text{Pt}(1,5\text{-ciclooctadieno})\text{Cl}_2]$ was more potent and demonstrated impressive efficacy 56–77 times greater against CSC mammospheres compared to salinomycin, cisplatin, and carboplatin [44].

Another approach involves combining platinum complexes with other substances known for their antitumor activity, thereby enhancing their effectiveness. The design of platinum (IV) complexes offers the opportunity to conjugate biologically active ligands in axial positions. These ligands can be released concurrently with the DNA-damaging Pt (II) portion once the complexes accumulate and undergo reduction within cells. This enables them to act on various cellular targets through different mechanisms [63,64]. Therefore, these conjugates have the ability to deliver not only the molecules of the platinum component into tumor cells but also molecules of other biologically active compounds.

Two platinum (IV) cisplatin derivatives with axial cinnamate ligands were synthesized, showing antiproliferative activity at submicromolar concentrations, particularly against rhabdomyosarcoma, a challenging pediatric cancer. The study suggests that cinnamic acid, incorporated in these complexes, enters cells with platinum and may promote differentiation, enhancing the sensitivity of CSCs to platinum's cytotoxic effects. This dual-component approach improves cellular uptake, leading to higher intracellular concentrations of both platinum and cinnamic acid. Despite these advancements, there is still a need for new platinum agents that can effectively target both bulk cancer cells and CSCs at clinically relevant concentrations [48].

3.1.2. Copper

Copper (Cu), an essential trace element for the human body, plays a fundamental role in several biological metabolic processes, which are important for the support, growth and development of the organism. It also plays a role in several biological functions, such as

growth, cardiovascular health, and neuroendocrine activity. It is involved in several cellular processes and is incorporated into bioactive compounds used to treat conditions like copper deficiency, inflammation, and rheumatoid arthritis [34,65]. This wide range of biological functions highlights its potential for therapeutic applications [66]. Copper's lower toxicity compared to non-essential metals has driven research into copper-based compounds as potential alternatives to platinum-based anticancer drugs [67]. The effectiveness of copper complexes in cancer treatment depends largely on the coordinating ligands, which influence their cytotoxicity and mechanism of action [68].

The action mechanism of copper (II) complexes is primarily dictated by their coordinating ligands. Many of these complexes induce cancer cell death by promoting oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS) via Fenton-type reactions. Additional mechanisms include DNA binding, inhibition of topoisomerases I and II, and disruption of the proteasome. However, a common challenge with copper-based ROS inducers is their tendency to undergo change and release copper during the redox processes necessary for ROS production. This occurs because copper (I) and copper (II) oxidation states favor different geometrical configurations. Copper (I) typically prefers tetrahedral geometries, though it can also adopt linear and trigonal planar structures, while copper (II) centers tend to adopt square planar, trigonal pyramidal, or octahedral configurations [47,69,70].

Copper (II)–phenanthroline complexes incorporating non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to selectively eliminate mammary CSCs while preserving other cell types at micro- to submicromolar concentrations [71]. The cytotoxic mechanism of these complexes on mammary CSCs involves, in part, the intracellular increase in ROS, activation of oxidative stress pathways, and caspase-dependent apoptosis [34]. Copper (II)–Schiff base complexes are known as potent ROS generators, capable of inducing apoptosis in various cancer cells through mechanisms such as DNA damage or mitochondrial dysfunction. Furthermore, it has been reported that copper (II) complexes containing vanillin–Schiff base derivatives and the NSAID naproxen increase intracellular ROS levels within a short period of exposure (six hours), leading to DNA damage, reduced COX-2 expression, and activation of caspase-dependent apoptosis [51].

A study investigating strategies to improve the effectiveness of copper coordination compounds, using copper–dithiacyclam complexes stabilized by donor pools (reserves of molecules that can donate electrons during redox reactions), such as type I electron transport proteins (e.g., plastocyanin and azurin), demonstrates that this type of design supports efficient redox cycling between copper (I) and copper (II) states without copper leaching, thanks to hard and soft ligands that stabilize both oxidation states and reduce the reorganization energy, increasing ROS generation. Thus, in the context of these complexes, electron donors play a fundamental role in facilitating the transfer of electrons between molecules or cellular components [37].

In parallel, research on copper (II) complex combinations revealed that the structure $[\text{Cu}(\text{barb-}\kappa\text{N})(\text{barb-}\kappa^2\text{N,O})(\text{phen-}\kappa\text{N,N}')]\cdot\text{H}_2\text{O}$ optimized therapeutic outcomes. The combination of valproic acid with this complex significantly inhibited the proliferation of breast CSCs by inducing apoptosis and oxidative stress through ROS production. These findings suggest a promising potential for breast cancer therapy, although further clinical trials are needed to evaluate efficacy and safety [38]. Many copper complexes show cytotoxic effects against cancer cells, prompting growing interest in developing copper-based coordination compounds for pharmacological applications. The precise molecular mechanism connecting copper concentration to cancer cell activity is still under investigation.

3.1.3. Nickel

Investigations into nickel-containing small molecules as potential anticancer agents have been conducted, and although few studies detail their cellular mechanisms of action, there is current research into their stem cell anticancer properties [72]. Among these, two nickel (II)-3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline complexes containing NSAID groups (naproxen and indomethacin) have been reported, which have demonstrated the ability to kill breast cancer cells in large quantities; furthermore, these complexes affected both breast cancer cells and breast CSCs in the micromolar range under in vitro monolayer conditions [42]. Nickel (II) complexes containing semicarbazone and thiosemicarbazone ligands demonstrate significant in vitro antiproliferative activity and are believed to exert their cytotoxic effects by causing damage to genomic DNA or inhibiting topoisomerase II [73]. Other studies have indicated that a nickel (II) pyrithione complex could effectively inhibit the proliferation of cultured tumor cells, primary cells derived from human patients with acute myeloid leukemia, as well as xenografts of chronic myeloid leukemia (K562) and lung carcinoma (A549) in nude rats [7].

Mechanistic studies have revealed that the nickel (II) complex exhibits all the hallmarks of necroptosis, such as necrosome-mediated cell membrane disruption, mitochondrial depolarization, and distinct necroptotic morphological features. Furthermore, unbiased predictive functional genetic analysis based on RNA interference (RNAi) demonstrated that the mechanism of action of the nickel (II) complex resembles that of shikonin, a genuine inducer of necroptosis [74]. Other additional mechanistic studies indicate that a series of phenanthroline nickel (II)-dithiocarbamate complexes induce necroptosis in breast CSCs through necrosome-mediated cell membrane disruption and mitochondrial membrane depolarization. Morphological changes consistent with necroptosis were also observed in the treated CSCs [75].

Studies reveal that inducing necroptosis in cancer models activates cytotoxic T cells, promoting tumor regression and protection against recurrence [76]. A nickel (II) complex with 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline and flufenamic acid has shown potential as a necroptosis inducer in osteosarcoma stem cells, possibly via COX-2-mediated pathways [35]. Additionally, nickel-based complexes, such as those with N-aroyl-N'-thiohydrazide ligands, induce apoptosis through chromatin condensation and cell cycle arrest, inhibiting Dalton's lymphoma growth and reversing immunosuppression [60].

3.1.4. Iridium

Iridium (Ir) is a transition metal from the third row of the periodic table, belonging to the same group as cobalt (Co) and rhodium (Rh). It is categorized as one of the "precious metals" within the platinum-group elements. Iridium is relatively uncommon and was first discovered in 1803 as an impurity found within platinum deposits. Iridium metal is known for its inertness and resistance to corrosion [35]. Initial studies on the anticancer activity of organoiridium complexes primarily concentrated on square-planar Ir (I) complexes. This focus was due to their structural and electronic resemblance with Pt (II) anticancer complexes like cisplatin [77].

Organometallic iridium (III) complexes with pyridocarbazole have been shown to possess in vivo antiangiogenic properties in zebrafish models, along with photocytotoxicity against bulk cancer cells [78,79]. Additionally, noteworthy research has indicated that organometallic iridium (III) complexes containing electron-rich pentamethylcyclopentadienyl ligands exhibit promising potency against various types of cancer cells, with efficacy demonstrated down to submicromolar levels [77].

Certain cyclometalated iridium (III) complexes have been identified as efficient producers of photoinduced singlet oxygen in bulk cancer cells [80]. Research into the anticancer

properties of iridium (III) complexes has shown that their cytotoxicity and mechanism of action are strongly influenced by the coordinating ligands [15]. These ligands also play a key role in determining the intracellular localization, with bulky, lipophilic ligands promoting mitochondrial accumulation [81]. Additionally, a study found that photoactivatable dipyrrophenazine iridium (III) complexes exhibited high phototoxicity ($\lambda_{exc} = 420$ nm) in HeLa cells, a model of human cervical cancer, even under hypoxic conditions. The study further revealed that in HeLa cells treated with these complexes, the photochemical mechanism shifted from Type II to Type I, thereby improving photodynamic therapy (PDT) efficacy in hypoxic conditions. This enhancement addresses a limitation of PDT, with the complexes showing effectiveness at submicromolar concentrations [22].

Iridium (III) complexes containing 1,10-phenanthroline demonstrated equal potency (in the micromolar range) against both bulk breast cancer cells and breast CSCs, suggesting their potential to eliminate heterogeneous breast cancer populations with a single dose. Additionally, mechanistic studies revealed that the complex inhibits cytochrome c oxidase activity, induces depolarization of the mitochondrial membrane, increases intracellular ROS, and triggers caspase-dependent apoptosis. These findings underscore the potential of mitochondrial targeting agents as anti-CSC agents and pave the way for the development of other iridium (III) complexes as active agents targeting mitochondria in CSCs [50].

3.1.5. Palladium

Palladium complexes have low intrinsic solubility in aqueous solutions, which is a limiting factor in their use [56]. However, padeliporfin (TOOKAD), a bacteriochlorophyll-based palladium (II) complex, has emerged as the pioneer palladium-containing compound approved for clinical application. TOOKAD is used in PDT for the treatment of prostate cancer. In addition to TOOKAD, numerous palladium complexes have been recognized for their potential in promoting anticancer activities against bulk cancer cells, both in vitro and in vivo [6].

Other metal complexes from group 10, such as those incorporating palladium, have been widely studied for their potential as antineoplastic and antimetastatic agents [82]. Palladium coordination complexes typically display higher lability and faster ligand exchange rates (approximately 10^5 times faster) compared to their platinum analogs. Developing highly effective anticancer agents with low systemic toxicity by leveraging palladium's reactivity poses a significant challenge [6].

Studies show that a cationic palladium (II)–terpyridine complex with a saccharinate counteranion exhibits superior or equivalent potency against prostate CSCs compared to cisplatin and etoposide. It induces DNA damage, caspase-dependent apoptosis, and autophagy in prostate cancer cell lines and patient-derived cells, with similar findings in metastatic breast and cervical cancers [83–85]. A trinuclear palladium (II) complex further demonstrated enhanced inhibition of CSC spheroids compared to salinomycin by inducing DNA damage and apoptosis [45].

Other studies have shown that a monocationic square-planar palladium (II)–terpyridine complex with a saccharinate counteranion effectively eliminates prostate CSCs in vitro at micromolar concentrations [75]. Despite the palladium (II) centers being tightly bound to coordinated ligands and exhibiting solution stability, these complexes are unlikely to interact with DNA covalently. However, the research indicates that stable palladium (II) complexes in solution can induce toxicity. In CSC mammospheres, these complexes penetrate significantly, infiltrating CSC nuclei, causing genomic DNA damage, and triggering caspase-dependent apoptosis [39]. This analysis highlights the therapeutic potential of palladium-based agents and suggests their development as effective therapies against CSCs.

3.1.6. Cobalt

Hypoxia-inducible factors (HIFs), including HIF1 α and HIF2 α , are recognized as crucial microenvironmental elements involved in regulating CSCs [17]. Consequently, there is a proposal suggesting that properly engineered hypoxia-activatable cobalt (III) prodrugs represent a promising strategy for eradicating CSCs [56]. However, a significant limitation of the Co (III) complex known for its CSC-targeting activity is its susceptibility to rapid reduction and premature detachment from monodentate-bound NSAID ligands under conditions mimicking physiological environments [62].

Nevertheless, an active Co (III)–cyclam complex has been documented in CSCs, incorporating two units of monodentate-bound NSAIDs. NSAIDs function by inhibiting cyclooxygenase (COX-1 or COX-2)-mediated prostaglandin production, which serves as an inflammatory effector [86]. COX-2, the inducible isoform, is often overexpressed in specific CSC populations and contributes functionally to their proliferation. Hence, inhibiting COX-2 proves to be an effective approach in sensitizing CSCs to cytotoxic agents [87].

The cobalt (III) complex exhibited the ability to eliminate CSCs and cancer cells at low micromolar concentrations. Specifically, cobalt (III)–polypyridyl complexes containing diflunisal were observed to release diflunisal under reducing conditions. Cell-based mechanistic investigations revealed that this complex induced DNA damage and inhibited COX-2, leading to the eradication of CSCs. The release of diflunisal likely sensitizes CSCs to the cytotoxic effects of the reduced products of the complex [49]. The cobalt (III)–cyclam complex efficiently penetrates mammary CSCs, induces DNA damage, and triggers caspase-dependent apoptosis while reducing COX-2 expression, likely due to its flufenamic acid moieties. Its capacity to induce immunogenic cell death (ICD) was evidenced by increased calreticulin (CRT) surface expression, adenosine triphosphate (ATP) and high mobility group box 1 protein (HMGB-1) release, and enhanced macrophage phagocytosis of the treated CSCs. These findings underscore the immunotherapeutic potential of cobalt complexes for CSC-targeted therapy.

3.1.7. Silver

Silver serves no recognized biological function; nevertheless, the body can withstand low levels of silver without experiencing any toxic side effects [11]. Nonetheless, a wide array of structurally diverse silver compounds, including those with carboxylic acids, amino acids, nitrogen, phosphorus, and sulfur-donating ligands, have been investigated as potential antitumor agents [88]. Additionally, silver complexes may encounter issues such as low light stability and aqueous solubility [89]. Hence, careful selection of ligands is essential to prepare complexes with biologically compatible properties. It is noteworthy that certain silver complexes, particularly those with diphosphine and N-heterocyclic carbene ligands, have been reported to demonstrate promising in vivo antitumor activity in mice afflicted with leukemia, reticular cell sarcoma, and ovarian cancer [90].

A stable silver (I) polymeric complex with 1,8-dithia-4,11-diazacyclotetradecane has been reported, remaining stable under air, light, and in solution. This complex has been studied for its anti-breast CSC activity in both monolayer and three-dimensional cell culture models [91]. The silver compound demonstrated effectiveness against CSCs through multiple mechanisms. It penetrates the cytosol, increases intracellular ROS levels, and triggers caspase-dependent apoptosis, leading to CSC death. The compound was also internalized by breast CSCs, mainly found in the cytoplasm and cell membrane, suggesting that its targets are primarily cytoplasmic biomolecules rather than genomic DNA. Additionally, interaction studies revealed that the compound forms insoluble precipitates with thiol-containing biomolecules, such as proteins [39]. These combined mechanisms, including cellular entry, ROS elevation, and interactions with biomolecules, contribute

to the efficacy of the silver compound in eradicating CSCs, offering novel insights into therapeutic strategies targeting these resistant cells.

3.1.8. Osmium

These complexes operate through distinct mechanisms compared to platinum-based drugs, offering diverse cytotoxicity profiles and the ability to overcome both intrinsic and acquired resistance commonly observed in various tumors [92]. Although osmium's reputation for high toxicity has limited its exploration as an anticancer agent [81], recent advancements have highlighted promising compounds. Half-sandwich “piano-stool” osmium (II) arene complexes have shown significant in vitro activity without encountering cisplatin cross-resistance [93]. Additionally, osmium (VI) nitride compounds with tridentate Schiff bases and monodentate azole heterocycle ligands have demonstrated potential in both in vitro and in vivo studies [29].

A half-sandwich complex $[\text{Os}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$ (Os(II) complex) [p-cym = 1-methyl-4-(propan-2-yl)benzene (*p*-cymene), bphen = 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline (bathophenanthroline); dca = dichloroacetate] demonstrated remarkable activity against highly aggressive triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231) [94]. Consequently, this prompted an investigation into the in vitro efficacy of these Os (II) half-sandwich complexes against human breast CSCs (hBCSCs). The findings revealed that the mentioned Os (II) complex exhibits greater effectiveness against hBCSCs compared to conventional salinomycin, a well-established potent CSC agent recognized for its selective potency against CSCs [95,96].

Research on osmium (VI) nitride complexes identified a complex with notable potential, effectively reducing CSCs in breast cancer cell populations and inhibiting mammosphere formation, showing results similar to salinomycin, a known CSC-targeting agent [54]. Mechanistic studies revealed that the complex induces DNA damage and endoplasmic reticulum stress, which is key to its selectivity for CSCs. Further studies demonstrated that an Os (II) complex with a dca ligand also eradicated CSCs in MCF-7 and SKBR-3 human breast cancer cells, targeting CD44-positive, CD24-negative CSC-like cells and inhibiting mammosphere formation. The Os (II) complex was more effective than salinomycin in eliminating CSCs from these cell populations [48].

Encouragingly, the CSC-specific potency displayed by osmium (II) complexes poses a challenge to some of the most CSC-selective compounds identified to date. Additionally, they inhibit mammosphere formation by specifically targeting CD44-positive CSC-like cells. Considering these discoveries and the pressing medical necessity for CSC-specific chemotherapies to combat cancer relapse and metastasis formation in clinical settings, the anti-CSC properties of osmium (II) complexes hold significant preclinical promise for the development of new research endeavors [54].

3.1.9. Ruthenium

Ruthenium complexes containing bipyridine and terpyridine ligands, along with an exchangeable (reactive) coordination site ($[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy})\text{X}]^{\text{n}+}$), can interact with solvent-accessible guanines in DNA. Unlike other standard DNA metallating agents, such as cisplatin, these complexes exhibit kinetically controlled reactivity with DNA, likely due to the steric bulk provided by their ruthenium ligands, which also facilitates exceptional chemoselectivity. Furthermore, these ruthenium complexes have been shown to effectively bind solvent-exposed guanines at adjacent positions in four-stranded guanine–DNA quadruplexes. Detailed mechanistic studies with pancreatic tumor stem cells have demonstrated that ruthenium complexes can specifically target mitochondria and interact with their DNA [31,61].

Ru (II)–p-cymene complexes derived from mesalazine derivatives demonstrate regulatory effects on stemness gene expression in CSCs through unique properties and interactions. These complexes effectively inhibit the growth of colon CSC spheroids by targeting specific genes involved in stemness regulation. They have been observed to downregulate key stemness regulators, such as SOX2, KLF4, and Oct4 in CSCs, disrupting their self-renewal and survival mechanisms. Additionally, the complexes modulate the expression of efflux transporters such as ABCG2, which contribute to drug resistance in CSCs, potentially overcoming mechanisms that aid cancer cell survival during chemotherapy. Unlike oxaliplatin, these complexes do not enhance the expression of HES-1, a crucial gene in the Notch signaling pathway implicated in colorectal cancer self-renewal and tumorigenicity, suggesting they may disrupt the signaling mechanisms supporting cancer stemness [41]. Overall, the mechanism by which these complexes regulate the expression of stemness genes in CSCs involves inhibiting key regulators, modulating efflux transporter activity, and potentially interfering with signaling pathways that maintain stem cell properties.

3.1.10. Gold

Gold complexes have demonstrated promising anticancer activity in several cancer cell lines, including lung cancer (A549), breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3), osteosarcoma (MG-63), and ovarian cancer (A2780 and A2780cis). Studies suggest that the cytotoxicity of gold(I)–carbene complexes, particularly those containing the IPr moiety, is associated with a more lipophilic nature and enhanced mitochondrial disruption. For example, cationic bis–carbene complexes, such as $[\text{Au}(\text{IPr})_2]\text{BF}_4$, have been found to be more effective than their neutral counterparts, such as $[\text{Au}(\text{IPr})\text{Cl}]$, in inducing cancer cell death, mediated by apoptotic pathways. Furthermore, dinuclear gold(I) complexes based on carbene and diphosphane ligands, such as the bis [2-(dicyclohexylphosphane)ethyl] amine complex, have demonstrated potent cytotoxic activity against several cell lines. These complexes showed comparable antitumor efficacy against cisplatin-sensitive ovarian cancer cells (A2780) and against A2780cis cells, a cisplatin-resistant epithelial human ovarian cell line [32].

Gold complexes interact with redox control system proteins and/or the proteasome machinery, suggesting that their anticancer activity primarily stems from these two targets [97]. Specifically, gold (I) complexes can bind to the selenocysteine residue at the C-terminal active site of the enzyme thioredoxin reductase (TrxR), a well-known target for the cytotoxic effects of gold compounds [98]. TrxR acts as a scavenger of oxidants and free radicals, providing protection against oxidative stress damage. Additionally, another significant target for various gold complexes is the 20S proteasome. As the central component of the protein degradation machinery, known as the ubiquitin–proteasome system (UPS), its inhibition by gold (I) complexes can disrupt protein homeostasis and impair cell survival [99,100].

4. Discussion

- Antitumor Activity of Coordination Complexes Against Cancer Stem Cells: A Cytotoxic Perspective

The results presented in Table 3 reveal significant variations in the cytotoxic efficacy of the tested metal complexes, as evidenced by the IC_{50} values across different cancer cell lines and populations enriched in cancer stem cells. Platinum-based compounds, such as tri-platinum (II) and mononuclear complexes, exhibited low IC_{50} values in breast cancer cell lines, suggesting high potency, particularly against CSC-enriched mammospheres. This effect is likely related to these compounds' ability to intercalate DNA

and induce direct genotoxic stress, thereby triggering mitochondrial-dependent (intrinsic) apoptotic pathways.

In contrast, copper complexes, especially those coordinated with phenanthroline ligands and NSAID derivatives, showed more variable efficacy, highlighting that cytotoxic potential is strongly influenced by the chemical nature of the ligand and its capacity to generate reactive oxygen species, which contribute to apoptosis via oxidative stress and disruption of redox homeostasis. Additionally, the differential sensitivity observed among HMLER, HMLER-shEcad, and mammosphere cultures suggests that CSC-associated markers (e.g., CD44⁺/CD24[−]) and cellular context play key roles in modulating therapeutic response. Lower IC₅₀ values in CSC-enriched models imply greater compound selectivity or enhanced vulnerability of CSCs to specific metal-based agents. These findings underscore the relevance of tumor phenotype and microenvironment in evaluating compound efficacy. Although molecular mechanisms require further elucidation, evidence from the literature indicates that metal complexes can activate multiple cell death pathways, including caspase cascade activation, mitochondrial dysfunction, and ROS-mediated apoptosis—mechanisms differentially modulated by the chemical structure of the complex and the biological features of the target cells.

Despite the promising cytotoxic profiles of metal-based complexes against CSCs, a comprehensive assessment of their safety remains critical. Metal coordination compounds, such as those based on copper, cobalt, platinum, and iridium, can exhibit substantial toxicity toward non-cancerous cells. For instance, the copper (II)–phenanthroline complexes evaluated by Vasconcelos et al. demonstrated remarkable potency against CSC-enriched HMLER-shEcad mammospheres (IC₅₀ = 0.11 μM); yet, they showed comparable cytotoxicity in non-tumorigenic HEK293 cells (IC₅₀ = 0.09 μM), indicating limited selectivity [34]. Similarly, the silver (I) polymeric complex analyzed was active against CSCs (IC₅₀ = 12.95 μM) but also induced cytotoxicity in normal human bronchial epithelial cells (BEAS-2B, IC₅₀ = 8.66 μM) and non-tumorigenic mammary cells (MCF-10A, IC₅₀ = 10.12 μM) [37]. These findings raise concerns about the therapeutic window and cellular specificity of such compounds. Furthermore, the risks of bioaccumulation and systemic toxicity present significant challenges for clinical translation. For example, some copper and cobalt complexes displayed inconsistent selectivity across cell types, maintaining considerable toxicity toward normal cells despite modest anticancer effects [39]. The literature also reports adverse effects commonly associated with platinum and nickel-based agents, such as nephrotoxicity and neurotoxicity, often mediated by oxidative stress, mitochondrial dysfunction, or DNA adduct formation. Therefore, future studies should prioritize rigorous in vitro and in vivo toxicity evaluations and explore strategies to enhance tumor selectivity, including nanoparticle delivery systems, controlled-release formulations, or conjugation with ligands targeting CSC-specific markers, to minimize off-target effects and improve translational potential.

- Mechanisms of action of metal complexes leading to induced cell death

Recent studies have highlighted the therapeutic potential of metal complexes, particularly copper (II) complexes, in targeting cancer stem cells (CSCs). Complexes containing terpyridine and p-toluene sulfonamide ligands have demonstrated the ability to penetrate breast CSCs, accumulating in the cytoplasm and elevating intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. This oxidative stress partially disrupts the endoplasmic reticulum, triggering apoptosis [33]. Similarly, binuclear copper (II)–phenanthroline complexes induce rapid ROS elevation, leading to oxidative DNA damage and caspase-dependent apoptotic pathways [34].

The overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in cancer cells contributes to tumor proliferation and resistance to conventional chemo- and radiotherapies. Its pivotal role in

CSC biology, mediating tumor repopulation and metastasis, makes COX-2 an attractive molecular target for CSC-directed therapies [33]. In this context, copper (II)–NSAID complexes have been structurally optimized to maintain biological stability while effectively inducing apoptosis in breast CSCs through ROS generation and COX-2 inhibition [46,47]. The cytotoxicity is attributed to ROS production, possibly via Fenton-like reactions catalyzed by reduced copper species, while the released NSAID ligands inhibit COX-2 activity, reinforcing the dual mechanism of action. Moreover, tetranuclear copper (II) complexes have exhibited efficacy in simultaneously eliminating bulk tumor cells and CSCs, suggesting enhanced therapeutic scope [52]. This dual activity is further supported by cobalt (III)–polypyridyl complexes conjugated with diflunisal, which downregulate COX-2 expression and contribute to cytotoxic effects [49].

Beyond apoptosis, some metal complexes induce immunogenic cell death (ICD) in breast CSCs, enhancing their clearance by macrophages. For instance, binuclear copper (II)–NSAID complexes promote ICD markers, such as extracellular ATP and HMGB-1 release, while cobalt (III)–cyclam conjugates with flufenamic acid exhibit similar immunotherapeutic potential [30,55]. This immunogenic mechanism opens avenues for combinatorial strategies integrating metal complexes with immune modulation.

Nickel (II) complexes with polypyridyl ligands and NSAIDs also induce necroptosis, a programmed immunogenic cell death pathway linked to COX-2 signaling [35]. The reduction in cytotoxicity upon necroptosis inhibition underscores the pathway's involvement in CSC death [42].

Platinum (II) and palladium (II) complexes efficiently penetrate mammospheres, damaging genomic DNA and activating caspase-dependent apoptosis, thereby targeting CSC populations [39]. Bioinspired macrocyclic copper (II) complexes similarly induce ROS, inhibit COX-2, and activate JNK and p38 pathways, culminating in apoptosis [37].

Notably, iridium (III) cyclometalated complexes selectively localize to mitochondria in glioma stem cells, inducing apoptosis via mitochondrial membrane depolarization, ROS elevation, and caspase activation [40,53].

Given the increasing resistance of CSCs to apoptosis, alternative cell death pathways have gained attention. A nickel (II)–dithiocarbamate–phenanthroline complex triggers necroptosis in breast CSCs via plasma membrane disruption and mitochondrial depolarization, independent of ROS or PARP-1 activity but dependent on RIP1–RIP3–MLKL necrosome assembly [5]. Likewise, osmium (II) complexes induce necroptosis, while ruthenium (II) complexes combined with salinomycin inhibit both necroptosis and apoptosis. This functional divergence may relate to osmium (II)'s capacity to transport biologically active dichloroacetic acid intracellularly [48].

Together, these findings illustrate the versatility of metal complexes as multifaceted agents capable of disrupting cancer stem cell (CSC) survival through various mechanisms, including induction of oxidative stress, DNA damage, caspase activation, COX-2 inhibition, immune modulation, necroptosis, and immunogenic cell death. The ability of these compounds, particularly those based on copper, nickel, cobalt, and noble metals, to simultaneously target multiple cellular pathways, such as reactive oxygen species (ROS) generation and activation of the JNK/p38 pathways, reinforces their potential as therapeutic agents directed at CSCs, which are responsible for tumor resistance and relapse. The integration of both apoptotic and non-apoptotic cell death pathways, combined with immunogenic effects, highlights the promising role of these complexes in the development of advanced and more effective CSC-targeted therapies.

However, despite significant *in vitro* advances, the translation of these findings into *in vivo* models remains limited, constraining the evaluation of systemic impact, bioavailability, and toxicity of these complexes. Furthermore, although selective targeting of CSCs

has been suggested, few studies have thoroughly investigated the molecular mechanisms conferring this selectivity, highlighting the need for deeper research to minimize the side effects on normal cells. Another relevant aspect is the complexity of the involved cell death pathways, such as necroptosis and immunogenic cell death, which represent promising strategies to overcome apoptosis resistance.

Therefore, the integration of various pathways associated with cell death underscores the potential of metal complexes as promising strategies for the targeted treatment of tumor stem cells. The majority of analyzed studies have identified this interaction, presenting significant mechanistic insights that demonstrate interference in oxidative stress, which is closely linked to apoptosis, DNA fragmentation, activation of caspases, among other pathways.

- Modulation of tumor stem cell markers by the metallocomplex

The markers of tumor stem cells are crucial molecules or proteins that confer stem-cell-like properties to cancer cells, serving as essential tools for identification, characterization, and therapeutic targeting. Their expression profiles vary significantly according to the tumor type and progression stage, reflecting the inherent complexity and heterogeneity of CSC biology. Among the most frequently reported markers in the analyzed studies are Epcam, CD44, CD133, CD24, SOX2, KLF4, Oct4, CXCR4, NOTCH1, ALDH1, and HES1 [31,32,36,41,48,54].

Experimentally, CSC enrichment was predominantly achieved by selecting cells expressing specific surface markers. For instance, the HMLER breast cancer cell line, which naturally overexpresses CD44, was treated with low-dose paclitaxel (10 nM for four days), leading to a subpopulation enriched in CD44+ cells (>30%), termed HMLER fiscal cells [54]. This approach effectively mimics chemoresistance-driven CSC enrichment, emphasizing the plasticity of tumor cells under therapeutic pressure. Similarly, human rhabdomyosarcoma RD cells enriched for CD133+ expression demonstrated enhanced self-renewal capacity, as evidenced by increased single-cell spheroid formation compared to their CD133- counterparts [36]. This highlights the functional relevance of CD133 as a CSC marker associated with tumor propagation.

In colon cancer models, contrasting effects of conventional chemotherapeutics and metal-based complexes on CSC populations were reported. Oxaliplatin reduced spheroid size but paradoxically increased the expression of stemness-related genes and the ABCG2 transporter, suggesting an inadvertent enrichment of CSC-like traits and potential chemoresistance [41]. Conversely, salinomycin also diminished spheroid size but without elevating stemness markers, indicating selective cytotoxicity against CSCs. Notably, ruthenium complexes, such as $[\text{Ru}(\text{II})(\text{p-cymene})\text{X}_2]^{2+}$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{I}$), demonstrated potent inhibition of CSC growth without upregulating ABCG2 or stemness genes, underscoring their promise as more targeted anti-CSC agents.

Lung cancer studies further reveal the complex interplay between metal complexes and CSC markers. The treatment of A549 cells with a gold(I) complex reduced ALDH1 enzymatic activity and lowered CD133 expression, the key indicators of CSC presence and function. The same complex also decreased CD44 levels, impacting cell adhesion, growth, resistance to cisplatin, and metastatic potential [32,101]. However, an unexpected upregulation of the immunosuppressive molecule PD-L1 was observed, which may complicate therapeutic outcomes by facilitating immune evasion. Importantly, a dose-dependent reduction in NOTCH1 expression was noted, suggesting interference with a critical CSC regulatory pathway linked to chemotherapy resistance and poor prognosis.

In breast cancer, cisplatin treatment of MCF-7 cells slightly increased the CSC-enriched CD44+/CD24− subpopulation, indicating potential CSC enrichment after therapy. Ruthenium complexes $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$ showed limited efficacy in reducing this

CSC fraction, whereas salinomycin and osmium complexes $[\text{Os}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$ significantly decreased the CD44⁺/CD24[−] population, pointing to their superior potential for CSC targeting [48]. Complementary analyses of SKBR-3 cells revealed that osmium complexes were more effective than ruthenium in reducing ALDH-positive CSC-like cells, suggesting that subtle variations in metal center and ligand environment can critically influence CSC selectivity and therapeutic efficacy.

In vivo investigations provide encouraging, albeit preliminary, evidence of metal complexes' additive or synergistic effects when combined with established chemotherapeutics. For example, ruthenium complexes combined with gemcitabine in pancreatic ductal adenocarcinoma (Panc185) models not only delayed tumor growth but also significantly reduced EpCAM⁺ epithelial tumor cells and the CD133⁺ and CD133⁺/CXCR4⁺ CSC subpopulations, reinforcing the translational relevance of these compounds [31]. Similar growth inhibition was observed in colorectal and osteosarcoma models, tumors known to be driven by CSC populations, further validating ruthenium complexes as promising agents for multi-targeted cancer therapies [102].

Taken together, these findings illustrate the multifaceted abilities of metal complexes, especially those based on ruthenium, osmium, gold, and other transition metals, to modulate key CSC markers and functions across various tumor types. However, the heterogeneous responses, such as paradoxical marker upregulation or immunosuppressive effects, highlight the need for comprehensive mechanistic studies to optimize their clinical utility and minimize unintended consequences. Moreover, the selective targeting of CSCs versus bulk tumor cells remains an ongoing challenge requiring further elucidation of underlying molecular pathways. Addressing these gaps will be critical for advancing metal complexes from promising in vitro tools to effective and safe CSC-directed therapies in clinical oncology.

- Limitations, Translational Challenges, and Future Research Opportunities

Although the 27 studies included in this review all focus on cancer stem cells, a key limitation lies in the relatively small number of investigations that specifically assess the effects of metal-based compounds directly on CSC populations. This reflects a broader gap in the literature and underscores the need for further research dedicated exclusively to this subpopulation, particularly through robust and targeted experimental models.

Despite this limitation, selected studies show promising in vitro results against CSCs. However, the clinical application of these metal-based compounds remains a challenge. One major barrier is the paucity of preclinical and clinical studies evaluating CSC-targeted agents, which hinders a comprehensive understanding of their efficacy and safety in vivo. Furthermore, the inherent complexity of CSC biology, including phenotypic plasticity, tumor heterogeneity, and resistance mechanisms, requires further investigation to guide the rational design of selective and effective therapies. Other obstacles include pharmacokinetic limitations, potential off-target toxicity, and regulatory challenges commonly associated with metal-based therapies.

Nonetheless, the findings compiled in this review identify relevant molecular targets and suggest innovative strategies that may inform future translational research. By enhancing our understanding of CSC-specific pathways, these compounds hold potential to contribute to the development of more effective and personalized anticancer therapies. Therefore, while acknowledging the current scarcity of highly focused studies, this review offers valuable insights and reinforces the importance of expanding research in this emerging and promising field.

Despite valuable insights, it is important to recognize that the current literature on metal complexes specifically tested in cancer stem cells remains limited. Most studies to date involve in vitro models with small sample sizes, and although the results are promising, the

lack of broader, standardized protocols limits the generalizability and clinical applicability of the results. Therefore, future studies should aim to validate these mechanisms in more diverse CSC populations and in clinically relevant *in vivo* models. Furthermore, expanding the study of how metal complexes affect CSC-related pathways, such as immunogenic cell death, mitochondrial disruption, and necroptosis, may uncover novel therapeutic targets. Exploring the synergistic effects of metal complexes with standard therapies and immune modulators may also pave the way for combination strategies with greater translational potential. These directions may help overcome CSC-associated resistance and recurrence, ultimately enhancing treatment outcomes.

5. Conclusions

The studies examined in this systematic review provide substantial evidence that stem cell subpopulations within cancerous tumors are impacted by treatments involving metal coordination compounds, either synthesized alone or in combination with other molecules. Notably, nearly all reviewed studies used the *in vitro* formation of stem cells as a strategic approach, achieved through the use of nutrient-enriched culture media, which promotes the expression of stem cell markers in cancer-derived cells. Although there is a growing understanding of the factors influencing the response to coordination compound treatments in cells exhibiting stem-cell-like characteristics, it remains essential to emphasize the need for further research, particularly *in vivo* studies that replicate the complexity of biological processes. Additionally, a multifaceted approach is necessary to refine therapeutic strategies and improve clinical outcomes for patients with various cancer types.

In the general screening conducted to assess the cytotoxicity of various complexes, the most promising candidates were identified as follows: copper (II)–phenanthroline complexes demonstrated potent activity in breast tumor cells (HMLER-shEcad mammospheres); nickel (II)–flufenamic acid complexes, combined with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline, showed significant effects in osteosarcoma tumor stem cells; the platinum complex (cis,trans,cis-[Pt(NH₃)₂(cinn)₂Cl₂] (2)) exhibited notable cytotoxicity in rhabdomyosarcoma tumor cells; Ru (II)–p-cymene complexes, featuring an imidazole-mesalazine Schiff base (II), were effective in colorectal cancer tumor stem cells; and dinuclear gold complexes (I) displayed strong cytotoxic potential in lung tumor stem cells.

Only two lines of research have advanced their investigations with the complexes in mouse models. In an immunocompetent 4T1 mouse model of metastatic triple-negative breast cancer, treatment with a cobalt (III)–cyclam complex conjugated to two flufenamic acid moieties demonstrated promising *in vivo* effects. The treated group exhibited a significant reduction in lung tumor colonization compared to the control group, suggesting that the complex effectively prevents the metastasis of breast cancer cells to the lungs. No significant differences in organ cellularity, including the heart, liver, spleen, or kidneys, were observed between the treated and control groups, indicating a favorable safety profile. Overall, the results show that the cobalt (III)–cyclam complex with flufenamic acid is effective in reducing tumor growth and inhibiting lung metastasis without inducing significant systemic toxicity [31].

Additionally, the ruthenium complex [Ru(terpy)(bpy)(H₂O)]Cl₂ was evaluated in a syngeneic *in vivo* model of pancreatic ductal adenocarcinoma, demonstrating promising tumor growth inhibition by disrupting ATP generation. However, its exact mechanism of action remains unclear, although it is likely not mediated through the inhibition of CSCs. Preliminary experiments indicate that both complexes show effective *in vivo* activity, highlighting their significant preclinical potential.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics17070931/s1>, Table S1: Descriptors used in the search strategy, Table S2: Critical analysis of preclinical studies, Table S3: Methodologies used in research, Graph S1: Quality analysis of all articles selected for systematic review, grouped by percentage of responses on the Likert scale.

Author Contributions: M.M.K. conceived the idea for the manuscript, supervised the development of the study, and critically reviewed the manuscript; A.C.M.B. conducted the systematic review, data analysis, manuscript writing, and coordinated the formatting; A.C.M.B., L.E.C.V.B. and M.N.A.C. critically reviewed the selected articles, assessing the suitability and quality of the included studies, and resolved disagreements during peer analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by FAPERJ (Rio de Janeiro State Research Support Foundation) and funding from PAPIC UENF (SEI-260002/007142/2024).

Acknowledgments: During the preparation of this manuscript, the authors, ACMB and MMK, utilized ChatGPT-4.0 to assist with grammar, spelling, and coherence in English. The authors have thoroughly reviewed the text and assume full responsibility for the content of this publication.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **2024**, *74*, 229–263. [\[CrossRef\]](#)
2. World Health Organization. *Cancer: Fact Sheet [Internet]*; WHO: Geneva, Switzerland, 2022; Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 28 June 2025).
3. Nguyen, L.V.; Vanner, R.; Dirks, P.; Eaves, C.J. Cancer stem cells: An evolving concept. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 133–143. [\[CrossRef\]](#)
4. Das, P.K.; Pillai, S.; Md Rakib, A.; Khanam, J.A.; Gopalan, V.; Lam, A.K.Y.; Islam, F. Plasticity of cancer stem cell: Origin and role in disease progression and therapy resistance. *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**, *16*, 397–412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Garcia-Mayea, Y.; Mir, C.; Masson, F.; Paciucci, R.; Leonart, M.E. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *60*, 166–180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Marcu, L.G. Cancer stem cells as therapeutic targets of pancreatic cancer. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2020**, *34*, 200–201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Zhao, J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol Ther.* **2016**, *160*, 145–158. [\[CrossRef\]](#)
8. Greaves, M.; Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **2012**, *481*, 306–313. [\[CrossRef\]](#)
9. Chikamatsu, K.; Takahashi, G.; Sakakura, K.; Ferrone, S.; Masuyama, K. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44⁺ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck* **2012**, *34*, 336–343. [\[CrossRef\]](#)
10. Prince, M.E.P.; Ailles, L.E. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 2871–2875. [\[CrossRef\]](#)
11. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46. [\[CrossRef\]](#)
12. Krishnamurthy, S.; Nör, J.E. Head and neck cancer stem cells. *J. Dent. Res.* **2012**, *91*, 334–340. [\[CrossRef\]](#)
13. Peiris-Pagés, M.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Pestell, R.G.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*, 55. [\[CrossRef\]](#)
14. Furno, E.L.; van der Laan, S.; Maiorano, D. Genomic instability of pluripotent stem cells: Origin and consequences. In *Pluripotent Stem Cells—From the Bench to the Clinic*; Tomizawa, M., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2016.
15. Cao, R.; Jia, J.; Ma, X.; Zhou, M.; Fei, H. Novel copper complexes with anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3636–3644. [\[CrossRef\]](#)
16. Feng, Y.X.; Sokol, E.S.; Del Vecchio, C.A.; Sanduja, S.; Claessen, J.H.; Proia, T.A.; Jin, D.X.; Reinhardt, F.; Ploegh, H.L.; Wang, Q. Cancer stem cells and therapeutic resistance in breast cancer. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 702–715. [\[CrossRef\]](#)
17. Heddleston, J.M.; Li, Z.; Lathia, J.D.; Bao, S.; Hjelmeland, A.B.; Rich, J.N. Cancer stem cells in glioblastoma multiforme and their role in resistance to therapy. *Ir. J. Med. Sci.* **2010**, *102*, 789–795.
18. Korkaya, H.; Paulson, A.; Charafe-Jauffret, E.; Ginestier, C.; Brown, M.; Dutcher, J.; Clouthier, S.G.; Wicha, M.S.; Jordan, C.T. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ β -Catenin signaling. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

19. Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3983–3988. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Kaiser, J.A. Cancer stem cells and the fight against cancer. *Science* **2015**, *347*, 226–229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Beck, B.; Blanpain, C. Unraveling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 727–738. [\[CrossRef\]](#)
22. Batlle, E.; Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1124–1134. [\[CrossRef\]](#)
23. Guo, S.; Zheng, S.; Liu, M.; Wang, G. Novel anti-cancer stem cell compounds: A comprehensive review. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 1024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Kostova, I. Anticancer metallocenes and metal complexes of transition elements from groups 4 to 7. *Molecules* **2024**, *29*, 824. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Abdolmaleki, S.; Aliabadi, A.; Khaksar, S. Unveiling the promising anticancer effect of copper-based compounds: A comprehensive review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2024**, *150*, 213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
26. PRISMA Statement. Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses. Available online: <http://www.prisma-statement.org/> (accessed on 3 June 2025).
27. Brasil Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Saúde Ambiental, do Trabalhador e Vigilância das Emergências em Saúde Pública. *Training of Tutors in Field Epidemiology: Module 03—Introduction to Scientific Communication*; Ministry of Health: Brasília, Brazil, 2022.
28. Fang, J.; Gerschel, P.; Singh, K.; Apfel, U.P.; Suntharalingam, K. Cobalt(III)-macrocyclic scaffolds with anti-cancer stem cell activity. *Molecules* **2024**, *29*, 2743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
29. Ni, W.X.; Cara, W.L.; Yiu, S.M.; Ei, C.; Cheung, M.T.W.; Ko, C.C.; Che, C.M.; Lam, Y.W.; Lau, T.C. Anticancer activities of copper(II) complexes containing thiosemicarbazones and their potential applications. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1582–1588. [\[CrossRef\]](#)
30. Li, Y.; Fang, J.; Zhang, Y.; Suntharalingam, K. An immunogenic anti-cancer stem cell bi-nuclear copper(II)-flufenamic acid complex. *Dalton Trans.* **2024**, *53*, 6410–6415. [\[CrossRef\]](#)
31. Alcalá, S.; Villarino, L.; Couceiro, J.R.; Martinez-Calvo, C.; Palencia-Campos, A.; Navarro, D.; Cabezas-Sainz, P.; Rodriguez-Arabaolaza, I.; Cordero-Barreal, A.; Trilla-Fuertes, L.; et al. Targeting cancer stem cell OXPHOS with tailored ruthenium complexes as a new anti-cancer strategy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2024**, *43*, 33. [\[CrossRef\]](#)
32. Casagrande, N.; Borghese, C.; Colombatti, A.; Aldinucci, D. Dinuclear gold(I) complexes based on carbene and diphosphane ligands: Bis [2-(dicyclohexylphosphano)ethyl]amine complex inhibits the proteasome activity, decreases stem cell markers and spheroid viability in lung cancer cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2023**, *28*, 751–766. [\[CrossRef\]](#)
33. Singh, K.; Northcote-Smith, J.; Singh, K.; Suntharalingam, K. Cancer stem cell activity of copper(II)-terpyridine complexes with aryl sulfonamide groups. *Dalton Trans.* **2023**, *52*, 9694–9704. [\[CrossRef\]](#)
34. Osei, P.B.; Northcote-Smith, J.; Fang, J.; Singh, K.; Ortu, F.; Suntharalingam, K. The bulk breast cancer cell and breast cancer stem cell activity of binuclear copper(II)-phenanthroline complexes. *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202301188. [\[CrossRef\]](#)
35. Passeri, G.; Northcote-Smith, J.; Perera, R.; Gubic, N.; Suntharalingam, K. An osteosarcoma stem cell potent nickel(II)-polypyridyl complex containing flufenamic acid. *Molecules* **2022**, *27*, 3277. [\[CrossRef\]](#)
36. Markova, L.; Heger, Z.; Kasparkova, J.; Brabec, V. Dipyrrophenazine iridium(III) complex as a phototoxic cancer stem cell selective, mitochondria targeting agent. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *360*, 109955. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Johnson, A.; Cressey, P.B.; Boodram, J.N.; Suntharalingam, K. A bioinspired redox-modulating copper(II)-macrocyclic complex bearing non-steroidal anti-inflammatory drugs with anti-cancer stem cell activity. *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 5904–5912. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Erkisa, M.; Tüzün, B.; Gençler Özkan, A.M.; Ari, F. Combination of histone deacetylase inhibitor with Cu(II) 5,5-diethylbarbiturate complex induces apoptosis in breast cancer stem cells: A promising novel approach. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2021**, *21*, 1850–1860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Johnson, A.; Cressey, P.B.; Suntharalingam, K. A dithiacyclam-coordinated silver(I) polymer with anti-cancer stem cell activity. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 5779–5783. [\[CrossRef\]](#)
40. Peng, W.; Hegazy, A.M.; Jiang, N.; Chen, X.; Qi, H.-X.; Zhao, X.-D.; Pu, J.; Ye, R.-R.; Li, R.-T. Identification of two mitochondrial-targeting cyclometalated iridium(III) complexes as potent anti-glioma stem cells agents. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *203*, 110909. [\[CrossRef\]](#)
41. Acharya, S.; Gupta, S.; Anjali, B.; Govind, C.; Pandey, D.S. Inhibition of 3D colon cancer stem cell spheroids by cytotoxic Ru II-p-cymene complexes of mesalazine derivatives. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5421–5424. [\[CrossRef\]](#)
42. Feld, C.J.; Cressey, P.B.; Suntharalingam, K. Breast cancer stem cell potency of nickel(II)-polypyridyl complexes containing non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 14011–14017. [\[CrossRef\]](#)
43. Xiao, Z.; Johnson, A.; Singh, K.; Suntharalingam, K. The discrete breast cancer stem cell mammosphere activity of group 10-bis(azadiphosphine) metal complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 6704–6709. [\[CrossRef\]](#)

44. Zajac, J.; Novohradsky, V.; Markova, L.; Brabec, V.; Kasparkova, J. Platinum (IV) derivatives with cinnamate axial ligands as potent agents against both differentiated and tumorigenic cancer stem rhabdomyosarcoma cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3329–3335. [[CrossRef](#)]
45. Eskandari, A.; Suntharalingam, K. A tri-metallic palladium complex with breast cancer stem cell potency. *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 4211–4215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Shin, J.; Eskandari, A.; Suntharalingam, K. Modulating the chemical and biological properties of cancer stem cell-potent copper(II)-nonsteroidal anti-inflammatory drug complexes. *Molecules* **2019**, *24*, 1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhang, Z.; Wang, H.; Yan, M.; Wang, H.; Zhang, C. Effects of copper on cell proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 3–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Novohradsky, V.; Markova, L.; Kosthunova, H.; Trávníček, Z.; Brabec, V.; Kasparkova, J. An anticancer Os(II) bathophenanthroline complex as a human breast cancer stem cell-selective, mammosphere potent agent that kills cells by necroptosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13327. [[CrossRef](#)]
49. Abe, D.O.; Eskandari, A.; Suntharalingam, K. Diflunisal-adjointed cobalt(III)-polypyridyl complexes as anti-cancer stem cell agents. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 13761–13765. [[CrossRef](#)]
50. Laws, K.; Hanna, L.; Fisher, A.; Lumb, I.; Pickett, J.; Suntharalingam, K. Highly charged, cytotoxic, cyclometalated iridium(III) complexes as cancer stem cell mitochondriotropics. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 15205–15210. [[CrossRef](#)]
51. Lu, C.; Eskandari, A.; Cressey, P.B.; Suntharalingam, K. Cancer stem cell and bulk cancer cell active copper(II) complexes with vanillin Schiff base derivatives and naproxen. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 11366–11374. [[CrossRef](#)]
52. Lu, C.; Laws, K.; Eskandari, A.; Suntharalingam, K. A reactive oxygen species-generating, cyclooxygenase-2 inhibiting, cancer stem cell-potent tetranuclear copper(II) cluster. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 12785–12789. [[CrossRef](#)]
53. Eskandari, A.; Boodram, J.N.; Cressey, P.B.; Lu, C.; Bruno, P.M.; Hemann, M.T.; Suntharalingam, K. The breast cancer stem cell potency of copper(II) complexes bearing nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their encapsulation using polymeric nanoparticles. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 17867–17873. [[CrossRef](#)]
54. Suntharalingam, K.; Lin, W.; Johnstone, T.C.; Bruno, P.M.; Zheng, Y.R.; Hemann, M.T.; Lippard, S.J. A breast cancer stem cell-selective, mammospheres-potent osmium(VI) nitrido complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4606–4611. [[CrossRef](#)]
55. Fang, J.; Xu, Z.; Yu, Y.; Zhang, Y.; Suntharalingam, K. A breast cancer stem active cobalt(III)-cyclam complex containing flufenamic acid with immunogenic potential. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202317940. [[CrossRef](#)]
56. Wang, Y.; Tang, T.; Yuan, Y.; Li, N.; Wang, X.; Guan, J. Copper and copper complexes in tumor therapy. *ChemMedChem* **2024**, *19*, e202400060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jung, S.J.; Lippard, S.J. Targeting and mechanisms of action of platinum-based anticancer drugs. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1387–1407. [[CrossRef](#)]
58. Todd, R.C.; Lippard, S.J. Metallomics: An introduction to the chemistry and biology of metal-based drugs. *Metallomics* **2009**, *1*, 280–291. [[CrossRef](#)]
59. McWhinney, S.R.; Goldberg, R.M.; McLeod, H.L. Molecular cancer therapeutics. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Shrivastav, A.; Singh, N.K.; Singh, S. Role of copper in cancer. *Biometals* **2003**, *16*, 311–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Gasch, C.; Ffrench, B.; O'Donovan, N.; Norris, L.; McCann, A. The role of the copper transporter ATP7A in cancer. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 43. [[CrossRef](#)]
62. Aztopal, N.; Yelekci, K.; Ersan, S.; Gündüz, C.; Kucukoglu, K. Anticancer properties of copper complexes. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 269–276. [[CrossRef](#)]
63. Gibson, D. Multi-action Pt(IV) anticancer agents; do we understand how they work? *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *191*, 77–84. [[CrossRef](#)]
64. Ravera, M.; Gabano, E.; McGlinchey, M.J.; Osella, D. A view on multi-action Pt(IV) antitumor prodrugs. *Inorg. Chim. Acta* **2019**, *492*, 32–47.
65. National Research Council. *Copper in Drinking Water*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2000.
66. Krasnovskaya, O.; Naumov, A.; Guk, D.; Gorelkin, P.; Erofeev, A.; Beloglazkina, E.; Majouga, A. Copper coordination compounds as biologically active agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3965. [[CrossRef](#)]
67. Marzano, C.; Pellei, M.; Tisato, F.; Santini, C. Copper-based compounds as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 185–211. [[CrossRef](#)]
68. Wang, K.; Michelakos, T.; Wang, B.; Shang, Z.; DeLeo, A.B.; Duan, Z.; Hornicek, F.J.; Schwab, J.H.; Wang, X. Targeting cancer stem cells by disulfiram and copper sensitizes radioresistant chondrosarcoma to radiation. *Cancer Lett.* **2021**, *505*, 37–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
69. Molinaro, C.; Martoriati, A.; Pelinski, L.; Cailliau, K. The role of copper in cancer: Insights into a new therapeutic approach. *Cancers* **2020**, *12*, 2863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Antitumor activity of copper complexes. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862. [[CrossRef](#)]

71. Boodram, J.N.; McGregor, I.J.; Bruno, P.M.; Cressey, P.B.; Hemann, M.T.; Suntharalingam, K. Breast cancer stem cell potent copper(II)–non-steroidal anti-inflammatory drug complexes. *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 2895–2900. [\[CrossRef\]](#)
72. Abu-Surrah, A.S.; Kettunen, M. The role of copper in cancer treatment. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1337–1357. [\[CrossRef\]](#)
73. Afrasiabi, Z.; Sinn, E.; Lin, W.; Ma, Y.; Campana, C.; Padhye, S. The effects of copper on cell proliferation and apoptosis in cancer. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1526–1531. [\[CrossRef\]](#)
74. Liu, T.; Sun, X.; Cao, Z. The role of copper in cancer development and therapy. *Onco Targets Ther.* **2019**, *12*, 2605–2614. [\[CrossRef\]](#)
75. Flamme, M.; Cressey, P.B.; Lu, C.; Suntharalingam, K. Induction of necroptosis in cancer stem cells using a nickel(II)-dithiocarbamate phenanthroline complex. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9674–9682. [\[CrossRef\]](#)
76. Snyder, A.G.; Hubbard, N.W.; Messmer, M.N.; Kofman, S.B.; Hagan, C.E.; Orozco, S.L.; Chiang, K.; Daniels, B.P.; Baker, D.; Oberst, A. Intratumoral activation of necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Sci. Immunol.* **2019**, *4*, eaaw2004. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
77. Jollie, D. *Platinum 2008*; Johnson Matthey: Hertfordshire, UK, 2008; pp. 42–43.
78. Liu, Z.; Sadler, P.J. Copper complexes as anticancer agents. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1174–1185. [\[CrossRef\]](#)
79. Hearn, J.M.; Romero-Canellón, I.; Qamar, B.; Liu, Z.; Hands-Portman, I.; Sadler, P.J. Antitumor activity of a copper complex. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1335–1343. [\[CrossRef\]](#)
80. Moromizato, S.; Hisamatsu, Y.; Suzuki, T.; Matsuno, Y.; Abe, R.; Aoki, S. Copper complexes as anticancer agents. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12697–12706. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Venkatesh, V.; Berrocal-Martin, R.; Wedge, C.J.; Romero-Canelón, I.; Sanchez-Cano, C.; Song, J.I. Mitochondria-targeted spin-labelled luminescent iridium anticancer complexes. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8271–8278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Thakur, B.; Ray, P. The role of cancer stem cells in tumor progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Kacar, O.; Sagdinc, S.G.; Sahin, E.; Buyukgungor, O. Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Drugs* **2014**, *25*, 17–29. [\[CrossRef\]](#)
84. Afarinkia, K.; Rauf, S.; Vallis, K.A. The role of copper complexes in cancer therapy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64278.
85. Guney, E.; Yilmaz, V.T.; Sengul, A.; Buyukgungor, O. Copper complexes in cancer treatment. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 438–448. [\[CrossRef\]](#)
86. Singh, B.; Berry, J.A.; Shoher, A.; Ramakrishnan, V.; Lucci, A. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 1393–1399. [\[CrossRef\]](#)
87. Zhong, G.; Wang, X.; Li, J.; Xie, Z.; Wu, Q.; Chen, J.; Wang, Y.; Chen, Z.; Cao, X.; Li, T.; et al. Insights into the role of copper in neurodegenerative diseases and the therapeutic potential of natural compounds. *Curr. Neuropharmacol.* **2024**, *22*, 1650–1671. [\[CrossRef\]](#)
88. Banti, C.N.; Hadjikakou, S.K. Metalomics: The role of metals in biology and medicine. *Metallomics* **2013**, *5*, 569–596. [\[CrossRef\]](#)
89. Gautier, A.; Cisnetti, F. The impact of metal ions on biological systems. *Metallomics* **2012**, *4*, 23–32. [\[CrossRef\]](#)
90. Liang, X.; Liu, Z.; Wei, Q.; Gao, S.; Zhang, L.; Sun, D. Design and synthesis of copper(II) complexes as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 62–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Medvetz, D.A.; Hindi, K.M.; Panzner, M.J.; Ditto, A.J.; Yun, Y.H.; Youngs, W.J. Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole. *Metal-Based Drugs* **2008**, *2008*, 384010. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Štarha, P.; Trávníček, Z.; Vančo, J.; Dvořák, Z. Half-sandwich Ru(II) and Os(II) bathophenanthroline complexes containing a releasable dichloroacetato ligand. *Molecules* **2018**, *23*, 420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Romero-Canelón, I.; Salassa, L.; Sadler, P.J. Targeting cancer with metal-based drugs: A review of the potential of metal-based drugs. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1291–1300.
94. Prakash, R.; Telleria, C.M. Cancer cell repopulation after therapy: Which is the mechanism? *Oncoscience* **2023**, *10*, 14–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
95. Zho, S.; Wang, F.; Wong, E.T.; Fonkem, E.; Hsieh, T.-C.; Wu, J.M.; Wu, E. Salinomycin: A novel anti-cancer agent with known anti-coccidial activities. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4095–4101. [\[CrossRef\]](#)
96. Naujokat, C.; Steinhart, R. Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 950658. [\[CrossRef\]](#)
97. Sulaiman, A.A.A.; Casagrande, N.; Borghese, C.; Corona, G.; Isab, A.A.; Ahmad, S.; Aldinucci, D.; Altaf, M. Design, synthesis, and preclinical activity in ovarian cancer models of new phosphane-gold(I)-N-heterocyclic carbene complexes. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 14424–14440. [\[CrossRef\]](#)
98. Schmidt, C.; Albrecht, L.; Balasupramaniam, S.; Misgeld, R.; Karge, B.; Brönstrup, M.; Prokop, A.; Baumann, K.; Reichl, S.; Ott, I. A gold(I) biscarbene complex with improved activity as a TrxR inhibitor and cytotoxic drug: Comparative studies with different gold metallodrugs. *Metallomics* **2019**, *11*, 533–545. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Li, X.; Huang, Q.; Long, H.; Zhang, L.; Wang, X.; Li, Y. A new gold(I) complex Au(PPh₃)PT is a deubiquitinase inhibitor and inhibits tumor growth. *eBioMedicine* **2019**, *39*, 159–172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

100. Micale, N.; Schirmeister, T.; Ettari, R.; Yousuf, S.; Dal Piaz, F. Selected cytotoxic gold compounds cause significant inhibition of 20S proteasome catalytic activities. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 79–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Lu, Y.; Yang, L.; Li, X.; Suntharalingam, K. Recent development of gold(I) and gold(III) complexes as therapeutic agents for cancer diseases. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 5518–5556. [[CrossRef](#)]
102. Brown, H.K.; Tellez-Gabriel, M.; Heymann, D. Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett.* **2017**, *386*, 189–195. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

APÊNDICE B

Supplementary Material

Table S1 : Descriptors used in the search strategy.

Terms	PubMed (n) Papers	Nature (n) papers	Scielo (n) parpes	Google Scholar (n) parpes
Databases from December 11 to 12, 2023				
"Cancer Stem Cell"	11.925	4512	80	387.00
Coordenation Complex	102.322	1	NF*	6.320.000
Metallic Coordination Compounds	20.814	1556	NF*	669.000
Keyword crossing				
<u>"Cancer Stem Cell" AND coordenation complex OR "Metallic Coordination Compounds"</u>	20.814	2575	80	0
"Cancer Stem Cell" AND Complex	1.161	NF*	NF*	116.000
<u>"Cancer Stem Cell" AND coordenation complex OR Metallocomplexes</u>	90	NF*	NF*	7.780
<u>"Cancer Stem Cell" AND Coordination Complex</u>	61	119	NF*	20.500
Database Update January 27, 2025				
"Cancer Stem Cell"	12.237	4468	163	448.000
Coordenation Complex	110.295	1	NF*	5.060.000
Metallic Coordination Compounds	22.126	1841	NF*	570.000
Keyword crossing				
<u>"Cancer Stem Cell" AND coordenation complex OR "Metallic Coordination Compounds"</u>	22.126	NF*	163	0
"Cancer Stem Cell" AND Complex	1.264	2835	NF*	119.000
<u>"Cancer Stem Cell" AND coordenation complex OR Metallocomplexes</u>	93	NF*	NF*	7.890
<u>"Cancer Stem Cell" AND Coordination Complex</u>	78	136	NF*	7.890

NF*: Not Found

- **Assessment of the quality of articles :** Brasil Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Saúde Ambiental, do Trabalhador e Vigilância das Emergências em Saúde Pública. *Training of Tutors in Field Epidemiology: Module 03—Introduction to Scientific Communication*. Ministry of Health: Brasília, Brazil, 2022.

Critical analysis of preclinical studies

1 - The research question is original

- I totally agree

- b. I agree
- c. Impartial
- d. I disagree
- e. I totally disagree

2 – The research works with ethical principles

- a. I totally agree
- b. I agree
- c. Impartial
- d. I disagree
- e. I totally disagree

3 - The experimental model used was the most

- a. I totally agree
- b. I agree
- c. Impartial
- d. I disagree
- e. I totally disagree

4- The method was clearly

- a. I totally agree
- b. I agree
- c. Impartial
- d. I disagree
- e. I totally disagree

5 - The results were appropriately analyzed and described

- a. I totally agree
- b. I agree
- c. Impartial
- d. I disagree
- e. I totally disagree

6 - The conclusions presented corroborate the answer to the research question

- a. I totally agree
- b. I agree
- c. Impartial
- d. I disagree
- e. I totally disagree

Question 1, you should evaluate whether the research question is novel and relevant to contribute to scientific knowledge, in addition to being plausible and ethical. It should be supported by a coherent and logical theoretical framework to justify the study's development.

Question 2, this involves the principle of the 3 Rs by Russell and Burch (Reduce, Replace, and Refine), which propose reducing the number of animal experiments, minimizing the number of animals used, improving statistical treatment quality, replacing animal use with alternative methods, and refining techniques to reduce animal pain and suffering, including analgesia and asepsis care in procedures. Reflecting on the necessity of using these models is crucial given technological advancements and the availability of various alternative models.

Question 3, you should report all relevant study information such as species, strain, groups (control and experimental), baseline characteristics (body mass, sex, age, cell quantity), culture media, diet, doses,

solutions, reagents (purity, manufacturer), treatment duration (acute/chronic), and any other important information to ensure experiment reproducibility.

Question 4, you should evaluate whether the methodology description demonstrates that the chosen model effectively generates results that confirm the study hypotheses. The model choice should be accurate and justified.

Question 5, in vivo models must have a sufficient sample size for all groups, considering possible losses, which should be reported when they occur (investigation of specimen loss). Baseline differences, such as body mass between groups, should be considered in statistical analysis of models when relevant. In vitro assays should report cell culture contamination and cell viability, and experiments should be conducted in triplicate. These aspects guide methodological quality in studies and contribute to presenting reliable results.

Question 6, the conclusion must reference the research objectives, regardless of the methodology used.

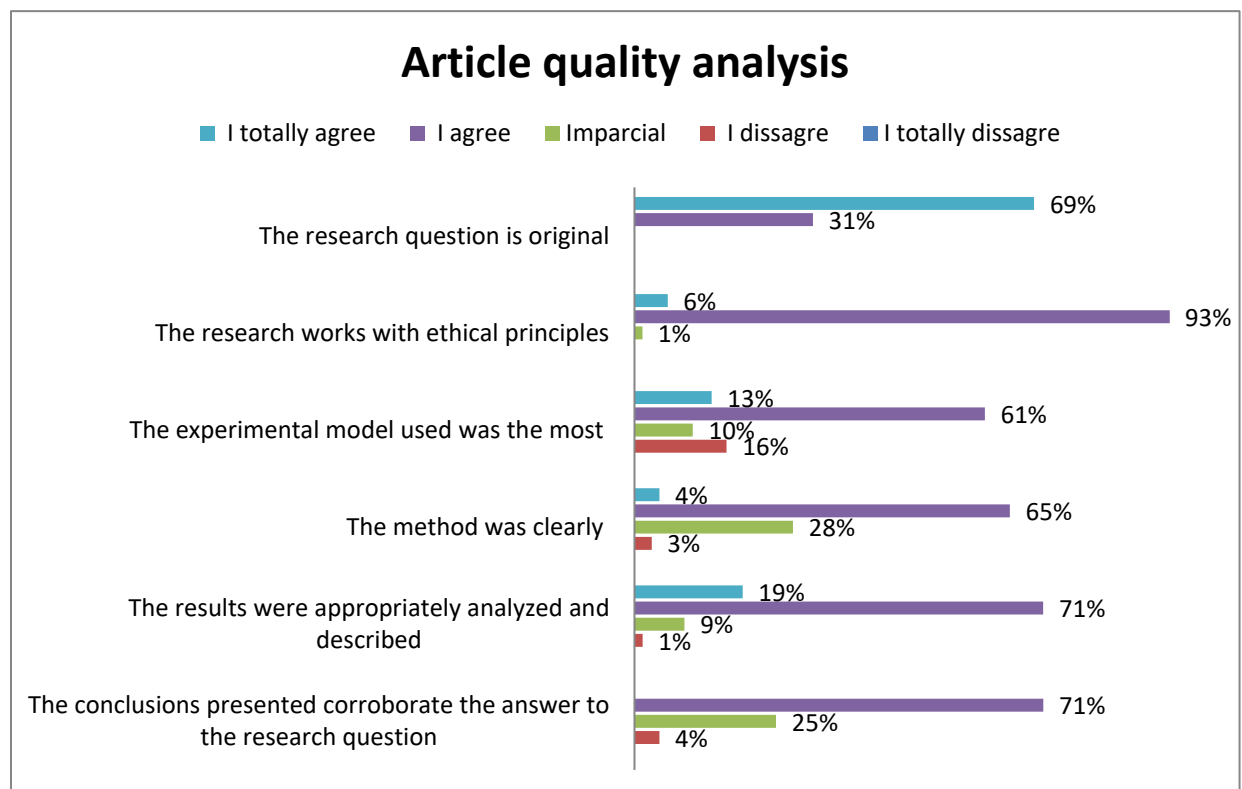
Table S2: Critical analysis of preclinical studies

Critical analysis of preclinical studies							
<i>Parpes</i>	Items	Items to be analyzed on the Likert scale					
		1	2	3	4	5	6
A Breast Cancer Stem Cell-Selective, Mammospheres-Potent Osmium (VI) Nitrido Complex	a. I totally agree						
	b. I agree	100%	100%	67%	100%	100%	100%
	c. Impartial			33%			
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
The breast cancer stem cell potency of copper (ii) complexes bearing nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their encapsulation using polymeric nanoparticles	a. I totally agree	100%					
	b. I agree		100%	100%	100%	100%	100%
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Cancer Stem Cell and Bulk Cancer Cell Active Copper(II) Complexes with Vanillin Schiff Base Derivatives and Naproxen.	a. I totally agree	100%	33%	100%		100%	
	b. I agree	33%	67%		67%		100%
	c. Impartial				33%		
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
A reactive oxygen species-generating, cyclooxygenase-2 inhibiting, cancer stem cell-potent tetranuclear copper(ii) cluster	a. I totally agree	33%					
	b. I agree	67%	100%	100%	66%		
	c. Impartial				33%	100%	100%
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Induction of Necroptosis in Cancer Stem Cells using a Nickel (II)-Dithiocarbamate Phenanthroline Complex	a. I totally agree	100%		100%		100%	
	b. I agree		100%		33%		100%
	c. Impartial				67%		
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Highly Charged, Cytotoxic, Cyclometalated Iridium (III) Complexes as Cancer Stem Cell Mitochondriotropics	a. I totally agree		100%				
	b. I agree	100%		100%		100%	100%
	c. Impartial				100%		
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
	a. I totally agree	33%					

Diflunisal-adjointed cobal t(iii)-polypyridyl complexes as anti-cancer stem cell agentes	b. I agree	67%	100%		100%	100%	
	c. Impartial						100%
	d. I disagree			100%			
	e. I totally disagree						
Modulating the Chemical and Biological Properties of Cancer Stem Cell-Potent Copper (II)-Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Complexes.	a. I totally agree	100%		100%			
	b. I agree		100%				
	c. Impartial				33%	67%	100%
	d. I disagree				67%	33%	
	e. I totally disagree						
An anticancer Os (II) bathophenanthroline complex as a human breast cancer stem cell-selective, mammosphere potent agent that kills cells by necroptosis	a. I totally agree	100%					
	b. I agree		100%	100%	100%	100%	100%
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Platinum (IV) Derivatives with Cinnamate Axial Ligands as Potent Agents Against Both Differentiated and Tumorigenic Cancer Stem Rhabdomyosarcoma Cells	a. I totally agree	100%					
	b. I agree		100%	67%	100%	100%	100%
	c. Impartial			33%			
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
A Triangular Platinum (II) Multinuclear Complex with Cytotoxicity Towards Breast Cancer Stem Cells	a. I totally agree	100%				100%	
	b. I agree		100%				100%
	c. Impartial				100%		
	d. I disagree			100%			
	e. I totally disagree						
Breast Cancer Stem Cell Potency of Nickel (II)-Polypyridyl Complexes Containing Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs.	a. I totally agree						
	b. I agree	100%	100%	100%		100%	100%
	c. Impartial				100%		
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Identification of two mitochondrial-targeting cyclometalated iridium(III) complexes as potent anti-glioma stem cells agents	a. I totally agree	100%					
	b. I agree		100%	100%	100%	100%	100%
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
The Discrete Breast Cancer Stem Cell Mammosphere Activity of Group 10-Bis (azadiphosphine) Metal Complexes	a. I totally agree						
	b. I agree	100%	100%	100%	67%	100%	
	c. Impartial				33%		100%
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
A tri-metallic palladium complex with breast cancer stem cell potency.	a. I totally agree						
	b. I agree	100%			100%	67%	
	c. Impartial		100%	100%		33%	
	d. I disagree						100%
	e. I totally disagree						
	a. I totally agree	100%					

Inhibition of 3D colon cancer stem cell spheroids by cytotoxic RuII-p-cymene complexes of mesalazine derivatives	b. I agree		100%	100%	100%	100%	100%
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Combination of Histone Deacetylase Inhibitor with Cu (II) 5,5-diethylbarbiturate Complex Induces Apoptosis in Breast Cancer Stem Cells: A Promising Novel Approach.	a. I totally agree	100%					
	b. I agree		100%	100%	100%	100%	67%
	c. Impartial						33%
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
A dithiacyclam-coordinated silver (i) polymer with anti-cancer stem cell activity	a. I totally agree						
	b. I agree	100%	67%	100%	100%	100%	100%
	c. Impartial		33%				
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
An Osteosarcoma Stem Cell Potent Nickel (II)-Polypyridyl Complex Containing Flufenamic Acid	a. I totally agree	100%					
	b. I agree		100%	100%	100%	100%	100%
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Dipyridophenazine iridium (III) complex as a phototoxic cancer stem cell selective, mitochondria targeting agent	a. I totally agree	100%				33%	
	b. I agree		100%	100%	67%	67%	100%
	c. Impartial				33%		
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
A bioinspired redox-modulating copper (II)-macrocyclic complex bearing non-steroidal anti-inflammatory drugs with anti-cancer stem cell activity	a. I totally agree	100%				100%	
	b. I agree		100%				100%
	c. Impartial			33%	100%		
	d. I disagree			67%			
	e. I totally disagree						
Cancer stem cell activity of copper (II)-terpyridine complexes with aryl sulfonamide groups	a. I totally agree						
	b. I agree	100%	100%	67%	100%	100%	
	c. Impartial			33%			100%
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
The Bulk Breast Cancer Cell and Breast Cancer Stem Cell Activity of Binuclear Copper (II)-Phenanthroline Complexes	a. I totally agree				100%		
	b. I agree	100%	100%			100%	67%
	c. Impartial			100%			33%
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Dinuclear gold(I) complexes based on carbene and diphosphane ligands: bis[2-(dicyclohexylphosphano)ethyl]amine complex inhibits the proteasome activity, decreases stem cell markers and spheroid viability in lung cancer cells.	a. I totally agree	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	b. I agree						
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						

An immunogenic anti-cancer stem cell bi-nuclear copper(II)-flufenamic acid complex	a. I totally agree	100%				33%	
	b. I agree		100%	100%	67%	67%	100%
	c. Impartial				33%		
	d. I disagree	100%				33%	
	e. I totally disagree		100%	100%	67%	67%	100%
Targeting cancer stem cell OXPHOS with tailored ruthenium complexes as a new anti-cancer strategy.	a. I totally agree	100%	100%	100%		100%	100%
	b. I agree				100%		
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
A Breast Cancer Stem Active Cobalt (III)-Cyclam Complex Containing Flufenamic Acid with Immunogenic Potential	a. I totally agree	100%		100%		100%	
	b. I agree		100%		33%		100%
	c. Impartial				67%		
	d. I disagree						
	e. I totally disagree						
Cobalt (III)-Macrocyclic Scaffolds with Anti-Cancer Stem Cell Activity.	a. I totally agree	100%	67%	100%	100%	100%	100%
	b. I agree		33%				
	c. Impartial						
	d. I disagree						
	e. I totally disagree	100%					



Graph S1: quality analysis of all articles selected for systematic review, grouped by percentage of responses on the Likert scale

Table S3 : Methodologies used in research

First author and year.	Analysis Method
Casangrande, 2024	● Synthesis and characterisation of complexes ● X-ray Crystallography ● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (LogP) ● Cytotoxicity Studies: MTT Assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Flow cytometry ● TrxR, 20S proteasome and NF-kB activity ● Statistical analyses
Li, 2024	● Synthesis and characterisation of complexes ● X-ray Crystallography ● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (LogP) ● Cytotoxicity Studies: MTT Assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Cellular Uptake ● Intracellular ROS assay. ● Immunoblotting analysis. ● Annexin V-propidium iodide assay ● COX-2 expression assay ● CRT cell surface exposure. ● ATP assay. ● HMGB-1 release. ● Phagocytosis assay.
Alcalá, 2024	● Synthesis and characterisation of complexes ● Cell lines, primary human PDAC cells, patient samples ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Cellular toxicity assay ● Colony assay ● Flow cytometry and FACS ● Zebrafish maintenance and xenograft assays ● In vivo toxicity and tumorigenicity assays ● RNA sequencing analysis ● RNA Preparation and Real-Time PCR ● Probabilistic graphical models ● Metabolic pathway analyses ● Oxygen Consumption Rate (OCR) measurements ● Lactate production assay ● ATP determination assay ● Immunostainings and confocal analysis ● Electron microscopy analysis ● Western blot analysis ● Mitochondrial gradient purification ● DNA extraction and PCR ● Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) ● Statistical analyses
Fang, 2024	● Synthesis and characterisation of complexes ● X-ray Crystallography ● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (LogP) ● Cytotoxicity Studies: MTT Assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Cellular Uptake
Fang, 2023	● Synthesis and characterisation of complexes ● X-ray Crystallography

	● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (LogP) ● Cytotoxicity Studies: MTT Assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Cellular Uptake ● Immunoblotting analysis. ● Annexin V-propidium iodide assay. ● COX-2 expression assay. ● CRT cell surface exposure ● ATP assay ● HMGB-1 release ● Phagocytosis assay ● Mice. ● In vivo studies with 1. ● Hematoxylin and eosin staining
Singh, 2023	● Synthesis and characterisation of complexes ● Cytotoxicity MTT assay ● Mass spectrometry ● DCFH-DA assay ● Immunoblotting analysis ● Tumoursphere formation and viability assay ● FITC Annexin V-propidium iodide staining flow cytometry assay
Osei, 2023	● Synthesis and characterisation of complexes ● X-ray crystallography ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● UV-Vis stability studies: ● Cell culture ● Cytotoxicity MTT assay ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cellular uptake ● Intracellular ROS assay ● DNA cleavage studies ● Immunoblotting analysis ● Annexin V-propidium iodide assay
Passeri, 2022	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Cytotoxicity MTT assay ● Osteosphere Formation and Viability Assay
Markova, 2022	● Chemicals ● Cell lines and culture conditions ● Antiproliferative and phototoxicity testing ● Cellular mitochondria colocalization of Ir complex by confocal microscopy ● Preparation of CSC-enriched RD.CD133+ cells ● 3D cell cultures ● FACS characterization of sorted cells ● Sphere-forming activity ● Mitochondrial mass ● Antiproliferative and phototoxic effect of Ir complexes in RD.CD133+ and CD133-spheroids ● Cellular accumulation ● Distribution of 1 in spheroids ● Determination of ROS (CellROX®) ● Mitochondrial membrane potential (TMRE) ● Mitochondrial ToxGlo™ assay (Promega) ● Mitochondrial permeability transition pore assay (BioVision) ● Type of cell death (apoptosis/necrosis)

Johnson, 2022	● Synthesis and characterisation of complexes ● Crystallographic method ● Electrochemical studies ● UV-vis absorption spectroelectrochemical studies. ● Cell culture ● MTT assay ● Tumoursphere formation assay ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cellular uptake ● Intracellular ROS Assay. ● Immunoblotting Analysis. ● COX-2 Expression Assay.
Erkisa, 2021	● Chemicals ● The ATP Viability Assay ● Detection of Caspase-Cleaved CK18 (M30 Antigen) ● Determination of Caspase 3/7 Activity and Annexin-V Staining ● . Induction of Oxidative Stress and ROS Measurement ● Determination of DNA Damage (γH2AX Assay) ● Statistical Analyses
Johnson, 2021	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cytotoxicity MTT assay ● Cellular uptake ● Immunoblotting Analysis. ● Intracellular ROS assay
Peng, 2020	● Synthetic procedures of Ir1 and Ir2 ● Cell lines and culture conditions ● Cell viability assay ● Co-culture of GSC-3# and 293T cells ● Cell proliferation assay ● Colocalization assay ● Cellular uptake mechanism studies ● Analysis of MMP ● Measurement of intracellular ROS ● Soft agar clonal formation assay
Acharya, 2020	● Syntheses ● Solution stability and binding study ● Cell lines and culture condition ● Cell viability assay ● Distribution coefficient determination ● Metal accumulation study in HT-29 cells by ICP-MS and ICP-OES ● Colonosphere formation assay and drug treatment ● RNA extraction and cDNA preparation and RT-PCR ● Immunofluorescence ● Detection of apoptosis: Annexin-V/PE assay ● Cell cycle arrest ● CT-DNA Binding
Feld, 2020	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell lines and cell culture conditions ● Cytotoxicity MTT assay ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cellular uptake ● Flow cytometry
Xiao, 2020	● Synthesis and characterisation of complexes

	● X-ray Single Crystal Diffraction Analysis. ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions. ● Monolayer Cytotoxicity Studies. ● Mammosphere Formation and Viability Assay. ● Mammosphere Uptake. ● Immunoblotting Analysis. ● Ethidium Bromide Displacement Studies.
Novohradsky, 2019	● Isolation of cancer stem cells ● Formation of tumorspheres from MCF-7^{CD44+/CD24-} and SKBR-3^{CD44+/CD24-} cells ● Viability assay of the mammospheres ● Inhibition of the formation of mammospheres from the suspension of MCF-7^{CD44+/CD24-} single cells ● Monitoring the changes in the diameter of the preformed MCF-7^{CD44+/CD24-} spheroids ● The effect on the heterogeneity of breast cancer cells ● Determination of mode of cell death ● Propidium iodide (PI) uptake ● Immunoblotting experiments
Eskandari, 2019	● Synthesis of the tri-nuclear palladium(II) complex ● X-ray Single Crystal Diffraction Analysis. ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP). ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Cytotoxicity MTT assay. ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Cellular Uptake ● Immunoblotting Analysis. ● ct-DNA precipitation assay. ● Ethidium Bromide Displacement Studies.
Shin, 2019	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (Log P) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Cytotoxicity MTT Assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Cellular Uptake
Zheng, 2019	● Incubation of the complexes with ascorbic acid to generate reduced products. ● Treatment of reduced products with 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to measure reactive oxygen species (ROS) levels. ● Use of N-acetylcysteine as a ROS reducing agent. ● UV-Vis absorption spectroscopy to identify the formation of copper (I) complexes. ● Fluorescence studies to investigate carboxylic acid release from coumarin-3 under reducing conditions. ● High-resolution mass spectrometry to identify the main reduced product within CSCs.
Novohradsky, 2019	● Starting materials and reagentes ● Physical measurements ● Synthesis and characterization ● Cell lines ● Antiproliferative activity ● Cellular uptake ● Quantification of platinum bound to DNA ● Cell sorting ● Generation of spheroids, antiproliferative activity on 3D spheroids

	● Rhabdo/mammosphere formation ● Cell death detection ● Effect of the treatment on the heterogeneity of the cells ● Real-time quantitative PCR
Abe, 2018	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cellular uptake ● DNA Cleavage Studies. ● Immunoblotting Analysis.
Laws, 2018	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell lines and cell culture conditions ● Cytotoxicity MTT assay ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cellular uptake ● Fluorescence Microscopy ● Cytochrome c oxidase Activity ● JC-1 Assay ● Intracellular ROS Assay ● Immunoblotting Analysis.
Lu, 2017	● Synthesis and characterisation of complexes ● DNA cleavage and binding studies ● UV/Vis Titration Studies ● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (Log P) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Cytotoxicity MTT assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Intracellular ROS assay ● Immunoblotting analysis ● Flow cytometry
Lu, 2017	● Synthesis and characterisation of complexes ● DNA cleavage and binding studies ● UV/Vis Titration Studies ● Measurement of Water-Octanol Partition Coefficient (Log P) ● Cell Lines and Cell Culture Conditions ● Cytotoxicity MTT assay ● Tumorsphere Formation and Viability Assay ● Intracellular ROS assay ● Immunoblotting analysis ● Flow cytometry
Flamme, 2017	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell lines and cell culture conditions ● Cytotoxicity MTT assay ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cellular uptake ● RNAi signatures ● GFP competition assays ● Immunoblotting analysis ● Propidium iodide (PI) uptake ● JC-1 assay ● Intracellular ROS assay
Eskandari, 2016	● Synthesis and characterisation of complexes ● Measurement of water-octanol partition coefficient (LogP) ● Cell lines and cell culture conditions

	● Cytotoxicity MTT assay ● Tumoursphere formation and viability assay ● Cellular uptake ● RNAi signatures ● GFP competition assays ● Immunoblotting analysis ● Intracellular ROS assay ● Flow Cytometry ● Nanoparticle Encapsulation. ● Nanoparticle Characterisation. ● Payload Release from Nanoparticle.
Suntharalingam, 2014	1. Cell lines and cell culture conditions 2. Cytotoxicity MTT assay 3. Tumoursphere formation and viability assay 4. Cellular uptake 5. Fluorescence Microscopy 6. Intracellular ROS Assay