

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA
ASSOCIAÇÃO ENTRE UM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE
COBRE E O FÁRMACO CISPLATINA

ELAINE GIMENEZ GUIMARÃES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2019

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA
ASSOCIAÇÃO ENTRE UM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE
COBRE E O FÁRMACO CISPLATINA

ELAINE GIMENEZ GUIMARÃES

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

Orientador: Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

G963

Guimarães, Elaine Gimenez.

Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica da associação entre um composto de coordenação de cobre e o fármaco cisplatina. / Elaine Gimenez Guimarães. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

86 f. : il.

Bibliografia: 78 - 86.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientador: Milton Masahiko Kanashiro.

1. Associação. 2. Sinergia. 3. Câncer. 4. Metalofármacos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA
ASSOCIAÇÃO ENTRE UM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE
COBRE E O FÁRMACO CISPLATINA

ELAINE GIMENEZ GUIMARÃES

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

Aprovada em 29 de março de 2019

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Franz Viana Borges
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense - IFF)

Prof. Dr^a Alba Lucínia Peixoto Rangel
(Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro)

Dr^a Brunna Xavier Martins
(Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro)

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelas oportunidades, desafios, lágrimas, sorrisos e conquistas. Enfim, agradeço por me iluminar e abençoar neste percurso.
- A minha família, em especial, aos meus pais Oldair Pereira Guimarães e Simoni Gimenez Guimarães, que são fundamentais em vida, sendo minha inspiração, exemplos de simplicidade, força e amor, sei que nunca mediram esforços, incentivo e força desde o princípio. Agradeço aos irmãos, Crislaine e Davi pelo companheirismo. E falando sobre irmãos, sou grata a irmã que vida me deu, Sabrina Buqueroni Alves, que tornou essa jornada bem mais divertida.
- Ao Gustavo Lemos Rocha, o amor da minha vida, agradeço pelo apoio, incentivo e paciência.
- Ao meu orientador, o Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro, pelo auxílio relevante na minha formação acadêmica, confiança e exemplo de profissional e pesquisador, obrigada de coração;
- Aos professores, Christiane Fernandes Horn, Adolfo Horn Júnior e João Carlos de Aquino Almeida, pela valiosa ajuda, atenção e ensinamentos.
- Agradeço também a todos que auxiliaram para a realização deste trabalho, a toda equipe de laboratório, em especial, a Leide Laura Figueiredo Maciel, a Marina Barreto Silva e a Paula Siqueira.
- Aos técnicos de Laboratório, Fernando, Núbia, Rita, Juju e Verônica, pelo auxílio sem os quais esse trabalho não seria possível.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 REVISÃO LITERÁRIA	16
1.1 CÂNCER.....	16
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.1.2 CÂNCER DE MAMA.....	17
1.1.3 ASPECTOS GERAIS.....	19
1.1.4 ETIOLOGIA DO CÂNCER.....	21
1.1.5 MORTE CELULAR.....	24
1.2. TRATAMENTO DE NEOPLASIAS.....	26
1.2.1 METALOFÁRMACOS.....	28
1.2.2 COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE.....	30
1.2.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE NEOPLASIA.....	32
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 CULTIVO CELULAR.....	39
4.2 DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS COMPOSTOS.....	39
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	40
4.4 VERIFICAÇÃO DE SINERGIA ENTRE O COMPLEXO COBRE (CC1) E A CISPLATINA (CDDP)	40
4.5 CULTURA CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFERICO (PBMC)	41
4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42

4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (JC-1) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES.....	43
4.9 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	43
4.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	44
4.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	45
4.12 INTERAÇÕES QUÍMICAS.....	45
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO DE COBRE E CISPLATINA NA VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO MTT.....	47
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA ASSOCIAÇÃO COMPOSTO DE COBRE NA VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO MTT.....	48
5.3 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA COMBINAÇÃO DA CISPLATINA E DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE.....	50
5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS PBMC TRATADAS COM O COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE, CISPLATINA E MIX.....	52
5.5 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (PPM) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	55
5.7 ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DE CASPASES INICIADORAS E EXECUTORAS PELO COMPOSTO DE COBRE, CISPLATINA E MIX	57
5.8 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	59
5.9 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	60
5.10 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	65
5.11 INTERAÇÕES QUÍMICAS.....	69

6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 e 2019 por sexo, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA, 2018.....	16
Figura 2: Comparação entre tumor benigno de miométrio (leiomioma) e tumor maligno de origem similar (leiomiossarcoma). Fonte: KUMAR <i>et al.</i> , 2018. (Traduzido)	20
Figura 3: Relação entre o número de divisões de células tronco em cada tecido e o risco de câncer dos mesmos.	23
Figura 4. Os três quimioterápicos baseados em platina com aprovação global. Fonte: OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018.....	28
Figura 5: Citotoxicidade do composto de cobre (CC1) e cisplatina (CDDP) isolados e/ou combinados. As células foram plaqueadas e tratadas por 48h com CC1 e a CDDP em concentrações crescentes isoladas ou em associação em linhagem celular (a) A549, (b) H460, (c) BXPC-3, (d) PC3 e (e) MDA-MB231. A viabilidade foi determinada por ensaio de MTT após 48 h de exposição.....	49
Figura 6: Efeito citotóxico dos compostos de coordenação de cobre, da cisplatina e da associação de ambos os compostos, frente às células MDA-MB-231 após tratamento por 48 horas de incubação, pelo ensaio de MTT.....	50
Figura 7: Histogramas referentes à análise do ciclo celular da linhagem MDA-MB 231, por citometria de fluxo, incubadas com (a) DMEM-F12-Controle, (b) 48,4 mg/L de CDDP por 12 h, (c) 22,2 mg/L de CC1 por 12 h, (d) 31,6 mg/L (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L CDDP) de MIX por 12 h, (e) 48,4 mg/L de CDDP por 24h, (f) 22,2 mg/L de CC1 por 24 h, (g) 31,6 mg/L (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L) de MIX por 24 h.....	54

Figura 8: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial na linhagem MDA-MB 231, por citometria de fluxo, incubadas com (a) DMEM-F12 - Controle, (b) 2x EC₅₀ CC1 por 12 h, (c) 2x EC₅₀ CDDP por 12 h, (d) 2x EC₅₀ MIX por 12 h, (e) 2x EC₅₀ CC1 24 h, (f) 2x EC₅₀ CDDP por 24 h, (g) 2x EC₅₀ MIX por 24 h. O quadrante “Q₂”, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal.....56

Figura 9: Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 em células MDA-MB231 após incubação com (a) Cisplatina (48,4 mg/L de CDDP), por 12 e 24 h, (b) Composto de coordenação de cobre (22,2 mg/L de CC1) e (c) Associação de Cisplatina e do composto de cobre – MIX (9,8 mg/L CC1 + 21,8 mg/L CDDP). A atividade das caspases foi avaliada utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 valores estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento.....58

Figura 10: Linhagem MDA-MB-231 após 24 horas de incubação, (a) controle, (b) tratadas com CDDP concentração de 48,4 mg/L, (c) 22,2 mg/L de CC1 e (d) MIX (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L). As setas em verde indicam as alterações na morfologia do núcleo evidenciando a fragmentação ou o deslocamento do mesmo para a periferia da célula. Barras de escala: 10µM.....60

Figura 11: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; tratadas com CDDP concentração de 24,2 mg/L (b) e (c) por 6 horas, (d) e (e) 12 horas. Asterisco indicam a formação de *blebbing* de membrana e setas indicam alterações na granulidade.....62

Figura 11: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; tratadas com CC1 concentração de 11,1 mg/L (f) e (g) por 6 horas, (h) e (i) 12 horas. Asterisco indicam a formação de *blebbing* de membrana.....63

Figura 11: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; tratadas com MIX concentração de 4,9 mg/L CC1 e 10,8 mg/L de CDDP (j) e (k) por 6 horas, (l) e (m) 12 horas. Asterisco indicam a formação de *blebbing* de membrana.....64

Figura 12: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle, (b) e (c) tratadas com CDDP concentração de 24,2 mg/L, por 6 horas, (d) e (e) 12 horas. Presença de várias organelas eletrodensas nas células tratadas (estrela); Nota-se a morfologia alterada de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e (v) vesícula, em células tratadas, no citoplasma da célula. Presença de várias microvilosidades (setas) na periferia da célula e o (n) núcleo.....66

Figura 12: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; (f) e (g) tratadas com CC1, concentração de 11,1 mg/L, por 6 horas, (h) e (i) 12 horas. Presença de várias organelas eletrodensas nas células tratadas (estrela); Nota-se a morfologia alterada de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e (v) vesícula, em células tratadas, no citoplasma da célula. Presença de várias microvilosidades (setas) na periferia da célula e o (n) núcleo.....67

Figura 12: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; (j) e (k) tratadas com MIX concentração de 4,9 mg/L CC1 e 10,8 mg/L de CDDP, por 6 horas, (l) e (m) 12 horas. Nota-se a morfologia alterada de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e (v) vesícula, em células tratadas, no citoplasma da célula. Presença de várias microvilosidades (setas) na periferia da célula, corpos apoptóticos (círculos) e o (n) núcleo.....68

Figura 13: Interação entre a cisplatina e o composto de cobre, por espectro eletrônico obtido a partir da solução etanol/água (50:50), após a reação entre CDDP (10 mg) e o CC1 (18mg)69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de EC ₅₀ (mg/L) da curva de viabilidade por MTT, incubadas por 48 horas.....	47
Tabela 2. Valores de EC ₅₀ (mg/L) da curva de viabilidade por MTT, incubadas por 48 horas.....	48
Tabela 3. Valores de EC ₅₀ (mg/L) obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade celular por MTT frente a linhagem MDA-MB231, incubadas por 48 horas.....	41
Tabela 4. Associação do composto de coordenação de cobre (CC1) e Cisplatina (CDDP) frente a linhagem MDA-MB231.....	52
Tabela 5. Valores de EC ₅₀ (mg/L) obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade celular por MTT frente a MDA-MB231 e PBMC.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- A2780** → Linhagem de carcinoma de ovário humano
- A375** → Linhagem melanoma humano
- A549** → Linhagem carcinoma de pulmão humano
- APAF** → fator de ativação de apoptose 1
- ATCC** → American Type Culture Collection
- ATP** → Adenosina trifosfato
- B16F10** → Linhagem melanoma murino
- Balb/C (nu/nu)** → Linhagem de camundongos Balb/c atímicos
- BCRJ** → Banco de células do RJ
- BxPC3** → Linhagem adenocarcinoma pancreático
- C57BL/6** → Linhagem de camundongos
- CALU-1** → Linhagem adenocarcinoma de pulmão humano
- CC1** → Composto de coordenação de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O
- CCRF-CEM** → Linhagem leucêmica humano
- CD95** → Receptor de morte celular
- CDDP** → cisplatina ou cis-diaminodichloroplatina (II)
- CI** → Índice de combinação
- CIT-C** → Citocromo C
- COLO 205** → Linhagem adenocarcinoma coloretal humano
- COLO 699** → Linhagem adenocarcinoma de pulmão humano
- COR-L 105** → Linhagem adenocarcinoma de pulmão humano
- CTR1** → Proteína transportadora de cobre
- DANT** → doenças e agravos não transmissíveis
- DISC** → Complexo de sinalização indutor de morte
- DMEM-F12** → Meio de Eagle Modificado por Dulbecco: mistura de nutriente F12 (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12*)
- DMSO** → Dimetilsulfóxido
- DNA** → Ácido desoxirribonucleico
- DR4** → Receptor de morte celular 4
- DR5** → Receptor de morte celular 5
- EC₅₀** → Concentração inibitória de 50% da população celular

ER → Retículo endoplasmático

FA → Inibição fracional

FADD → FAS-proteína associada com domínio de morte

FAS → Receptor de morte celular

H460 → Linhagem carcinoma de pulmão humano

HCl → Ácido clorídrico

HCT-116 → Linhagem adenocarcinoma coloretal humano

HCT-15 → Linhagem adenocarcinoma coloretal humano

HT55 → Linhagem adenocarcinoma coloretal humano

INCA → Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

JC-1 → Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina

LNCaP → Linhagem adenocarcinoma próstata

MCF-7 → Linhagem adenocarcinoma de mama humano

MDA-MB231 → Linhagem adenocarcinoma de mama humano

MEV → Microscopia eletrônica de varredura

MIX → Associação entre o composto de coordenação de cobre e cisplatina

MTOR → Alvo da rapamicina de mamíferos (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*),

MTT → 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio

OMS → Organização Mundial da Saúde

PANC → Linhagem adenocarcinoma pancreático

PBMC → Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*)

PBS → Tampão Fosfato Salino (NaCl 0,137M; Na₂HPO₄.2H₂O, 0,008M; KCl 0,0026M; KH₂PO₄ 0,0014M, pH 7,2)

PC3 → Linhagem adenocarcinoma próstata

PMM → Potencial membrana mitocondrial

RPM → Rotações por minuto

SK-MEL5 → Linhagem melanoma humana

THP-1 → Linhagem leucêmica humana

TNF → Fator de necrose tumoral

U-937 → Linhagem leucêmica humana

RESUMO

A atuação sinérgica da associação entre terapias desempenha um papel essencial no tratamento do câncer. Dentre as estratégias clínicas adotadas está a combinação da Cisplatina com outros quimioterápicos, impulsionando assim o uso combinado de novos complexos metálicos e fármacos antineoplásicos, visando superar os desafios associados ao uso de derivados de platina como antitumorais. Neste sentido, os compostos de coordenação baseados em metais endógenos têm ganhado grande destaque devido às atividades antineoplásicas promissoras e o baixo custo. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial citotóxico do composto de coordenação de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (CC1) isolado e em associação com Cisplatina (CDDP), então, denominado como MIX, frente a linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB231. A avaliação de citotoxicidade determinado pelo método colorimétrico MTT, demonstrou a redução de mais de 50% das doses requeridas do CC1 e da CDDP isolados para determinar metade da concentração efetiva (EC₅₀) de MIX, sendo a EC₅₀ do CC1 11,1 mg/mL, da CDDP 24,2 mg/mL e MIX 15,8 mg/L (CC1 4,9 mg/L e CDDP 10,9 mg/L). Além da redução da dose administrada, foi observado o sinergismo de MIX, apresentando o valor de índice de combinação (CI) correspondente a 0,89. Os resultados da avaliação do ciclo celular (Sub-G1) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1) e ativação de caspases demonstraram que o CC1 e MIX induzem morte celular por apoptose na linhagem testada, sendo esse processo amplificado por uma via alternativa de ativação da caspase 9. As alterações morfológicas observadas, por microscopia de fluorescência, varredura e transmissão, corroboram a hipótese que as células tratadas por MIX, CC1 e CDDP estejam sofrendo apoptose. Além desses aspectos, as células neoplásicas são mais susceptíveis ao tratamento que as células do sangue periférico, sendo que a concentração requerida de MIX em um tratamento conjunto, não interfere na viabilidade de células normais. Portanto, MIX apresenta-se como promissor devido a sinergia e redução da dose administrada CDDP e CC1 observadas, que resultam em alterações morfológicas semelhantes a CDDP isolada, o que sugere a redução da toxicidade, mantendo ao mesmo tempo a atuação desejada em células cancerosas.

PALAVRAS-CHAVE: Associação; Sinergia; Câncer; Metalofármacos

ABSTRACT

The synergistic performance of association of therapies plays an essential role on cancer treatment. Among the clinic strategies adopted is the combination of Cisplatin with others chemotherapy, boosting the combined employment of new metallic complexes and antineoplastic drugs, aiming to overcome the challenges associated to the utilization of platinum derivatives as antitumor medication. Thus, the coordination compounds based on endogenous metals are receiving great interest due to the promising antineoplastic activities and low cost. In this context, the present work had as objective the study of the cytotoxic potential of the copper coordination compound $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CC1) separated and in association with Cisplatin (CDDP), then, denominated as MIX, against the mammary adenocarcinoma lineage MDA-MB231. The cytotoxicity evaluation assessed by the MTT colorimetric method showed more than 50% of reduction of the required doses of CC1 and CDDP separated to determinate the MIX effective concentration (EC_{50}), being the EC_{50} of CC1 11.1 mg/mL, of CDDP 24.2 mg/mL and MIX 15.8 mg/mL (CC1 4.9 mg/mL and CDDP 10.9 mg/mL). Besides the reduction on the administered dose, it was observed the synergism of MIX, revealing the combination level (CL) value reaching 0.89. The results of the cellular cycle (Sub-G1), mitochondrion membrane potential and caspase activation evaluation showed that CC1 and MIX induced cellular death by apoptosis on the tested lineage, being this process amplified by an alternative pathway of caspase 9 activation. The morphological changes observed by fluorescence microscopy, electron scanning microscopy and electron transmission microscopy, corroborate to the hypothesis that the cells treated with MIX, CC1 and CDDP were undergoing apoptosis. In addition to these aspects, the neoplastic cells were more susceptible to the treatment than the peripheral blood cells, being that the MIX required concentration, in a simultaneous treatment does not interfere in the normal cells viability. Therefore, MIX are shown as promising due the sinergy and reduction on the CDDP and CC1 administered doses observed that resulted in morphological changes similar to the CDDP separated, what suggests the toxicity reduction, maintaining at the same time the desired performance in cancer cells.


KEYWORDS: Association; Synergy; Cancer; Metalodrugs

1. REVISÃO LITERÁRIA

1.1 CÂNCER

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é um problema de saúde pública mundial, que leva ao óbito aproximadamente 8,2 milhões de pessoas anualmente. No Brasil estimou-se para o biênio 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos da doença, para cada ano. Sendo o tipo mais recorrente o câncer de pele classificado como não melanoma, cerca de 170 mil novos casos, para ambos os sexos, seguido por 420 mil casos de neoplasias que acometem a próstata (31,7%), o sistema respiratório (8,7%), o cólon e reto (8,1%), o estômago (6,3%) e a cavidade oral (5,2%) e estima-se, para o sexo feminino, a alta incidência de casos de câncer de mama (29,5%), cólon e reto (9,4%), colo do útero (8,1%), traqueia, brônquios e pulmão (6,2%) e tireóide (4,0%) Fig. 1 (INCA, 2018).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 e 2019 por sexo, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA, 2018.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2019) até o ano 2030 espera-se a ocorrência de 26 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes ocasionadas pela doença, fundamentando-se em aspectos socioeconômicos, demográficos e biológicos da população. Os países em desenvolvimento e subdesenvolvidos serão as áreas mais acometidas, pois o percentual de óbito relaciona-se diretamente com os fatores econômicos, sociais e políticos, sendo a estruturação e a organização do sistema de saúde essencial para o diagnóstico

precoce, o prognóstico, a orientação e o tratamento da doença (BARBOSA *et al.*, 2015).

Em geral os países da América do Sul e Central investem poucos recursos na saúde quando comparados aos países desenvolvidos, inviabilizando o acompanhamento dos avanços quimioterápicos, o que contribui para a manutenção da alta incidência de óbitos causados pelo câncer. Além da discrepância de recursos disponibilizados, projeta-se o aumento de 35% de novos casos da doença nesses países até o ano 2030, ocasionando um acréscimo no percentual de mortalidade (RUIZ *et al.*, 2017). No Brasil, por exemplo, há uma tendência de aumento na taxa de óbito, resultante da ocorrência de neoplasias, nas regiões norte e nordeste, enquanto as regiões sul, sudeste e centro-oeste tendem a estabilizar ou diminuir este índice (BARBOSA *et al.*, 2015).

Sendo apontado como a segunda causa de óbito da população brasileira (INCA, 2018), o câncer influencia diretamente o potencial de desenvolvimento socioeconômico do país, pois acomete substancialmente a população, reduz a produtividade, onera o sistema de saúde, gerando um débito considerável aos cofres públicos e reduz a qualidade de vida da pessoa acometida e de seu grupo familiar (GASKIN *et al.*, 2011). Desta forma, é essencial que o país invista em medidas preventivas, diagnóstico precoce, monitoramento, pesquisas de novos fármacos, visando à redução de gastos futuros e a sobrevivência do paciente (INCA, 2018).

O câncer de mama, por exemplo, constitui-se como o tumor maligno de maior incidência mundial nas mulheres e com a maior taxa de mortalidade, excluindo os casos de cânceres de pele não melanoma. Esse cenário não diverge no Brasil, a frequência dessa neoplasia se destaca nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, demonstrando uma potencial correlação entre os estilos de vida e a urbanização com a doença (INCA, 2015; 2018).

1.1.2. CÂNCER DE MAMA

Apesar do câncer de mama apresentar alta incidência e taxa de mortalidade, a letalidade é baixa, devido à taxa de mortalidade ser menor que 30% dos casos incidentes (STEWART; WILD, 2014). Saliente-se que o diagnóstico precoce desse

câncer é essencial para a manutenção baixa do índice, uma vez que, aumenta o percentual de cura, a qualidade de vida e a sobrevida da paciente.

Diante deste fato, o controle do câncer de mama é uma das prioridades na agenda da Política Nacional de Saúde do Brasil. Uma das campanhas mais evidentes realizadas no país e no mundo é o Outubro Rosa, que representa a luta contra o câncer de mama, com ações que objetivam a sensibilização sobre a prevenção e o diagnóstico precoce, visando diminuir o índice de mortalidade em decorrência dessa neoplasia (COUTO *et al.*, 2017; INCA, 2015).

As Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil garantem como estratégia de rastreio a mamografia bienal para pacientes na faixa etária 50 a 69, a promoção de campanhas que visem sensibilizar a população sobre sinais e sintomas suspeitos, a oferta de profissionais de saúde capacitados e serviços de saúde que confirmem o diagnóstico clínico (INCA, 2015).

Segundo Di Sibio (2016) o câncer de mama é uma doença complexa, multifatorial e heterogênea. Estima-se que menos de 10% do número de casos de câncer de mama tenham origem genética, devido a mutações em genes herdados como, por exemplo, os genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2, que são descritos como responsáveis por cerca 80% dos casos de câncer de mama hereditário (ANGAHAR, 2017).

A etiologia da doença está comumente associada a fatores ambientais, reprodutivos e ao estilo de vida, como a idade, a exposição à radiação ionizante, a menarca precoce, a menopausa tardia, a idade tardia da primeira gravidez, nuliparidade, ao uso de bebidas alcoólicas e cigarro, o uso de terapia de reposição hormonal, a dietas hipercalóricas e ao sedentarismo (TOKLU; NOGAY, 2018, ANGAHAR, 2017; SPRAGUE *et al.*, 2015).

Sprague e colaboradores (2015) elencaram os fatores de risco que potencialmente estariam associados ao desenvolvimento do câncer de mama em pacientes pós e pré-menopausa, a primeira faixa etária está correlacionado com ao uso dos hormônios estrogênio-progesterona e a obesidade, o que não é observado em pacientes na pré-menopausa. Esses fatores também foram evidenciados por Toklu e Nogay (2018), que além desses, destacaram o consumo de fontes protéicas condimentadas através de frituras, o sedentarismo e a não adesão de dieta

mediterrânea, como fatores de risco para o câncer de mama principalmente durante o período pós-menopausa.

1.1.3. ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

As neoplasias são caracterizadas pela perturbação patológica da formação e crescimento de populações celulares, configurando a proliferação anormal e excessiva de um conjunto de células, podendo essas serem classificadas, com base em seu comportamento clínico, como benigna ou maligna (SINHA, 2018; KUMAR *et al.*, 2018).

Nesta primeira categoria as células apresentam alto grau de diferenciação semelhante às células que compõem o tecido, havendo lento percentual de proliferação, sendo essas confinadas ao tecido de origem, muitas vezes, envoltas por cápsulas formadas por tecido fibroso ou discretamente demarcadas por tecido muscular liso circundante, resultando em um tumor do tipo benigno, que pode ser facilmente removido por excisão cirúrgica, que devido à ausência de potencial de invasão para outros tecidos acarreta pouco risco à saúde do paciente (Fig. 2). No entanto, se localizado em regiões próximas aos órgãos vitais, nervos ou vasos sanguíneos, resultam em morbidade podendo ser letal, devido ao potencial de obstrução de canais e vasos e a pressão exercida a órgãos vitais acarretada pelo crescimento da massa tumoral (SINHA, 2018).

As neoplasias classificadas como malignas são frequentemente denominadas como câncer. As células cancerosas que compõem as neoplasias malignas são pouco ou completamente indiferenciadas, ou seja, anaplásicas, apresentam alta taxa proliferativa, são pouco circunscritas por tecido fibroso ou muscular liso, alta propensão de invasão de tecidos normais circundantes, sendo localmente invasivas e potencialmente metastáticas, formando tumores secundários em tecidos distantes (Fig. 2) (SINHA, 2018; KUMAR *et al.*, 2018).

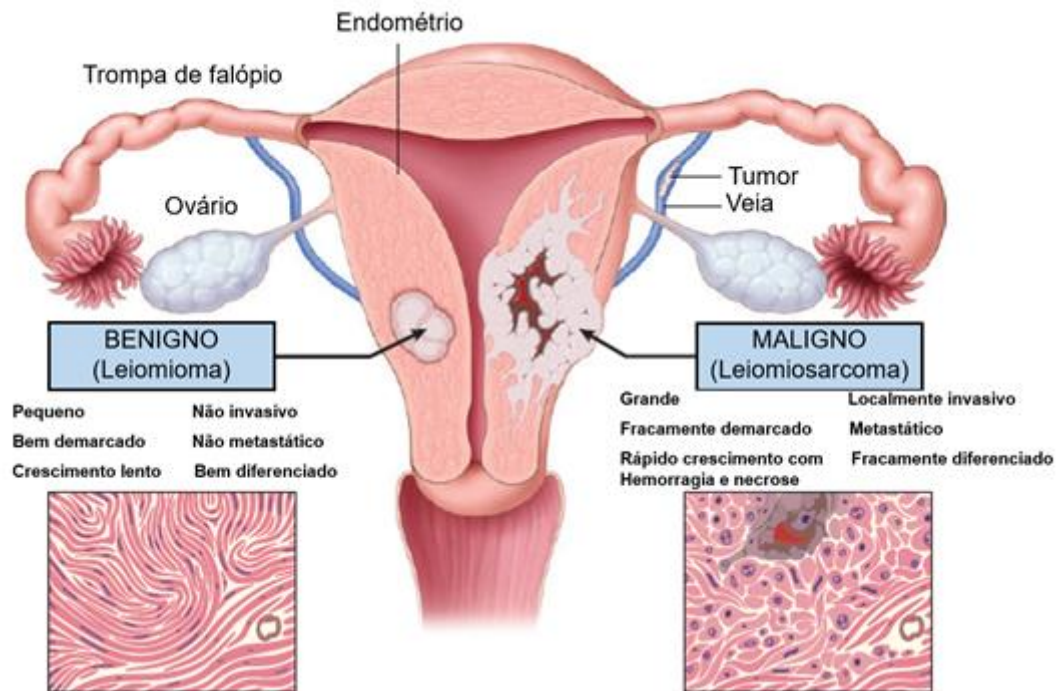


Figura 2: Comparação entre tumor benigno de miométrio (leiomioma) e tumor maligno de origem similar (leiomiossarcoma). Fonte: Kumar *et al.*, 2018. (Traduzido).

Os tumores benignos e malignos são classificados de acordo com a procedência da neoplasia, ou seja, o tipo de célula da qual esses se originam. As neoplasias benignas recebem o sufixo OMA, denominando a origem celular ou os aspectos histológicos apresentados pelo tumor, por exemplo, os tumores benignos localizados no tecido ósseo, tecido adiposo e muscular, recebem o nome osteoma, lipoma e leiomioma, respectivamente. Porém existem exceções, por exemplo, o linfoma que é a nomenclatura dada ao câncer que afeta as células do sistema linfático (KUMAR *et al.*, 2018).

Já os tumores malignos são divididos em três grandes grupos que são denominados como carcinoma, sarcoma, leucemias ou linfomas. O primeiro origina-se a partir do tecido epitelial, se a procedência for epitélios de revestimento usa-se o prefixo carcinoma, por exemplo, o carcinoma de pequenas e de grandes células do pulmão. No entanto, se o tumor for derivado do epitélio glandular, receberá o prefixo adenocarcinoma, por exemplo, o adenocarcinoma do pulmão. Já os tumores oriundos do tecido mesenquimal são denominados como sarcoma, sendo designados de acordo com o tipo celular de origem, por exemplo, fibrossarcomas e lipossarcoma. E as leucemias e linfomas originam-se a partir de células mesenquimais sanguíneas, exemplo, leucemias eritróides (KUMAR *et al.*, 2018).

1.1.4. ETIOLOGIA DO CÂNCER

Os mais de 200 tipos de cânceres são caracterizados por alterações na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que resultam em células anaplásicas caracterizadas por variações de tamanho e forma, sendo pleomórficas, com núcleo hipercromáticos, apresentando proliferação celular atípica, potencial invasivo e metastático (LÓPEZ-LÁZARO, 2018; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004). Apesar da fisiologia de uma célula cancerígena ser consolidada, as causas biológicas desse fenótipo ainda estão sendo elucidadas (LÓPEZ-LÁZARO, 2016).

A teoria denominada como mutação somática do câncer define a gênese da doença como o acúmulo de mutações em genes conhecidos como proto-oncogenes, supressores de tumor e genes de estabilidade, podendo essas mutações estarem correlacionadas a fatores hereditários em 5 a 10% dos casos e a fatores ambientais nos demais casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os proto-oncogenes são um conjunto de genes no qual os produtos protéicos como as proteínas de transdução de sinais, fatores de crescimento, receptores, reguladores protéicos e mediadores de divisão, atuam como reguladores do ciclo celular, uma vez que estão associados ao reconhecimento e transdução dos sinais de divisão celular. Quando esses genes sofrem alterações estruturais, provenientes do processo de translocação entre cromossomos, amplificação de sequência ou mutações em pares de bases, passando a ser denotados como oncogenes, estando constitutivamente ativos ou assumindo sua conformação ativa em momentos no qual o gene normal não estaria ativo. Desta forma, as proteínas traduzidas a partir desses genes, denominadas como oncoproteínas, atuam de forma desordenada o que contribui para o desenvolvimento da neoplasia (CROCE, 2008).

Já os produtos gênicos dos genes supressores de tumor como a proteína retinoblastoma, caderinas, polipose adenomatosa coli, p53 e outros, estão associados às vias de supressão do ciclo celular e metástase, reparo do DNA e ao processo de morte celular programada. Quando a estrutura desses genes é alterada, através do processo de inserção, deleção, mutação pontual ou silenciamento, a célula perde o controle da divisão celular e inibe o processo de morte celular, pois as mutações inibem a atuação dessas proteínas, contribuindo assim para o desenvolvimento da doença (GUDISEVA *et al.*, 2017).

Além das alterações nos genes supressores de tumor e nos proto-oncogenes, há um conjunto de genes que não atua diretamente sobre o ciclo celular, no entanto, seus produtos promovem a reparação do material genético. Quando suas sequências são alteradas eleva-se a taxa de mutação, podendo ou não afetar os genes supressores de tumor e os proto-oncogenes, aumentando o potencial descontrole do ciclo celular (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Embora a hipótese mutação somática explique a influência de fatores genéticos e carcinógenos na gênese do câncer, essa não explica as diferenças que estes fatores exercem frente a um específico órgão, ou seja, disparidade específica do risco de câncer de cada órgão (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015). Por exemplo, o risco de desenvolvimento de câncer de próstata em pacientes com 80 anos é quase 50% menor do que indivíduos com 70 anos (LÓPEZ-LÁZARO, 2016); O gene APC herdado por indivíduos com síndrome da polipose adenomatosa familiar está relacionado com a predisposição de neoplasias que acometem o intestino delgado e grosso, porém a ocorrência mais comum é no colo-retal (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015). As neoplasias que acometem o cérebro e células sanguíneas são mais recorrentes nas duas primeiras décadas de vida (LÓPEZ-LÁZARO, 2016); sobre os tumores cerebrais esses são três vezes mais incidentes que as neoplasias que acometem o intestino delgado, embora as células epiteliais estejam expostas em níveis mais elevados de carcinógenos do que as células cerebrais (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Diante disso, outra hipótese foi proposta por Tomasetti e Vogelstein (2015), baseando-se em erros de replicação do DNA de células tronco adultas para explicar a etiologia do câncer. Portanto, no caso indivíduos com síndrome da polipose adenomatosa familiar a ocorrência mais comum é no colo-retal, pois este possui um número total de células tronco maior que o intestino delgado e conseqüentemente as divisões do tecido ocorrem em maior proporção, então, a doença é ocasionada devido ao aumento da expansão celular que está diretamente ligada ao aumento da probabilidade de mutação, ou seja, a “má sorte” de ocorrer uma mutação no DNA (Fig. 3) (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

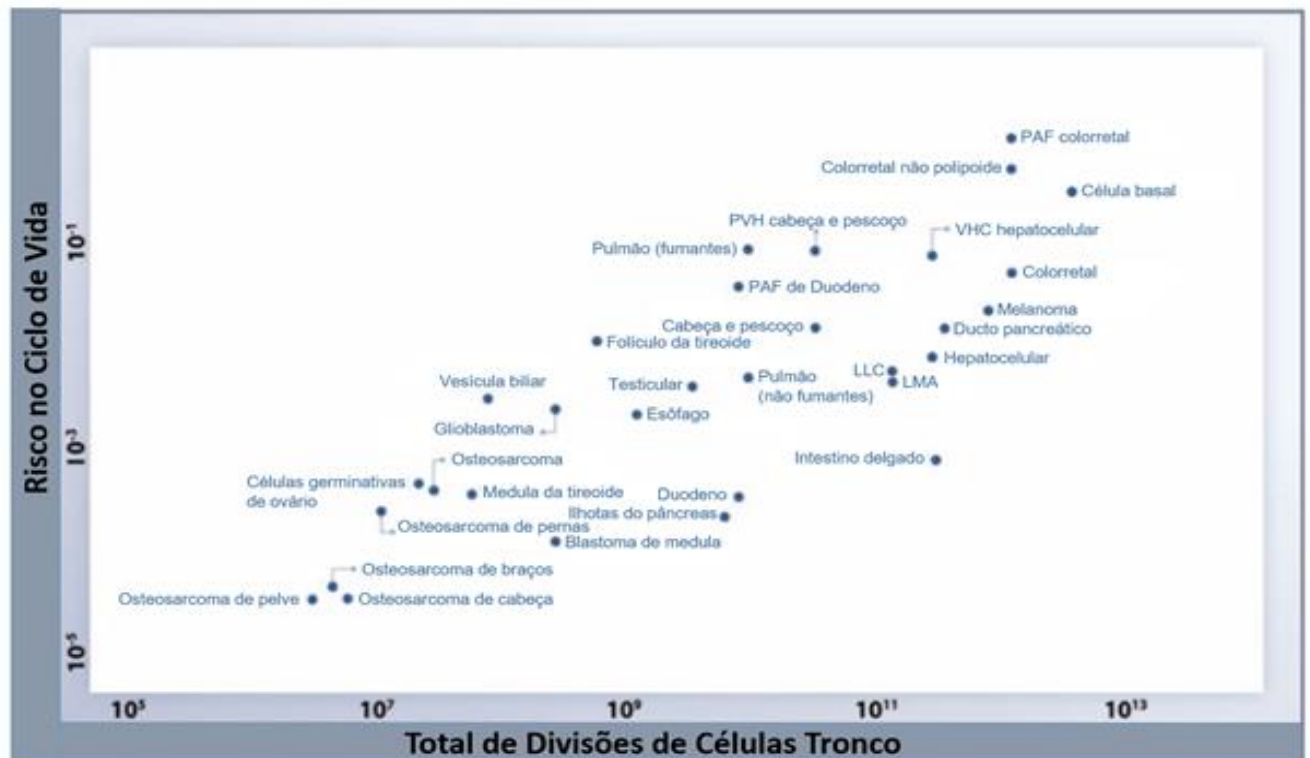


Figura 3: Relação entre o número de divisões de células tronco em cada tecido e o risco de câncer dos mesmos. Fonte. TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015.

Segundo Tomasetti e Vogelstein (2015), em dois terços dos casos de câncer há erros de replicação do DNA de células tronco normais. Desta forma, apenas um terço dos casos de câncer pode ser atribuído aos fatores ambientais ou hereditários.

Embora exista este contraste referente à proporção de fatores que influenciam a gênese do câncer, as hipóteses concordam que as alterações genéticas caracterizam o fenótipo das células cancerosas, se esse é ocasionado majoritariamente por erros de replicação inerentes das células ou causados por hereditariedade, ou se essas modificações são em respostas a fatores externos, ou se ocorre à sinergia de dois ou mais fatores ou em determinados tumores prevaleça um único fator, ou se há iniciadores e outros que levam à progressão, são aspectos que continuam sendo elucidados (LÓPEZ-LÁZARO, 2016; TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Desta forma, apesar do incógnito fator ou dos fatores que iniciam a carcinogênese, a fisiologia da célula neoplásica permite a elevada taxa proliferativa, devido à baixa sensibilidade aos inibidores de crescimento, a evasão do processo de

morte celular programada, a angiogênese e o potencial migratório para outros tecidos (GUDISEVA *et al.*, 2017).

1.1.5. MORTE CELULAR

O processo de morte celular é essencial para a manutenção fisiológica dos organismos, tendo um papel central sobre o metabolismo, em respostas a danos ao DNA, no desenvolvimento de células de defesa e eliminação de células potencialmente nocivas, sendo o desequilíbrio deste processo correlacionado com várias doenças, incluindo o câncer. Em geral, os mecanismos de morte celular são classificados em três grandes grupos denominados como apoptose, autofagia e necrose. Esses três mecanismos de morte celular podem ser ativados por vias de sinalização distintas, e às vezes sobrepostos, em resposta a alguns estímulos específicos (OU *et al.*, 2017).

Além dos três grandes grupos mencionados há outros mecanismos de morte que ocorrem em momentos mais específicos ou em resposta a patologias, como a catástrofe mitótica e a piroptose, respectivamente (PEIXOTO *et al.*, 2017).

A morte celular programada do tipo apoptose fundamenta-se em uma cascata bioquímica dependente de energia dividida em duas vias denotadas como intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é ativada através de estímulos internos como o aumento da concentração de Ca^{2+} , ausência de fatores de crescimento, danos ao DNA, bloqueadores de componentes do citoesqueleto, dentre outros fatores que alteram a fisiologia celular. Em resposta a estes estímulos ocorre à liberação do citocromo C (cit-C) e de endonucleases oriundas do espaço mitocondrial. O cit-C interage com um complexo de ativação de caspases composto por Apaf1, formando uma estrutura denominada como apoptosoma, que apresenta um domínio de recrutamento de caspase, que possibilita a interação do complexo com a pró-caspase-9, que na presença de ATP, assume sua conformação ativa, denominada de caspase 9, que por sua vez, ativa as pró-caspases 3 e 7, responsáveis por executar o processo de morte celular (ARYA; WHITE, 2015; ELMORE, 2007).

Já a via extrínseca é ativada em resposta a fatores externos através de receptores relacionados com o processo de apoptose pertencentes à super-família de TNF que incluem os receptores TNFR, os ativados por ligante Fas como, por exemplo,

o CD95 e TRAIL-R como os receptores DR4 e DR5, que são denominados os receptores da morte, localizados na superfície celular. Após a ligação dos receptores, o domínio de morte recruta a proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*), que possibilita o recrutamento de pró-caspases, formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Com clivagem desse complexo a caspase 8 e 10 assume sua conformação ativa, que por sua vez, ativa a caspases 3 (XU *et al.*, 2019; GARCÍA *et al.*, 2012).

Apesar destas vias serem conduzidas por componentes bioquímicos distintos, ambas acarretam alterações morfológicas semelhantes, pois o processo de apoptose compromete a estrutura do citoesqueleto, altera o volume citoplasmático, modifica arquitetura dos fosfolipídios e a estrutura física da membrana plasmática levando a exposição da fosfatidilserina e a formação de *blebbing*, promove a fragmentação característica do DNA através da atividade de endonucleases liberadas, ocasiona a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos (XU *et al.*, 2019; PEIXOTO *et al.*, 2017).

Assim como a apoptose, a autofagia é um processo altamente conservado em todos os táxons, sendo essencial para o funcionamento celular, pois compreende uma via catabólica que promove a degradação e reciclagem de componentes citoplasmáticos através da formação de autofagossomos, seguido da fusão lisossomal e degradação de conteúdos (KENIFIC; DEBNATH, 2015).

Esse sistema de gerenciamento de degradação e reciclagem de proteínas, organelas e outros componentes intracelulares, controlam os potenciais danos que essas macromoléculas estruturais poderiam ocasionar (PEIXOTO *et al.*, 2017). O processo de autofagia é conduzido em resposta a sinais de estresse celular, ocorrendo a inibição da atividade do complexo quinase mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), seguido da ativação de genes relacionados com a estruturação dos fagoforos, dos autofagossomos e de outros mediadores desse processo de degradação (GLICK *et al.*, 2010). O desequilíbrio desta via está correlacionado com a ocorrência de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, neoplásicas, dentre outras (LEVINE; KROEMER, 2008).

Já a morte celular por necrose se diferencia das demais categorias por induzir a rápida perda do potencial de membrana, ocasionando a entrada de água no espaço intracelular levando a célula a um estado de turgescência com a posterior ruptura da

membrana plasmática (PEIXOTO *et al.*, 2017). Além de desregular a concentração de água no meio intracelular, o desequilíbrio do potencial de membrana permite a entrada de íons como sódio e cálcio e saída de potássio, por exemplo, contribuindo assim com a turgescência celular, seguido da posterior liberação do conteúdo intracelular rico em hidrolases e metabólitos que interferem na fisiologia das células vizinhas, desencadeando o processo de inflamação (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

Outras alterações que contribuem para o perfil característico desse processo de morte celular é o desequilíbrio oxidativo, a disfunção mitocondrial ocasionada pelo aumento do volume da organela, a ativação de diferentes enzimas e a dissociação de ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (PEIXOTO *et al.*, 2017).

Em geral, a necrose é considerada um processo de morte celular parcialmente controlado, sem gastos energéticos durante a execução. As principais causas que desencadeiam esse processo são fatores químicos como a administração de drogas; agentes físicos, por exemplo, a temperatura e a radiação; e biológicos como os patógenos, a hipóxia, as reações imunológicas, os distúrbios genéticos, bioquímicos e nutricionais (PEIXOTO *et al.*, 2017; PORTUGAL *et al.*, 2009).

1.2. TRATAMENTO DE NEOPLASIAS

As principais estratégias adotadas para o tratamento das neoplasias incluem a quimioterapia, radioterapia e os processos cirúrgicos. No entanto, existem outras modalidades de tratamento como a terapia hormonal, imunoterapia, transplante de medula óssea, entre outras (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A quimioterapia consiste na administração de fármacos que inibem o processo de divisão celular seguido da indução do processo de morte celular. Já radioterapia é fundamentada na interação entre ondas eletromagnéticas como os raios gama e partículas carregadas, visando à perturbação estrutural da molécula de ácido nucléico e conseqüentemente inviabilizando a posterior expansão. Já os processos cirúrgicos consistem na retirada local da massa tumoral (GUICHARD *et al.*, 2017; INCA, 2018).

As drogas quimioterápicas começaram a ser estruturadas concomitantemente ao desenvolvimento das armas utilizadas durante as guerras mundiais e atualmente é a categoria de tratamento mais empregada, sendo alguns fármacos estabelecidos nesse período ainda utilizados no tratamento (GUICHARD *et al.*, 2017).

A primeira droga antineoplásica, a Clorometina, foi estruturada a partir do gás mostarda utilizado durante a primeira guerra mundial. A administração dessa droga destinou-se ao tratamento de linfomas, visto que os efeitos colaterais dessa arma incluem sua atuação sobre as células do sistema linfático e medular, ocasionando a diminuição dessas populações celulares. A partir desse marco ocorreram grandes avanços nesta área, como o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, antibacterianos, antifolatos e outros, sendo muitos destes membros da química de primeira linha para o tratamento de diferentes doenças, baseando o desenvolvimento de novos tratamentos (GUICHARD *et al.*, 2017).

Em geral os tratamentos quimioterápicos empregados fundamentam-se na administração combinada de drogas visando aumentar a eficiência terapêutica e diminuir desenvolvimento de resistência a fármacos, visto que os tumores apresentam sub-populações celulares em estágios distintos, levando a diferentes níveis de sensibilidade, o que limita a eficácia da monoquimioterapia (MOKHTARI *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017).

Além do uso combinado dos quimioterápicos, rotineiramente a quimioterapia é utilizada em combinação com o método cirúrgico e a radioterapia, visando a cura, a redução de mecanismos de resistência ao tratamento e o aumento da sobrevida do paciente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; MOKHTARI *et al.*, 2017).

Os quimioterápicos mais empregados no tratamento do câncer são categorizados de acordo com o perfil de atuação. A distribuição dos mesmos ocorre entre três grandes grupos composto pelos antimetabólitos, alquilantes e inibidores mitóticos. Os fármacos que compõem a classe dos antimetabólitos inibem a biossíntese dos componentes essenciais para a composição de ácidos nucleicos, já a atuação das drogas de natureza alquilante baseia-se na interação direta com estrutura do DNA afetando o ciclo celular e os inibidores mitóticos atuam sobre o citoesqueleto comprometendo a fase de metáfase no processo de divisão celular (GUICHARD *et al.*, 2017).

Dentre os fármacos que interagem com estrutura do DNA e afetam o ciclo celular, o grupo mais empregado são os compostos de coordenação de platina, sendo a Cisplatina, a Carboplatina e a Oxaliplatina, as drogas com aprovação global de uso (Fig. 4) (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018; DILRUBA; KALAYDA, 2016).

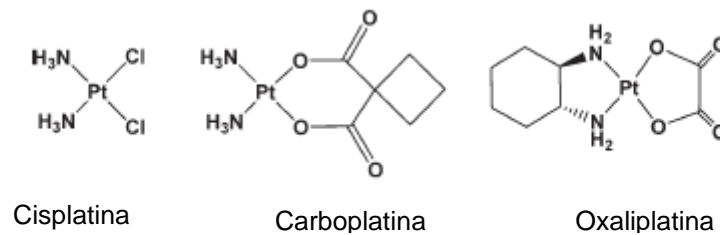


Figura 4. Os três quimioterápicos baseados em platina com aprovação global. Fonte: OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018.

1.2.1. METALOFÁRMACOS

O uso de compostos inorgânicos tem sido descrito a pelo menos 5.000 anos de história. O arsênio, por exemplo, foi relatado como forma de tratamento para casos de sífilis e dermatoses ao longo dos séculos (DILDA; HOGG, 2007). Sendo compostos baseados nesse elemento os primeiros a serem utilizados como tratamento de leucemias, durante o século XVIII e XIX (WAXMAN; ANDERSON, 2001). Além disso, há relatos sobre os valores medicinais do ouro, prata, cobre e outros, nas grandes civilizações antigas do mundo (WANG *et al.*, 2019). No entanto, o marco que consolidou esses compostos na história da medicina e impulsiona a busca de outros agentes desta natureza, foi à descoberta ao acaso da atuação inibitória dos produtos da hidrólise de platina em cultura de bactéria *Escherichia coli* por Rosenberg e colaboradores na década de 60, enquanto analisavam os efeitos do campo elétrico dos metais no processo de proliferação celular (KOSTOVA, 2006; ROSENBERG *et al.*, 1965).

Posteriormente, na década 70, relatou-se a atuação antineoplásica dos compostos de platina, cis-diaminotetracloroplatina (IV) cis-[Pt(NH₃)₂Cl₄] e cis-diaminodicloroplatina (II) [cis-(NH₃)₂PtCl₂] em tumores do tipo sarcoma 180 e leucemias de murinos L1210, observando-se a ausência de efeitos irreversíveis para o hospedeiro em diferentes dosagens e tempo de tratamento, sendo este o primeiro relato de quimioterápicos ativos na regressão de grandes tumores (ROSENBERG; VANCAMP, 1970).

Na década 90, foram aprovados os fármacos de segunda geração derivadas de platina como, por exemplo, a Carboplatina [Pt(C₆H₆O₄)(NH₃)₂], que apresenta menor grau de citotoxicidade que a Cisplatina e redução dos efeitos colaterais gerados em resposta ao tratamento, viabilizando assim a administração do fármaco em

concentrações maiores e facilitando o seu uso clínico associado com outros quimioterápicos. Além da Carboplatina, a Lobaplatina e Nedaplatina compõem essa classe, porém esses fármacos estão disponíveis apenas em alguns países como a China e o Japão, respectivamente (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018; DILRUBA; KALAYDA, 2016).

Apesar de apresentar atuação farmacológica promissora, as duas gerações estruturadas a partir da platina apresentam duas grandes limitações, os efeitos colaterais e a resistência intrínseca ou a adquirida ao tratamento. Em geral os principais efeitos colaterais relacionados com as drogas de primeira geração são a nefrotoxicidade, as náuseas e a ototoxicidade, e observa-se a correlação entre a mielossupressão e a administração das drogas da segunda geração (HARRACH; CIARIMBOLI, 2015). Embasados nessas questões, posteriormente, as drogas de terceira geração desta classe foram aprovadas, sendo a Oxaliplatina (trans-diaminociclohexaneoxalatoplatina(II)) o membro comercializado com atuação farmacológica reconhecida sobre vários tipos de tumores refratários às gerações anteriores dos derivados de platina (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018; DILRUBA; KALAYDA, 2016).

Embora a administração desses fármacos esteja correlacionada com efeitos colaterais e com os mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos em resposta ao tratamento, o êxito clínico desses compostos embasam novas pesquisas que visam descrever a atuação farmacológica de íons desta natureza e a estruturação de análogos com potencial atuação terapêutica, objetivando a redução da toxicidade, minimização dos mecanismos de resistência, maior seletividade e o desenvolvimento de drogas que possam ser administradas por via oral (DILRUBA; KALAYDA, 2016; ABU-SURRAH; KETTUNEN, 2006; KOSTOVA, 2006).

Dentre os fármacos propostos desta natureza, os compostos que apresentam os centros metálicos formados por rutênio (Ru), gálio (Ga), ferro (Fe), paládio (Pd), ouro (Au), zinco (Zn), titânio (Ti) e cobre (Cu^{2+}), ganham destaque por apresentarem potencial atuação antineoplásica, muitas vezes mais acentuada que a Cisplatina (LEWIS; TOLMAN, 2004; SPRECKELMEYER; ORVIG; CASINI, 2014; HORN *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2015; MORCELLI *et al.*, 2016; NADAI, 2016).

1.2.2. COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE

O cobre (Cu^{2+}) é um dos elementos traços mais importantes para o funcionamento celular, sendo o terceiro mais abundante no corpo humano. O íon atua como co-fator para muitas metaloproteases, como a citocromo C oxidase, superóxido dismutase 1, participando assim de diferentes vias metabólicas, envolvendo o processo de detoxificação, formação de tecidos, respiração mitocondrial, síntese de hormônios, coagulação, metabolismo do ferro e muitos outros processos, sendo indispensável para a homeostase do organismo (BHATTACHARJE *et al.*, 2017).

O nível de concentração intracelular deste íon associado a metaloproteases varia entre 75 a 100 mg, que são distribuídos em diferentes compartimentos celulares em resposta a demanda metabólica e alterações no meio intracelular. Ao ser absorvido, o Cu^{2+} é direcionado para o fígado, onde é redirecionado para a corrente sanguínea através da ceruloplasmina e da albumina, com posterior transporte para o meio intracelular com auxílio da proteína transportadora de cobre (CTR1), atuando em seguida por meio de processos redox (FESTA; THIELE, 2011).

Esse padrão de regulação de Cu^{2+} não se observa em tecidos tumorais, sendo relatadas concentrações mais elevadas do íon em células neoplásicas, devido a potencial atuação do metal no processo de angiogênese, no qual, o íon é relatado como co-fator para metaloproteases que medeiam a produção de citocinas, a degradação da matriz celular e o processo de migração de células (BHATTACHARJE *et al.*, 2017).

Além disso, a redução do Cu (II) para Cu (I) resultante do caráter anóxico das células cancerosas, confere seletividade aos compostos desta categoria (TABTI *et al.*, 2017; GRAF; LIPPARD, 2012)

Baseando-se na característica endógena do íon e no pressuposto de um nível mais baixo de citotoxicidade, vários estudos buscam determinar o perfil de atuação antineoplásico frente a diferentes tipos celulares como nas linhagens de adenocarcinomas de mama (TÜRKKAN *et al.*, 2017), carcinoma pulmonar (ROGOLINO *et al.*, 2017; MACIEL, 2016), próstata (XIE; PENG, 2017), adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma retal (YANG *et al.*, 2019), neuroblastoma (GARCÍA-RAMOS *et al.*, 2017), carcinoma de laringe, leucemia humana e cólon humano (BORGES *et al.*, 2016; NADAI, 2016; FERNANDES *et al.*, 2015). Relata-se

também baixa citotoxicidade sobre linhagem primária fibroblasto normais (REVATHI *et al.*, 2017) e linfócitos do sangue periférico (GARCÍA-RAMOS *et al.*, 2017).

Segundo Marzano e colaboradores (2009) mais de cinquenta complexos derivados do íon cobre já foram testados e apresentam atividade citotóxica frente a diferentes células neoplásicas. Embora esses complexos sejam estruturalmente distintos, os complexos de cobre afetam o DNA e uma miscelânea de proteínas induzindo toxicidade geral, devido a sua participação em reações redox, no qual é produzida uma alta concentração ROS através da reação de Fenton (SANTINI *et al.*, 2014), conduzindo as células tumorais, muitas vezes, a morte por apoptose (YANG *et al.*, 2018; GARCÍA-RAMOS *et al.*, 2017, NADAI, 2016; MACIEL, 2016; BORGES *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2012).

Além da atividade antitumoral, os complexos de coordenação derivados do Cu^{2+} apresentam atuação anti-inflamatória (BOULSOURANI *et al.*, 2017), antimicrobiana (DJOKO *et al.*, 2014) e antiparasitária (PORTES *et al.*, 2016). Atualmente o complexo de cobre (II) de Indometacina é o único metalofármaco derivado desse íon que está sendo comercializado, tendo atuação anti-inflamatória, o fármaco é utilizado na medicina veterinária para o tratamento de caninos e equinos (WEHBE *et al.*, 2017). Embora a comercialização de medicamentos derivados deste metal não apresente aprovação para tratamento de patologias humanas, membros das classes de complexos de cobre denotados como Casiopeínas ganham destaque em pesquisas médicas neste campo, estando a Casiopeína III (aqua,4,4-dimethyl-2,2'-bipyridine, acetylacetonato copper(II) nitrate) em fase de teste clínico (SANTINI *et al.*, 2013; SERMENT-GUERRERO *et al.*, 2017).

Embasados nessa potencial atuação dos complexos de coordenação o grupo de pesquisa em Química Bioinorgânica, do Laboratório de Ciências Químicas do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, coordenados pelos Professores Dr. Adolfo Horn Junior e Dra. Christiane Fernandes, em parceria com O Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da mesma instituição, coordenado pelo Professor Dr. Milton Masahiko Kanashiro, tem investigado a síntese e a determinação do perfil farmacológico de diferentes complexos de coordenação, incluído o complexo de coordenação de cobre (PEREIRA, 2017; MACIEL, 2016; FERNADES *et al.*, 2015; FREITAS, 2014; BORGES, 2013; LOPES, 2012; BULL, 2008).

A atividade destes complexos derivados de cobre vem sendo relatada em vários trabalhos desses grupos. Bull (2008) avaliou em linhagens leucêmicas U-937 e THP-1, a atuação farmacológica de dois complexos de coordenação de cobre estruturados com ligantes contendo uma piridina e o outro apresentando uma piridina e um grupamento fenol em sua estrutura. Posteriormente, Lopes (2012) estruturou oito complexos de coordenação desta natureza e verificou a atividade biológica sobre as linhagens leucêmicas U-937 e THP-1. Dentre os compostos testados, o composto $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ exibiu a concentração inibitória de 50% (EC_{50}) de $13,85\mu\text{M}$ para as células U937 e $11,06\mu\text{M}$ para as células THP-1, sendo este composto mais ativo que a Cisplatina. Borges (2013) verificou atividade antineoplásica de compostos de coordenação de cobre (II) contendo ligantes N,O-doadores e a unidade naftoil, frente às linhagens humanas leucêmicas U-937 e THP-1 e linhagem de melanoma murino B16F10 e humana SK-MEL5. Subsequente Freitas (2014) avaliou os efeitos antineoplásicos de complexos de cobre *in vivo*, em camundongos Balb/C e C57BL/6, verificando a dose letal mediana e a inibição do desenvolvimento de lesões subcutâneas. Borges (2016) analisou a atuação farmacológica destes compostos frente às linhagens leucêmicas THP-1, U937, HL60, Molt-4, JURKAT, em linhagem de colón de câncer COLO 205 e melanoma murino B16F10, seguido da análise de atividade *in vivo*, em camundongos Balb/C sensíveis à linhagem leucêmica THP-1 e melanoma murino B16F10. No mesmo ano Maciel (2016) avaliou as alterações morfofuncionais ocasionadas pelo tratamento do composto de coordenação cobre α , frente à linhagem de carcinoma de pulmão humano NCI-H460. Posteriormente, utilizando a mesma linhagem, Pereira (2017) analisou as alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pela administração *in vitro* do composto de coordenação cobre β .

1.2.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE NEOPLASIAS

A combinação entre medicamentos é uma prática comum ao longo da história da medicina, desde os primórdios há registros de combinações de infusões de espécimes vegetais para o tratamento de diversas doenças (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015; YUAN, 2000). Essa estratégia visa aumentar a eficiência terapêutica de forma

que os fármacos atuem simultaneamente sobre diferentes subpopulações celulares ou doenças distintas em uma menor concentração com a redução do tempo de administração, aumentando a seletividade e minimizando a toxicidade sistêmica, evitando assim os possíveis efeitos colaterais e diminuindo o percentual de resistência gerada ao tratamento (CHOU, 2006). Dessa forma, as combinações entre fármacos são apontadas como estratégias eficazes para os tratamentos de várias doenças, incluindo as neoplasias (HUMPHREY *et al.*, 2011; GLASS, 2004; NELSON, 2001; LARDER *et al.*, 1995; OVERSTEEGEN *et al.*, 2007).

Apesar de ser uma prática clínica comum no tratamento do câncer, a maior parte dos protocolos de associação utilizados atualmente foram obtidos de forma empírica, portanto não forneceram dados no primeiro momento que respaldaram as alterações fisiológicas ocasionadas em resposta ao tratamento (ZOLI *et al.*, 2001). Sendo assim, a compreensão dos aspectos biológicos da doença, a interconexão de vias, alvos suscetíveis, juntamente com a farmacodinâmica da associação de fármacos potencializam a eficácia do tratamento, diminui a toxicidade e mecanismos de resistência (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015).

Segundo Zoli e colaboradores (2001) as avaliações pré-clínica das associações entre drogas permitem a estruturação de protocolos mais racionais, econômicos e seguros, pois essas avaliações permitem verificar os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos, os mecanismos de ação das drogas através das análises de perturbações do ciclo celular, do mecanismo de morte das células e dos marcadores moleculares e bioquímicos.

A associação entre fármacos pode resultar em um perfil de atividade sinérgico, enquanto outros podem apresentar efeitos aditivos ou até mesmo antagônicos, sendo o efeito maior, igual ou menor que a atuação individual dos fármacos (CHOU, 2006).

Segundo Jia e colaboradores (2009), as associações de drogas que resultam em um perfil sinérgico ou potenciado são exploradas objetivando a redução de doses administradas, o aumento da eficácia farmacológica, redução ou retardo dos mecanismos de resistência e redução de efeitos colaterais.

Dentre os protocolos de associações que apresentam sinergia adotados como estratégia base para o tratamento de neoplasias está à combinação entre a Cisplatina com outros quimioterápicos (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Os derivados de platina são metalofármacos utilizados no tratamento de vários tumores como os cânceres de

ovário, cabeça, pescoço, esôfago, coluna cervical e testículo (SCHENK *et al.*, 2001; RAJESWARAN *et al.*, 2008). No entanto, observa-se um elevado percentual de resistência aos medicamentos dessa classe, devido a alterações no processo de absorção e efluxo de substâncias, aumento da biotransformação, detoxificação no fígado, reparo estrutural no DNA e nos mecanismos anti-apoptóticos (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; GOTTESMAN *et al.*, 2002). Para o tratamento desses tumores resistentes que acometem o trato biliar, o pulmão, o estômago, as glândulas salivares, a mama, o intestino, a próstata, o tecido epitelial, o pâncreas, o colo do útero, o trato genital masculino e as células escamosas, é usual a administração da Cisplatina associado com outras drogas (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Nos casos de câncer de ovário, por exemplo, a estratégia de primeira linha de tratamento é a associação entre a Cisplatina e o Paclitaxel (CAI *et al.*, 2015). Segundo Dasari e Tchounwou (2014), a Cisplatina associada com o Paclitaxel, a Doxorubicina, a Gencitabina e a vitamina D, mostram-se como uma estratégia eficiente para o tratamento de neoplasias que acometem o estômago, a glândula salivar, a vesícula biliar e o colo do útero, respectivamente.

Além do efeito sinérgico relatados nas associações entre os compostos derivados de platina e os fármacos referências, há relatos da potencial atuação sinérgica entre a Cisplatina e os produtos de origem naturais como, por exemplo, a combinação com o veneno de abelha frente a linhagem de carcinoma de ovário humano A2780 (ALIZADEHNOHI *et al.*, 2012) e oleandrina oriunda das folhas de *Nerium oleander* sobre as linhagens de próstata PC3, LNCaP e 22Rv1, adenocarcinoma de mama humana MCF-7, adenocarcinoma de pulmão CALU-1, COLO699N e COR-L 105, carcinoma de cólon HCT-116, HT55 e HCT-15, melanoma A375 e adenocarcinoma de pâncreas PANC-1 (APOSTOLOU *et al.*, 2013).

Baseado neste êxito clínico da associação entre a Cisplatina com outros fármacos, vários estudos visam analisar as combinações de novos metalofármacos com fármacos comercializados. Geromichalos e colaboradores (2005) avaliaram a atuação farmacológica entre complexos de cobre associados a Carboplatina, Ciclofosfamida e Paclitaxel sobre a linhagem de câncer de mama T47D. Posteriormente, Pivetta e colaboradores (2015) analisaram a atuação terapêutica de três novos complexos de cobre combinado com a cisplatina em linhagem leucêmica (CCRF-CEM) e de carcinoma de ovário humano (A2780) e em sub-linhagens

resistentes dessa natureza, (CCRF-CEM-res e A2780-res). E recentemente Davila-Manzanilla e colaboradores (2017) avaliaram o efeito da associação entre complexos de cobre baseados em Casiopeínas com a Cisplatina. Em todos estes estudos as associações apresentaram perfil de atuação sinérgico impulsionando as pesquisas desta natureza.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças e agravos não transmissíveis (DANT) são problemas centrais de saúde pública, devido à alta incidência e elevada taxa de óbito. Dentre as DANTs o câncer é uma das doenças que mais se destaca, juntamente com as doenças cardiovasculares, sendo a segunda causa de morte mais recorrente da população brasileira. O país estima um aumento de 9% de novos casos de câncer, para cada ano do biênio 2018-2019. Pressupõe-se ainda que até o ano 2030, mais de 70 milhões de pessoas no mundo vivam com a doença (INCA, 2018).

Esse cenário influencia diretamente o potencial do desenvolvimento socioeconômico dos países, pois acomete a população ativa, reduzindo a produtividade, onerando o sistema de saúde, gerando um débito considerável aos cofres públicos e muitas vezes ocasionando a morte prematura da pessoa acometida (INCA, 2018; GASKIN *et al.*, 2011).

As principais estratégias terapêuticas utilizadas para o tratamento da doença normalmente são a radioterapia, a quimioterapia e os métodos cirúrgicos. Sendo necessária, na maioria dos casos, a combinação de quimioterápicos com mais de uma modalidade de tratamento, visando aumentar a eficiência terapêutica e minimizar os mecanismos de resistência (GUICHARD *et al.*, 2017; INCA, 2019).

Os derivados de platina, por exemplo, são metalofármacos amplamente utilizados no tratamento de vários tumores, como os cânceres de ovário, cabeça, pescoço, esôfago, coluna cervical e testículo (SCHENK *et al.*, 2001; RAJESWARAN *et al.*, 2008). No entanto, observa-se um elevado percentual de resistência aos medicamentos dessa classe em tumores que acometem o trato biliar, o pulmão, o estômago, as glândulas salivares, a mama, o colorretal, a próstata, o tecido epitelial, o pâncreas, o colo do útero, o trato genital masculino e as células escamosas, por isso, é usual a administração da Cisplatina que é um desses derivados de platina associado com outras drogas (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Baseado neste êxito clínico da associação entre a Cisplatina com outros fármacos, vários estudos visam analisar as combinações de novos metalofármacos com fármacos já comercializados (GEROMICHALOS *et al.*, 2005; PIVETTA *et al.*, 2015; DAVILA-MANZANILLA *et al.*, 2017). Fundamentando-se nestes aspectos e em resultados promissores do grupo de pesquisa em Química Bioinorgânica da

Universidade Estadual do Norte Fluminense em parceria com o Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da mesma instituição, este trabalho visa avaliar os efeitos antineoplásico da associação entre um composto de coordenação de cobre com a Cisplatina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* da associação entre um composto de coordenação de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O com o fármaco Cisplatina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as linhagens mais sensíveis ao composto de coordenação de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (CC1) e a Cisplatina (CDDP) para testar a melhor dose combinada, por meio de ensaio de MTT;
- Verificar o possível efeito sinérgico da combinação testada (CC1 + CDDP) através de ensaio de MTT e cálculo do índice de combinação (CI).
- Investigar a indução de morte celular por apoptose em linhagens sensíveis ao tratamento em associação, através da análise do ciclo celular, do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspases e alterações morfoestruturais.

4. METODOLOGIA

4.1. CULTIVO CELULAR

A linhagem H460 (carcinoma de pulmão) foi adquirida da *American Type Culture collection* (ATCC). Enquanto as linhagens MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama), A549 (carcinoma de pulmão), PC3 (carcinoma de próstata) e BXPC3 (adenocarcinoma pancreático) são procedentes do banco de células do RJ (BCRJ). Após o descongelamento as células foram cultivadas em meio D-MEM F12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), sendo mantidas incubadas em estufa (Forma Scientific, Inc, Modelo 3159 S/N 33808-427) a 37 °C, com 5 % de CO₂ e atmosfera umidificada, sendo observadas e tripsinizadas após atingir confluência maior que 70 %.

A linhagem normal, células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), foi obtida do sangue de voluntários saudáveis, coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (Becton Dickinson) contendo heparina sódica e processado pela metodologia descrita por Bennett e Breit (1994). As células obtidas foram cultivadas em meio D-MEM F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL), nas mesmas condições referidas para cultivo de células neoplásicas.

4.2. DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS COMPOSTOS

O composto de coordenação de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (CC1) foi sintetizado no Laboratório de Ciências Químicas do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela equipe dos Professores Dr. Adolfo Horn Jr e Dra. Christiane Fernandes, seguindo metodologia descrita por Lopes (2012) e foi gentilmente cedido para esta dissertação. O composto foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mM e mantido a -20 °C. A Cisplatina (CDDP) (Sigma-Aldrich. St.Louis, MO, USA) foi diluída em meio D-MEM F12 não suplementado na concentração de 5mM e estocada a -20 °C.

4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

O ensaio de viabilidade celular se baseou na metodologia descrita por Mosmann (1983), no qual se avalia a metabolização do MTT (brometo de 3-(4,5-17 dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltretazólio) através da formação de compostos coloridos de formazan. As células foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL/poço) na concentração 1×10^5 células/mL juntamente com os compostos analisados em concentrações seriadas de 1,5 - 100 µMol/L.

As placas experimentais foram incubadas por 48 horas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada. Em seguida, foi adicionado 10 µL de MTT (Sigma, 5,0 mg/mL) para cada 100 µL de cultivo, seguido da posterior incubação das placas por quatro horas. Após esse período, foram retirados 150 µL do sobrenadante de cada poço e, em seguida, adicionados 100 µL de uma solução de isopropanol com 0,04% de HCl concentrado. Posteriormente, a placa foi centrifugada (centrífuga SORVALL®, modelo RT-7) a 1500 rpm por 10 minutos, seguido da retirada 100 µL do sobrenadante que foi transferido para outra placa de 96 poços. A leitura dos valores de absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (EPOCHTM, BioTax® Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 570 nm.

4.4. VERIFICAÇÃO DE SINERGIA ENTRE O COMPLEXO DE COBRE E A CISPLATINA

Para a verificação de um possível efeito sinérgico as linhagens foram tratadas com o CC1 e a CDDP em associação. As concentrações administradas foram determinadas de acordo com os valores de EC₅₀ obtidos nos testes de viabilidade por MTT, realizados com ambos os compostos isoladamente. As células neoplásicas, na concentração final de $1,0 \times 10^5$ células/mL, foram semeadas em placas de 96 poços. O tratamento baseou-se de doses contendo seis concentrações crescentes de cada composto, originando 36 combinações diferentes. Todas as condições de tratamento foram realizadas em triplicata, em um mesmo experimento. Após 48 horas de incubação da placa experimental, o processamento subsequente seguiu o teste de viabilidade por MTT descrito anteriormente no item 4.3.

Após a obtenção dos valores de EC₅₀ obtidos da curva de viabilidade com MTT e determinação da proporção utilizada nos testes subsequentes, foi selecionada a linhagem mais sensível ao tratamento.

Após essa seleção e determinação da proporção de uso, foi realizada a mensuração do efeito citotóxico desta proporção através do ensaio colorimétrico MTT, na linhagem de adenocarcinoma mamário, MDA-MB 231. A natureza da associação entre CC1 e CDDP foi analisada pelo método descrito por Chou e Talalay (1984), baseando-se na lei da ação das massas e no princípio do efeito-médio (CHO; TALALAY, 1984). Os efeitos resultantes das combinações foram expressos através do índice de combinação (CI), calculados através do *software CalcuSyn* (BIOSOFT, 2018). Se o CI for < que 1 indica sinergia, se o CI=1 aponta o efeito aditivo da combinação ou se CI>1 o efeito é considerado antagônico (CHOU, 2014; ZHANG, et al. 2016; CHOU, 2006).

4.5. CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas a partir de 30 mL de sangue de indivíduos saudáveis. A separação foi processada conforme a metodologia descrita por Bennett e Breit (1994) utilizando centrifugação em gradiente de FICOLL (GE,PM400). Em tubos cônicos de 50mL contendo 7,5mL de FICOLL foi adicionado lentamente 15 mL de sangue. O material foi então centrifugado (Centrifuga Sorval, RT7) à 1500 rpm por 40 min a 20 °C e o anel de células mononucleares foi removido e lavado três vezes com meio de cultura DMEM/F12 gelado, sendo a lavagem processada por ciclos de 1500 rpm por 10min, a 4°C. Após as lavagens, as PBMC foram quantificadas e ressuspensas em meio DMEM/F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 20 µg/mL de gentamicina e 0,25 µg/mL Enterotoxina B de *Staphilococcus* (SEB) (Sigma, S0812). Em seguida, foram semeadas em placas de culturas de células de 96 poços (TPP, 92096), onde foram distribuídos 100 µL da cultura celular na concentração de 1 x 10⁶ células/mL.

4.6. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO

A linhagem experimental, na concentração de 1×10^5 células/mL, foi depositada em volume de 500µL/poço, em placas de 24 poços. Após adição de 500µL/poço dos compostos diluídos em meio D-MEM F12 suplementado (Gibco, BRL), nas concentrações finais de 22,2 mg/L do CC1, 48,4 mg/L da CDDP e 31,6 mg/L mg/L de MIX (9,8 mg/L do CC1 e 21,8 mg/L da CDDP), a placa foi incubada por 12 e 24 horas em estufa (37 °C, 5% de CO₂ e umidade controlada). Essas concentrações foram determinadas a partir dos resultados obtidos nos testes de MTT. As células controle foram incubadas apenas com meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado. Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (1 mL) foi transferido para microtubo e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O *pellet* obtido foi lavado duas vezes com PBS e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm em cada lavagem. Depois de lavado, ao *pellet* foi adicionado lentamente a 1 mL de etanol 70 % gelado e as células submetidas a fixação por 30 minutos a 4 °C. Após o período de fixação, essas células foram sedimentadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 min e o pellet formado foi lavado com tampão fosfato-citrato (0,2 M, pH=7,8) e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado foram adicionados 50 µL de RNase A (100µg/mL Sigma, R4875) e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 400 µL de solução contendo iodeto de propídio (concentração final 50 µg/mL; Sigma, P4170).

As células foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur™, modelo 342973) onde foram contados 10.000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em sub-G1 foram obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

4.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (JC-1) POR CITOMETRIA DE FLUXO

As linhagens experimentais foram tratadas e incubadas como descrito no item anterior. Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (1 mL) foi transferido para microtubo e centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* foi adicionado 500 µL de solução de JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' -

tetracloro - 1,1',3,3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (25 µg/mL, Sigma) diluídos em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL). As células, depois de ressuspensas, foram incubadas por 15 minutos em estufa (37 °C, 5 % de CO₂ e umidade controlada). A seguir, as células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e lavadas duas vezes com 1 mL de meio de cultura D-MEM F12 (Gibco, BRL). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido ressuspensado em 500 µL de meio DMEM F12 (Gibco, BRL). 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.

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES

A avaliação da indução de morte celular por apoptose foi verificada pela quantificação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 por meio de ensaio colorimétrico. Assim, a linhagem foi submetida (1×10^7 células/amostra) ao tratamento com o composto na concentração ideal previamente determinada por 12 e 24 hs. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 1000 rpm por 5 min e lisadas com tampão de lise (1 % Triton x-100, 0.32 M sacarose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM dithiothreitol, 1 mM inibidor). Posteriormente, 50 µL desse lisado (concentração protéica de 4 mg/mL) foi transferido para uma placa de 96 poços e incubados com 15 µL dos substratos IETD-pNA, LEHD-pNA, DEVD-pNA e VEID-pNA das caspases 8, 9, 3 e 6, respectivamente, na concentração de 1,5 mM e 50 µL de tampão de reação de caspase 2x (200 mM HEPES, 20 % glicerol, 0,2 % CHAPS e 20 mM de DTT) a 37 °C por 1 h. A leitura dos valores de absorbância das amostras foram realizada em espectrofotômetro (EPOCH™, BioTax® Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 405 nm.

4.9. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A fim de observar as alterações induzidas pelo composto de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (CC1), Cisplatina e MIX, as células de adenocarcinoma mamário MDA-MB231, foram plaqueadas em volume de 500 µL/poço [1×10^6 células/mL] em

placas de cultivo celular de 24 poços. Em seguida, foram adicionados 500 µL/poço do composto CC1 na concentração final de 22,2 mg/L, 48,4 mg/L da CDDP e 31,6 mg/L mg/L de MIX (9,8 mg/L do CC1 e 21,8 mg/L da CDDP). As células foram incubadas por 12 h em estufa (37 °C e 5 % de CO₂). As amostras foram lavadas com PBS 2X e incubadas por 30 minutos em estufa (37 °C e 5 % de CO₂), com 500µL de solução do corante para núcleo Hoechst red 33342 (Invitrogen, Molecular Probes™, 1 µg/mL em meio de cultura) e solução do corante para mitocôndria MitoTracker (Invitrogen, Molecular Probes™, concentração final de 0,1µM em meio de cultura). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas foram acomodadas em lâminas e observadas em microscópio de fluorescência (Axioplan – Carl Zeiss), fotografadas utilizando o software AxioVision 4.6.3.

4.10. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para caracterização da integridade na superfície celular, as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 foram plaqueadas em volume de 3 mL/poço [1 x 10⁶ células/mL] em placas de cultivo celular de 12 poços. Em seguida, foram adicionados 3 mL/poço nas concentrações finais de 11,1 mg/L do CC1, 24,2 mg/L da CDDP e 15,8 mg/L mg/L de MIX (4,9 mg/L do CC1 e 10,9 mg/L da CDDP), incubadas nos períodos de 6 e 12 h em estufa (37 °C e 5 % de CO₂). As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm e lavadas 2X com Tampão PBS, pH 7,2. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi fixado por 1 h com glutaraldeído 2,5 % (Sigma®, EUA) e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Após a fixação as células foram lavadas 2X no mesmo tampão, durante 5 minutos em cada etapa. Em seguida as células foram aderidas em lamínulas revestidas com poly -L- lisina (Sigma®, EUA), pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1 % e ferricianeto de potássio 0,8 %, lavadas 3X com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de álcool: 50 %, 70 %, 90 % e a 100 % 3X (durante 20 minutos em cada etapa). As amostras foram secas com clorofórmio, montadas em *stubs*, pulverizadas com paládio (metalização) no aparelho Sputter Coater SDC 050 e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM - 962 a 15 KV.

4.11. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para verificar alterações ultraestruturais, as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 foram plaqueadas em volume de 5mL/poço [1×10^6 cels/mL] em garrafas de cultivo celular de 25 cm². As células foram tratadas com as concentrações finais de 11,1 mg/L do CC1, 24,2 mg/L da CDDP e 15,8 mg/L mg/L de MIX (4,9 mg/L do CC1 e 10,9 mg/L da CDDP) e incubadas nos períodos de 6 e 12 h em estufa (37 °C e 5 % de CO₂). As células foram centrifugadas, por 10 minutos a 1500 rpm e lavadas 2X com tampão PBS, pH 7,2. O *pellet* foi fixado por 1h com glutaraldeído 2,5% (Sigma ®) e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. Após a fixação as células foram lavadas 2 vezes no mesmo tampão, pós-fixadas por 20 minutos, protegidas da luz, em solução 1:1 com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, lavadas 3 vezes com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de acetona: 50%, 70%, 90% e a 100%, durante 20 minutos cada etapa.

Para a infiltração em resina foi utilizado uma mistura de acetona/EPON®, na proporção de 2:1, 1:1, 1:2 trocado a cada 8 horas. Posteriormente, as amostras foram embebidas em EPON puro, acomodadas em moldes de silicone e polimerizadas por 48 horas a 60 °C. Os blocos polimerizados foram seccionados em ultramicrótopo *Reichert Ultracults* e os cortes ultrafinos colocados em grades de cobre. As micrografias foram tiradas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

4.12. INTERAÇÕES QUÍMICAS

As interações químicas foram avaliadas através do deslocamento máximo de absorbância do cobre isolado e em associação por espectrofotometria UVVis.

Os compostos foram diluídos em solução etanol/água (50:50), sendo 10 mg de CDDP e 18 mg do CC1. Posteriormente, após a homogeneização a solução foi analisada por espectro eletrônico.

4.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O programa *GraphPad Prism* versão 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas. Nos testes de análise de citotoxicidade dos compostos foi realizado o teste estatístico One-way ANOVA. Os valores de EC₅₀ foram determinados através da curva de regressão não linear. As diferenças significativas foram consideradas como $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO DE COBRE E CISPLATINA NA VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO MTT

O efeito citotóxico do composto de coordenação de cobre (CC1) e da Cisplatina (CDDP) foram mensurados frente às linhagens de carcinoma de mama (MDA-MB231), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma de pulmão (H460 e A549) e carcinoma de pâncreas (BXPC-3) através do ensaio colorimétrico MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólio (MOSMAN, 1983).

Os valores de densidade ópticas, resultantes da redução do sal tetrazólio em cristais púrpura de formazan, foram utilizados para calcular a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (EC_{50}) dos diferentes tratamentos frente às linhagens apresentadas na Tabela 1, utilizando o programa *GraphPad Prism versão 5.0*.

Tabela 1. Valores de EC_{50} (mg/L) da curva de viabilidade por MTT.

Linhagens	CC1	CDDP
MDA-MB231	11,1 ± 0,8	24,2 ± 1,0
PC-3	10,3 ± 1,1	14,3 ± 1,0
BXPC-3	6,9 ± 1,1	3,9 ± 1,0
H460	13,1 ± 1,0	7,35 ± 1,1
A549	19,3 ± 1,4	25, 2 ± 1,0

As células tumorais foram tratadas por 48 h com o composto de coordenação de cobre isolado (CC1) e Cisplatina isolada (CDDP). Os valores de EC_{50} (mg/L) foram calculados pelo *software Graphpad Prism versão 5.0*, pelo método de regressão não linear.

Os valores de EC_{50} demonstraram a atividade citotóxica do CC1 e CDDP, frente às diferentes linhagens testadas. O CC1 mostrou-se mais efetivo que a CDDP sobre as linhagens MDA-MB 231, PC3 e A549, sendo a EC_{50} da CDDP aproximadamente 120%, 40%, 30% maior que a EC_{50} da CC1 para essas linhagens, respectivamente.

5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA ASSOCIAÇÃO COMPOSTO DE COBRE NA VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO MTT

Após a mensuração da atividade citotóxica do CC1 e CDDP foi realizado uma curva de dose-resposta da associação desses compostos através do ensaio colorimétrico MTT, visando determinar a melhor proporção de uso e determinar posteriormente o perfil farmacológico desta combinação. A CDDP é um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer, porém devido aos efeitos colaterais gerados em resposta ao tratamento, a associação desta com outros fármacos tem sido comum na clínica médica (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Desta forma, visando diminuir a dose administrada, potencialmente os efeitos colaterais e o tempo de administração, a CDDP e CC1 foram associados.

Em todos os tratamentos observou-se a redução da EC_{50} , e frente as linhagens, no qual, o CC1 mostrou-se mais efetivo que a CDDP, MDA-MB231, PC3 e A549, a proporção de uso combinado obtido é aproximadamente 1:2 (Tabela 2). Portanto, a cada dose administrada de CC1, o dobro deve ser administrado de CDDP.

Nas linhagens BXPC3 e H460, a CDDP mostrou-se mais efetiva que CC1, a proporção de uso combinado obtido foi de aproximadamente 1:2. Portanto, a cada dose administrada de CDDP, o dobro deve ser administrado de CC1 (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de EC_{50} (mg/L) da curva de viabilidade por MTT.

Linhagem	CC1	CDDP	CC1 + CDDP
MDA-MB 231	11, 1 ± 0,8	24, 2 ± 1,0	1,6 + 3,6 ± 1,0
BXPC-3	6,9 ± 1,0	3,9 ± 1,0	2,9 + 1,7 ± 1,0
PC3	10,3 ± 1,0	14,3 ± 1,0	2,0 + 5,2 ± 1,0
H460	13, 1 ± 1,0	7,35 ± 1,0	6,6 + 3,8 ± 1,0
A549	19,32 ± 1,0	25,2 ± 1,0	9,0 + 25,0 ± 1,0

As células tumorais foram tratadas por 48 h com o composto de coordenação de cobre isolado (CC1), Cisplatina isolada (CDDP) e a associação dos compostos (CC1 + CDDP). Os valores de EC_{50} (mg/L) foram calculados pelo *software Graphpad Prism* versão 5.0, pelo método de regressão não linear.

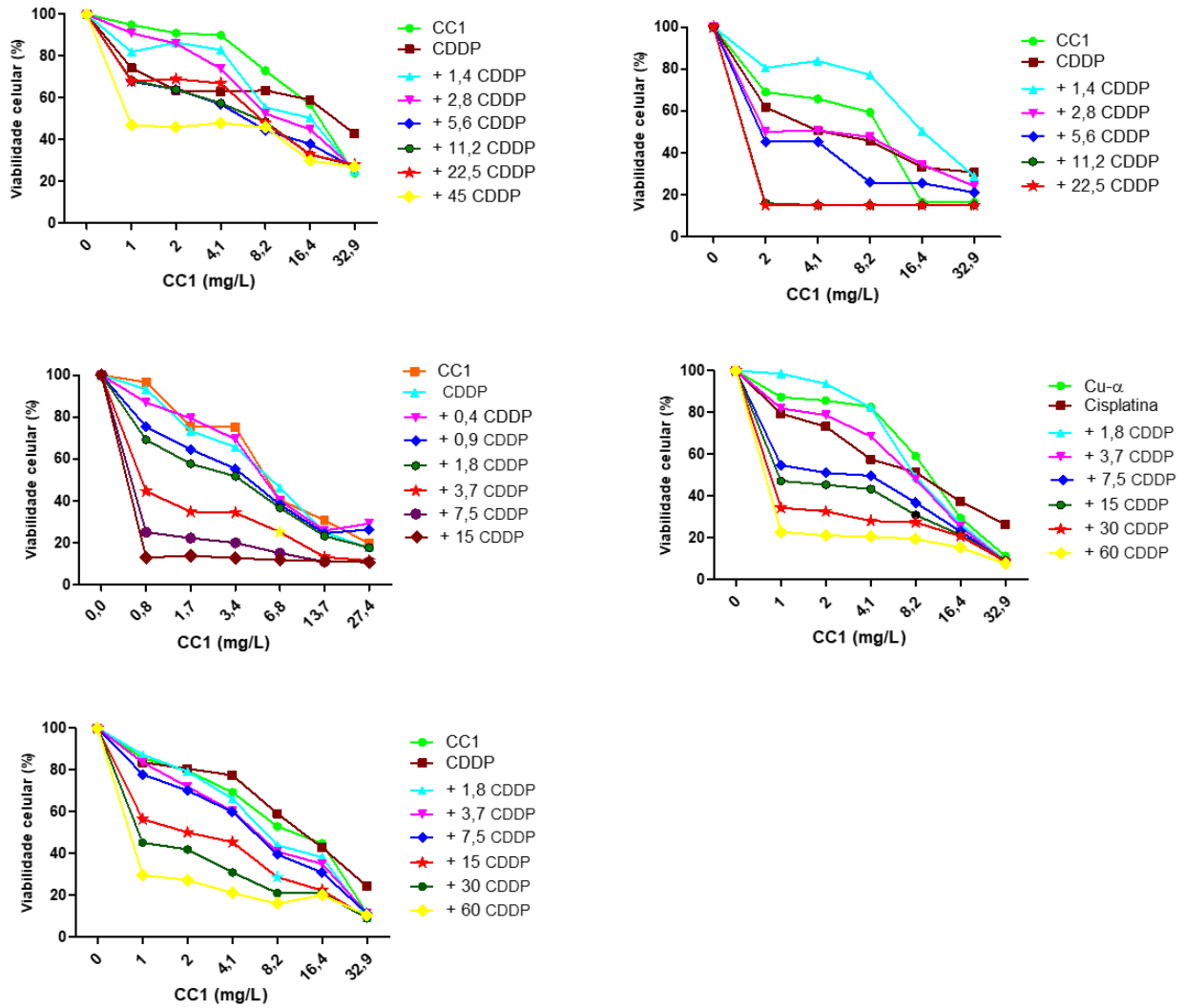


Figura 5: Citotoxicidade do composto de cobre (CC1) e cisplatina (CDDP) isolados e/ou combinados. As células foram plaqueadas e tratadas por 48h com CC1 e a CDDP em concentrações crescentes isoladas ou em associação em linhagem celular (a) A549, (b) H460, (c) BXP3, (d) PC3 e (e) MDA-MB231. A viabilidade foi determinada por ensaio de MTT após 48 h de exposição.

5.3. AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA COMBINAÇÃO DA CISPLATINA E DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE

Após definir a EC_{50} dos compostos isolados e a proporção de 1:2 da combinação de CC1 e CDDP, denominada por MIX, foi realizado a mensuração do efeito citotóxico desta proporção, a partir da solução 10 vezes mais concentrada, através do ensaio colorimétrico MTT, na linhagem de adenocarcinoma mamário, MDA-MB 231 (Figura 6). Optou-se por prosseguir os testes com essa linhagem, pois esse tumor possui a de maior incidência mundial nas mulheres e com a maior taxa de mortalidade (INCA, 2019).

A EC_{50} (mg/L) do CC1 corresponde a $11,1 \pm 0,8$, equivalente a 6,7x e CDDP $24,2 \pm 1,0$ equivalente a 6,75x no gráfico (Figura 6), foram confirmadas neste ensaio e obteve-se a EC_{50} da associação correspondente a $15,8 \pm 0,2$ mg/L, sendo 4,9 mg/L de CC1 e 10,9 mg/L de CDDP, equivalente a 3x no gráfico.

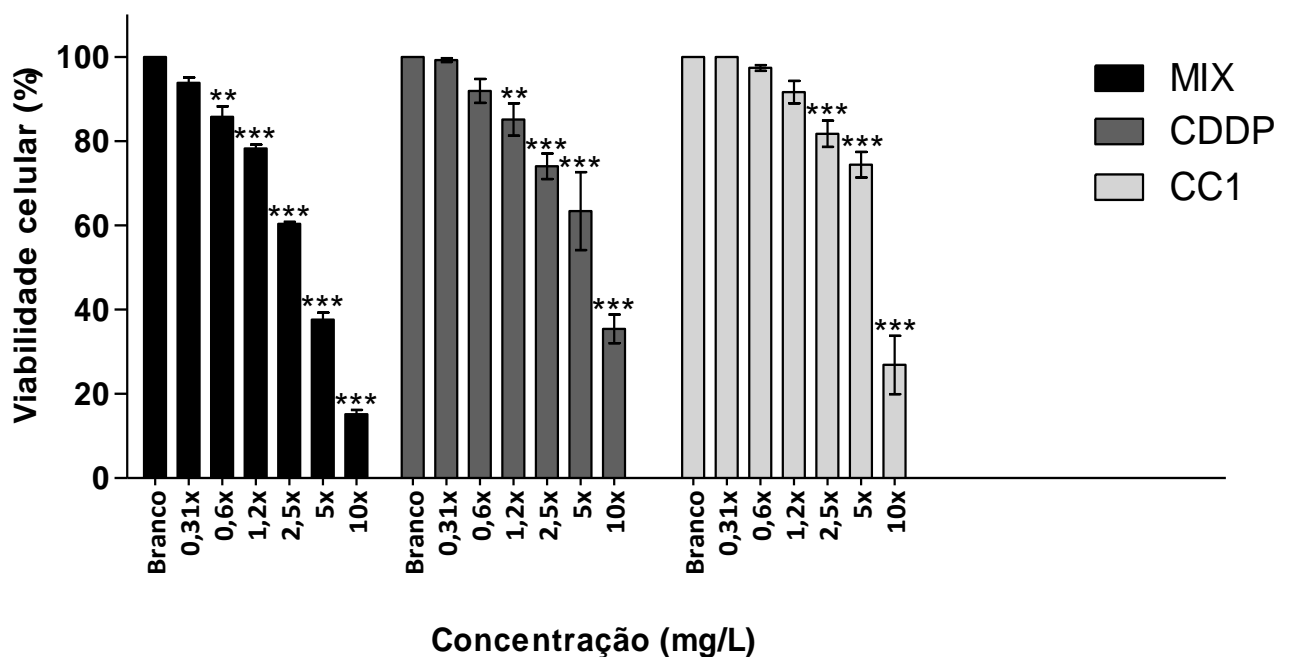


Figura 6: Efeito citotóxico dos compostos de coordenação de cobre (CC1), da cisplatina (CDDP) e da associação de ambos os compostos (MIX), frente às células MDA-MB-231 após tratamento por 48 h de incubação, pelo ensaio de MTT.

Os valores de EC_{50} (mg/L) demonstram que o CC1 e o tratamento combinado dos compostos foram significativamente ($P < 0,05$) mais ativos que o tratamento constituído apenas por CDDP (Figura 6). A associação destes compostos permitiu a redução de mais de 50% da EC_{50} da CDDP e do CC1, frente a linhagem MDA-MB231. A tabela 3 resume essa diferença do perfil citotóxico dos tratamentos.

Tabela 3. Valores de EC_{50} (mg/L) obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade celular por MTT frente a linhagem MDAMB-231.

Tratamentos	EC_{50} (mg/L)	r
Cobre α isolado	11,1	0.97
Cisplatina isolada	24,1	0.99
MIX	15,8	0.99
	(4,9 CC1 + 10,9 CDDP)	

As células tumorais foram tratadas por 48 h com o composto de coordenação de cobre isolado (CC1), Cisplatina isolada (CDDP) e a associação dos compostos (MIX). Os valores de EC_{50} (mg/L) foram calculados pelo *software CalcuSyn*.

A natureza da associação entre CC1 e CDDP (Tabela 3) foi analisada pelo método descrito por Chou e Talalay (1984), baseando-se na lei da ação das massas e no princípio do efeito-médio (CHO; TALALAY, 1984). Os efeitos resultantes das combinações foram expressos através do índice de combinação (CI), calculados através do *software CalcuSyn* (BIOSOFT, 2018). Os valores de CI (Tabela 4) indicaram que quatro das doses testadas são sinérgicas (1,63 mg/L; 3,25 mg/L; 26,2 mg/L; 52,4 mg/L) e a própria EC_{50} da associação apresenta sinergismo (15,8 mg/L) enquanto que apenas duas das doses testadas apresentam efeito aditivo (6,5 mg/L e 13,1 mg/L).

Tabela 4. Associação do composto de coordenação de cobre (CC1) e Cisplatina (CDDP) frente a linhagem MDA-MB-231.

Dose total (mg/L)	Descrição da dose (CC1 + CDDP mg/L)	Fa	Valor de CI
1,63 (0,31x)	0,51 + 1,12	6,21%	0,89
3,25 (0,62x)	1,0 + 2,25	14,23%	0,81
6,5 (1,25x)	2,0 + 4,5	21,76%	1,06
13,1 (2,5x)	4,1 + 9	39,63%	1,04
15,8* (3x)	4,9 + 10,9	50%	0,89
26,2 (5x)	8,2 + 18	62,32%	0,99
52,4 (10x)	16,4+ 36	84,83%	0,76

Os dados de dose e efeito foram obtidos a partir do ensaio MTT (valor médio da triplicata) que foram submetidos a análise CompuSyn. Fa significa inibição fracional, ou seja, o percentual de inibição do crescimento celular mediado pela dose administrada. Os valores de CI = 1, <1 e > 1 indicam efeito aditivo, sinergismo e antagonismo, respectivamente. *Não representa uma dose testada, mas o valor da EC₅₀ calculado a partir do software.

5.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS PBMC TRATADAS COM O COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE, CISPLATINA E MIX

Mediante ao sinergismo observado frente a linhagem de adenocarcinoma de mama (Tabela 4) e a redução da EC₅₀ dos tratamentos quando combinados (Tabela 2), mensurou-se o efeito citotóxico da proporção de 1:2 da combinação de CC1 e CDDP (MIX), CC1 isolado e CDDP isolada através da metabolização do MTT pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

O CC1 apresentou maior citotoxicidade quando comparado a CDDP, com a EC₅₀ correspondente a 12,1 ± 1,0 mg/L, enquanto que a CDDP apresentou a EC₅₀ 17,9 ± 1,0. Quando associados, obteve-se a EC₅₀ equivalente a 29,0 ± 1,0 mg/L, sendo 10,0 mg/L de CC1 e 19 mg/L de CDDP. Portanto, observou-se a semelhança de citotoxicidade dos tratamentos isolados e em associação, mas quando se analisa a citotoxicidade entre as linhagens foi possível observar que a EC₅₀ da associação para as PBMC é quase duas vezes mais concentrada que a EC₅₀ para MDA-MB231, com

valores de $29,0 \pm 1,0$ mg/L (10,0 mg/L CC1 e 19,0 mg/L CDDP) para PBMC e $15,8 \pm 0,2$ mg/L (4,9 mg/L CC1 e 10,9 mg/L CDDP) para MDA-MB231, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de EC_{50} (mg/L) obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade celular por MTT frente a MDA-MB231 e PBMC.

Tratamento	MDA-MB-231	PBMC
CC1	$11,1 \pm 0,8$	$12,1 \pm 1,0$
CDDP	$24,1 \pm 1,0$	$17,9 \pm 1,0$
MIX	$15,8 \pm 0,2$ (4,9 CC1 + 10,9 CDDP)	$29,0 \pm 1,0$ (10,0 CC1 + 19,0 CDDP)

As células tumorais e PBMC foram tratadas por 48 h com o composto de coordenação de cobre isolado (CC1), Cisplatina isolada (CDDP) e a associação dos compostos (MIX). Os valores de EC_{50} (mg/L) foram calculados pelo *software Graphpad Prism* versão 5.0, pelo método de regressão não linear.

5.5. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO

O ensaio Sub-G1 identifica a distribuição das células durante as fases do ciclo celular, a partir do conteúdo de DNA presente. Sendo assim, é possível distinguir as fases de crescimento G1/G2, síntese (S), mitose (M) e DNA fragmentado (sub-G1) (ADAN *et al.*, 2017).

Uma das características marcantes do processo de apoptose é a fragmentação do DNA em 200 pb ou múltiplos, resultantes da atividade de endonucleases, sendo este evento tardio (KAJSTURA *et al.*, 2007; NUNEZ, 2001). Portanto, as populações de células que se encontram na região Sub-G1 indicam a ocorrência de morte celular por apoptose.

A percentagem de células do controle na região de sub-G1 foi de apenas 3,9 %. O percentual de sub-G1 foi de 9,93 %, 9,41 % e 10,1 %, para CC1, CDDP e MIX, respectivamente após 12 h de incubação. O percentual de sub-G1 após a incubação por 24 h foi de 30,7 %, 5 % e 13,9 % para CC1, CDDP e MIX, respectivamente (Figura 7).

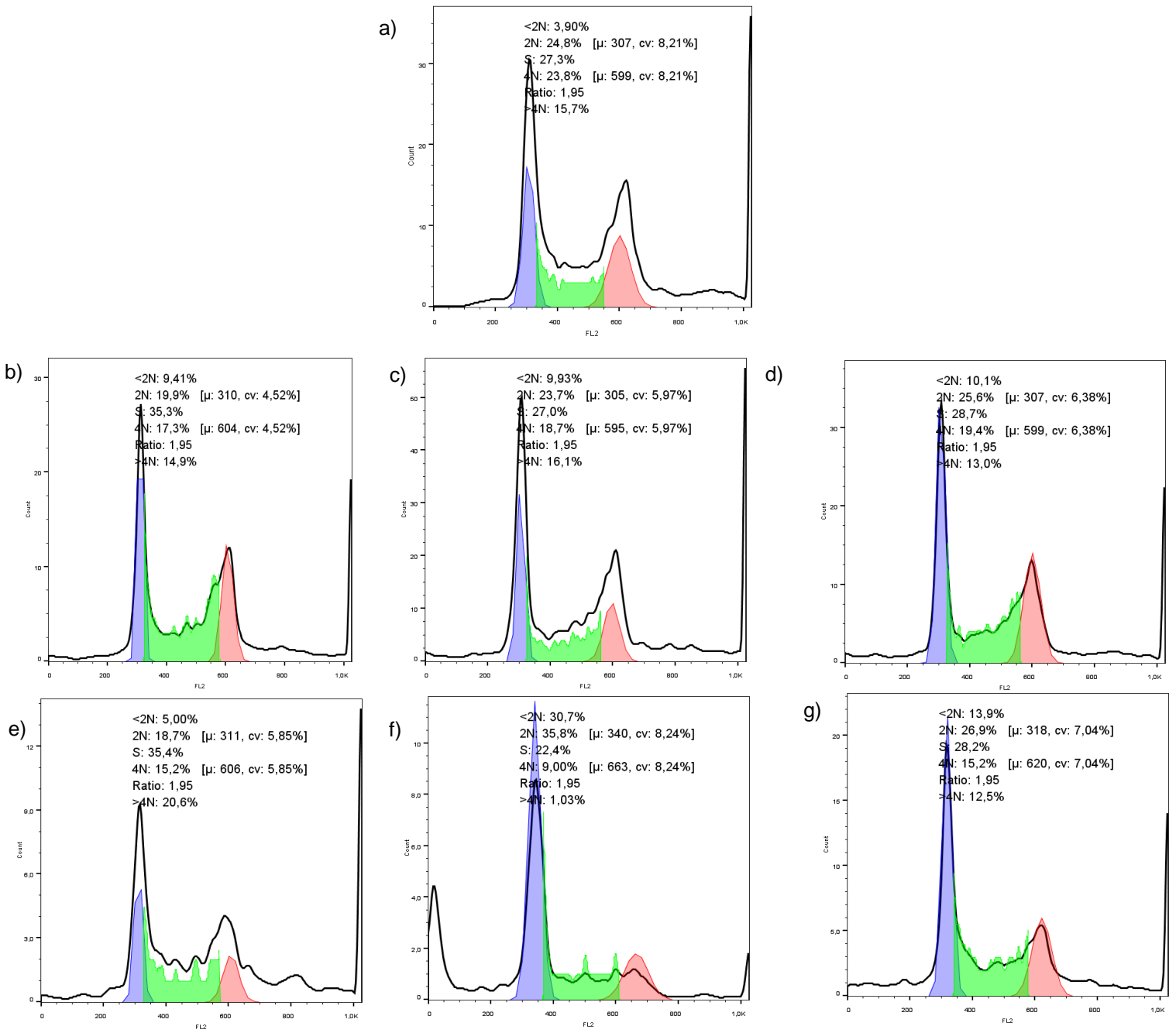


Figura 7: Histogramas referentes à análise do ciclo celular da linhagem MDA-MB 231, por citometria de fluxo, incubadas com (a) DMEM-F12 - Controle, (b) 48,4 mg/L de CDDP por 12 h, (c) 22,2 mg/L de CC1 por 12 h, (d) 31,6 mg/L (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L CDDP) de MIX por 12 h, (e) 48,4 mg/L de CDDP por 24h, (f) 22,2 mg/L de CC1 por 24 h, (g) 31,6 mg/L (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L) de MIX por 24 h.

5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (PPM) POR CITOMETRIA DE FLUXO

A via intrínseca do processo de morte celular por apoptose se inicia em resposta a estímulos internos que alteram a homeostase mitocondrial, que posteriormente, promove a ativação da caspase 9 (ELMORE, 2007).

Visando investigar se o CC1 e a associação atuam por esta via, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial das células MDA-MB231 após o tratamento por 12 h e 24 h com as concentrações finais de 22,2 mg/L do CC1, 48,4 mg/L da CDDP e 31,6 mg/L da MIX (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L).

A perda do potencial mitocondrial foi observada após 24 h de incubação para as células tratadas com CC1 e MIX. O percentual de mitocôndrias viáveis indicadas por Q_2 decaiu no tempo de 24 h para ambos os tratamentos e o percentual de Q_3 aumenta para 27,9 % e 22,5 % para CC1 e MIX, respectivamente. Esses resultados indicaram a perda de potencial mitocondrial, sugerindo que a via intrínseca se inicie neste período para estes tratamentos (Figura 8).

Já as células tratadas com a CDDP apresentaram a perda do potencial da membrana mitocondrial a partir de 12 h, com percentual de Q_3 igual a 12,3% e 42,3% no tempo de 12 h e 24 h, respectivamente (Figura 8).

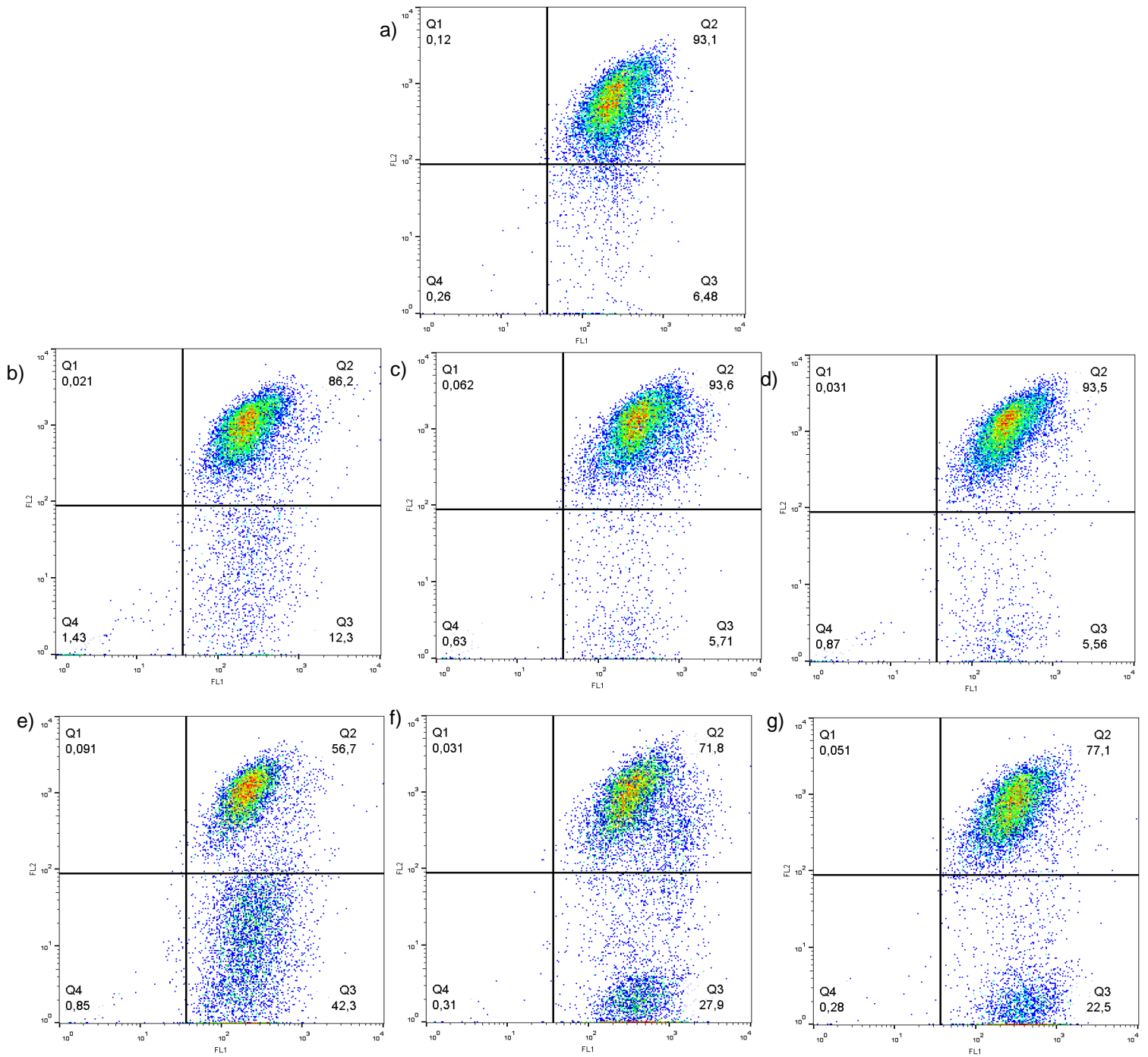


Figura 8: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial na linhagem MDA-MB231, por citometria de fluxo, incubadas com (a) DMEM-F12 - Controle, (b) 48,4 mg/L de CDDP por 12 h, (c) 22,2 mg/L de CC1 por 12 h, (d) 31,6 mg/L (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L CDDP) de MIX por 12 h, (e) 48,4 mg/L de CDDP por 24h, (f) 22,2 mg/L de CC1 por 24h, (g) 31,6 mg/L (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L) de MIX por 24 h. O quadrante “Q₂” representa células com mitocôndrias com potencial de membrana normal.

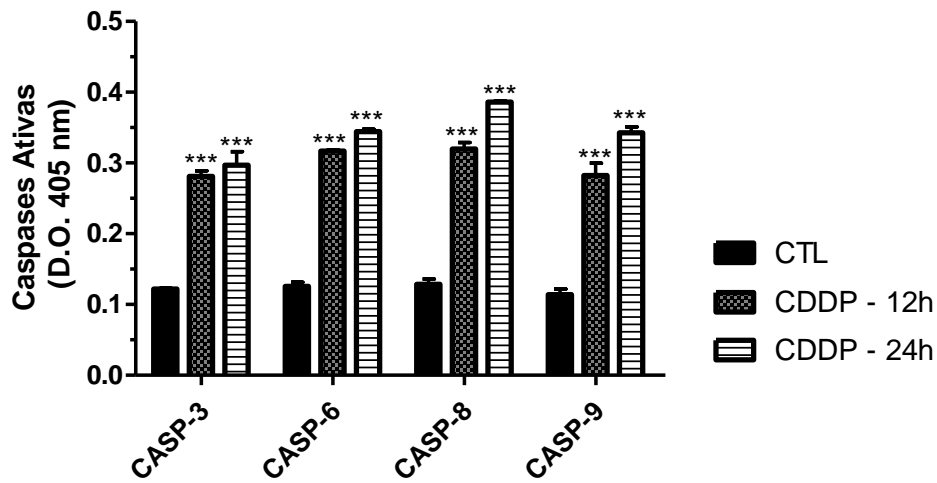
5.7. ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DE CASPASES INICIADORAS E EXECUTORAS PELO COMPOSTO DE COBRE, CISPLATINA E MIX

Após confirmação da atuação sinérgica do MIX e dos indícios da indução de morte celular por apoptose indicados pelos ensaios de citometria Sub-G1 e JC1, a atividade das caspases iniciadoras 8 e 9 e executoras 3 e 6, foram verificadas, pois a ativação desta cascata enzimática é um evento inicial e característico da morte celular programada do tipo apoptose (PEIXOTO *et al.*, 2017).

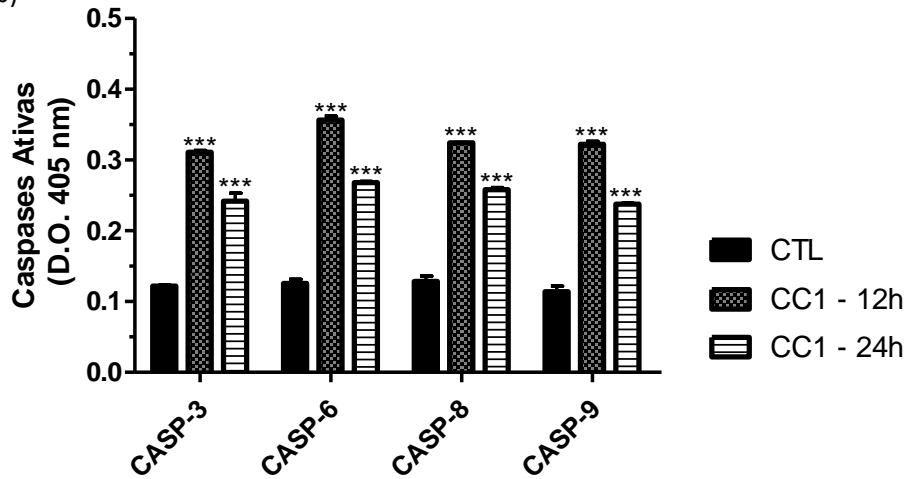
As análises foram realizadas após a incubação da linhagem por 12 h e 24 h com as concentrações finais de 22,2 mg/L do CC1, 48,4 mg/L da CDDP e 31,6 mg/L da MIX (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L).

Os valores obtidos indicaram a ativação das caspases iniciadoras e executoras, pois ocorreu um acréscimo estatisticamente significativo da atividade das caspases em relação ao controle negativo (Figura 9).

a)



b)



c)

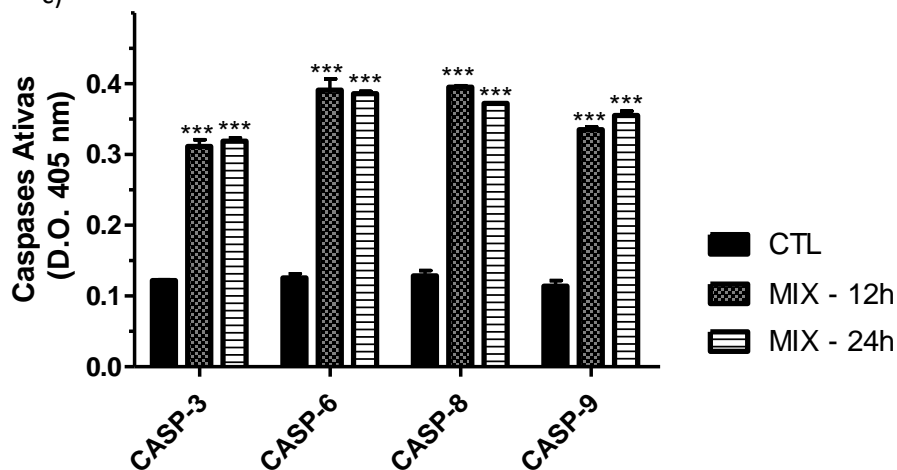


Figura 9: Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 em células MDA-MB231 após incubação com (a) Cisplatina (48,4 mg/L de CDDP), por 12 e 24 h, (b) Composto de coordenação de cobre (22,2 mg/L de CC1) e (c) Associação de Cisplatina e do composto de cobre – MIX (9,8 mg/L CC1 + 21,8 mg/L CDDP). A atividade das caspases foi avaliada utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ valores estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento.

5.8. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A perda do potencial mitocondrial observada através do ensaio de JC-1, a fragmentação do DNA avaliada pela análise do ciclo celular e ativação de caspases assinalada por teste colorimétrico indicaram que o processo de morte celular por apoptose nos diferentes tratamentos. Objetivando visualizar esse processo foram realizadas observações por microscopia de fluorescência com a utilização de marcadores para o núcleo (*Hoechst33342*®) e mitocôndrias (*MitoTracker*®). Sendo, o *Hoechst* um corante que se liga a ácidos nucléico corando o núcleo de azul e o *MitoTracker* um indicador de viabilidade mitocondrial, uma vez que, esse se acumula em mitocôndrias ativas, corando-as de vermelho (MIYAKE; MCDERMOTT; GRAMOLINI, 2011)

As células foram tratadas por 24 h, com a concentração final 22,2 mg/L de CC1, 48,4 mg/L de CDDP e 31,6 mg/L de MIX (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L).

Nas amostras de células controle (Figura 10 a) foi possível observar o núcleo em azul ocupando grande parte do volume celular, a predominância mitocondrial indicada pela marcação vermelha e a morfologia em forma de fuso, que é característica da linhagem MDA-MB231 em crescimento duas dimensões (IVERS *et al.*, 2014).

Nas amostras incubadas por 24 horas foi possível observar a perda da morfologia celular em resposta aos diferentes tratamentos, a dispersão da fluorescência mitocondrial, sugerindo a diminuição do potencial mitocondrial e a marcação do núcleo indicada em azul evidenciou o deslocamento do mesmo para a periferia da célula e sua fragmentação (10 b, c e d).

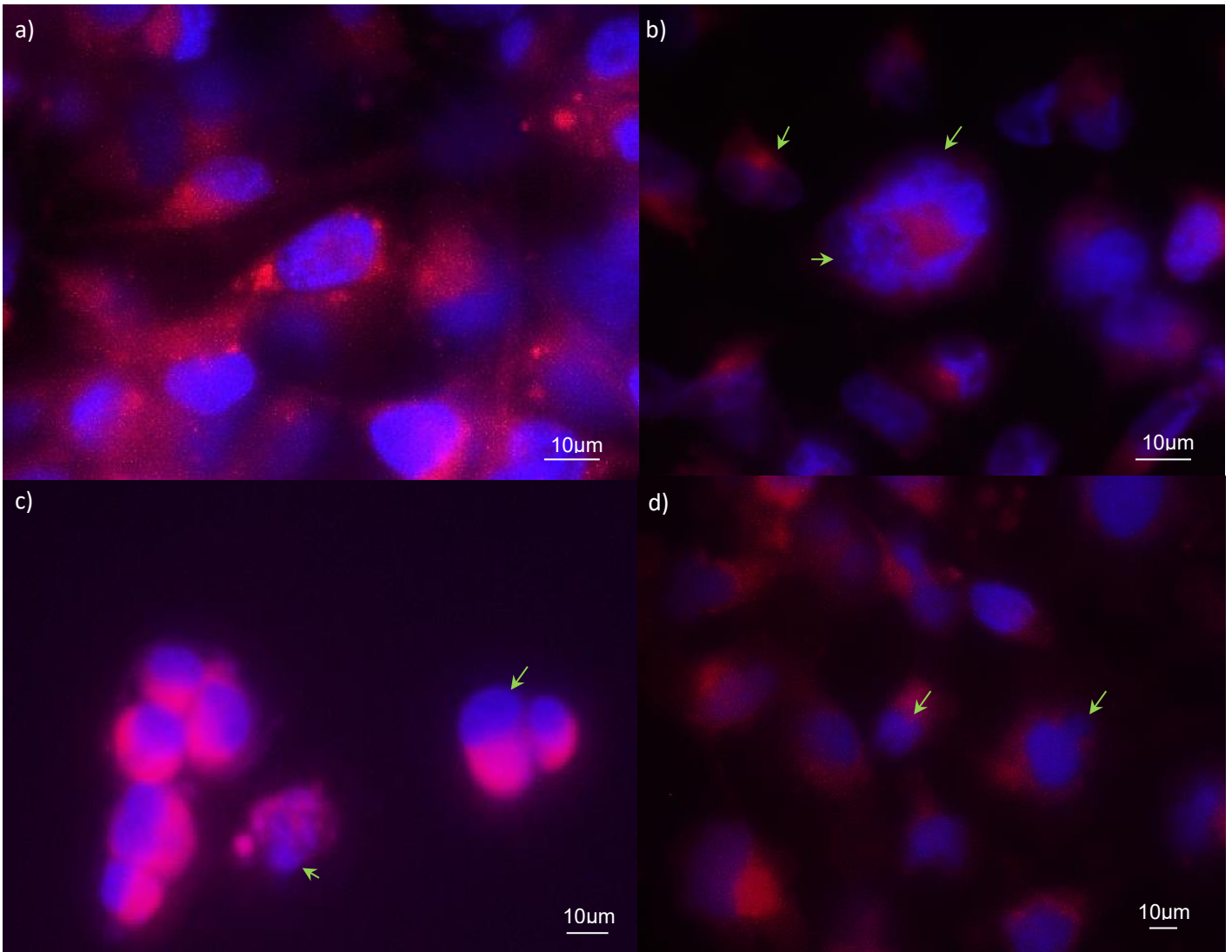


Figura 10: Linhagem MDA-MB-231 após 24 horas de incubação, (a) controle, (b) tratadas com CDDP concentração de 48,4 mg/L, (c) 22,2 mg/L de CC1 e (d) 31,6 mg/L de MIX (9,8 mg/L de CC1 + 21,8 mg/L). As setas em verde indicam as alterações na morfologia do núcleo evidenciando a fragmentação ou o deslocamento do mesmo para a periferia da célula. Barras de escala: 10 µm. As setas indicam o deslocamento do núcleo para periferia.

5.9. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os efeitos citotóxicos e alterações morfológicas e ultraestruturais das células MDA-MB231 foram avaliadas pelas modificações da membrana celular por microscopia eletrônica de varredura. As células do grupo controle apresentam morfologia regular com formato arredondado, granulosidade homogênea, zonas de adesão moderada entre as células, sem presença de *blebs* evidentes, com poucas vilosidades na superfície celular (Figura 11 a).

As células tratadas com cisplatina apresentam granulosidade semelhante ao controle, no tempo de 6 horas, porém algumas células apresentam intenso *blebbing*, indicado por asterisco, e depressões na superfície, passam a constituir agregados, formando uma espécie de nicho tumoral (Fig. 11 b, c). Após 12 horas de incubação observa-se a alteração na granulosidade, com o aparecimento de filamentos, indicados por setas, e depressões na superfície celular. Além dessas alterações, verifica-se *blebs* maiores na superfície celular e desagregados (Fig. 11 d, e).

Já as células tratadas com CC1 não apresentam alterações na granulosidade, sendo semelhante ao controle, em ambos os tempos de incubação. Entretanto, observam-se depressões na superfície celular e a formação de agregados celulares mais intensos neste tratamento, sendo evidente a formação de grumos celulares. Além desses aspectos verifica-se a presença de *blebs* na superfície de algumas células, indicados por asterisco, após 12 h de tratamento (Fig. 11 f, g, h, i).

O MIX também parece alterar propriedades físicas das membranas, pois são observadas depressões na superfície celular, maior granulosidade e *blebbing* intenso em algumas células (Fig. 11 j, k). Já em células incubadas por 12 horas, verificou-se a liberação de um grande número de vesículas no meio, caracterizada por apresentar menor tamanho, e pouca granulosidade e filamento (indicado por estrelas), com depressões na superficiais, sem a formação de agregados como no tratamento com CC1 isolado (Fig. 11 l, m).

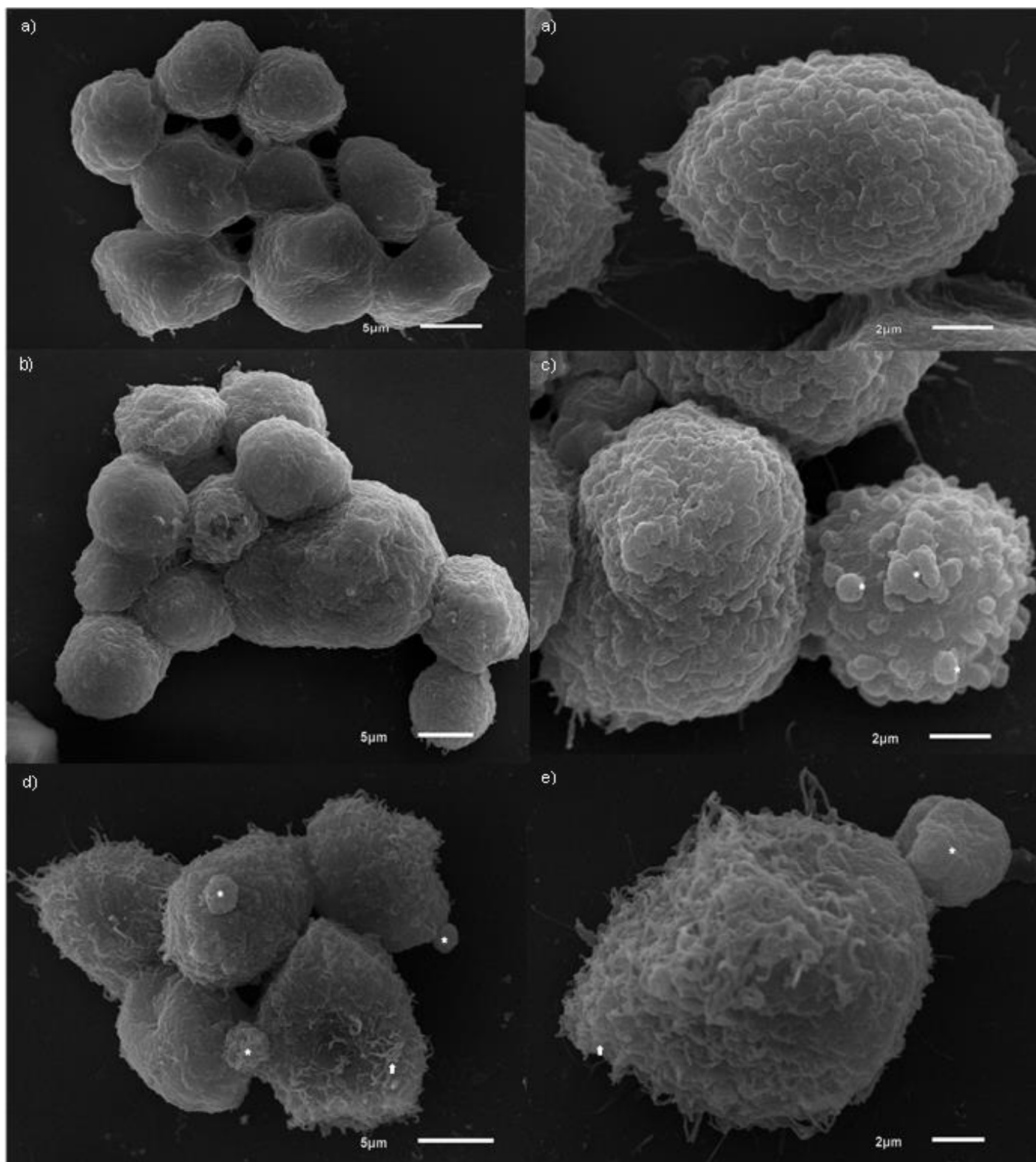


Figura 11: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; tratadas com CDDP concentração de 24,2 mg/L (b) e (c) por 6 horas, (d) e (e) 12 horas. Asterisco indicam a formação de *blebbing* de membrana e setas indicam alterações na granulose. Continua p.58.

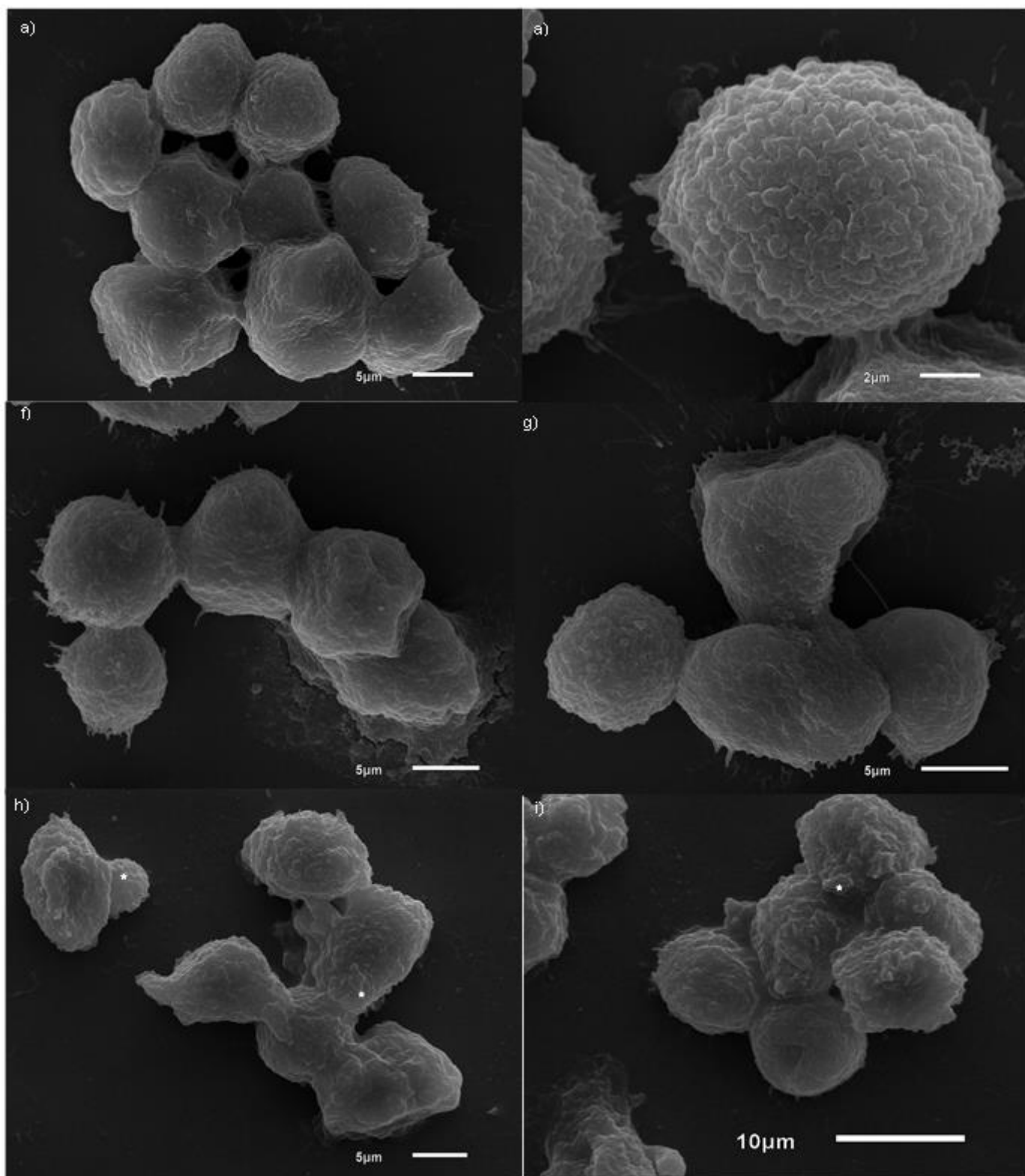


Figura 11: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; tratadas com CC1 concentração de 11,1 mg/L (f) e (g) por 6 horas, (h) e (i) 12 horas. Asterisco indicam a formação de *blebbing* de membrana. Continua p. 59.

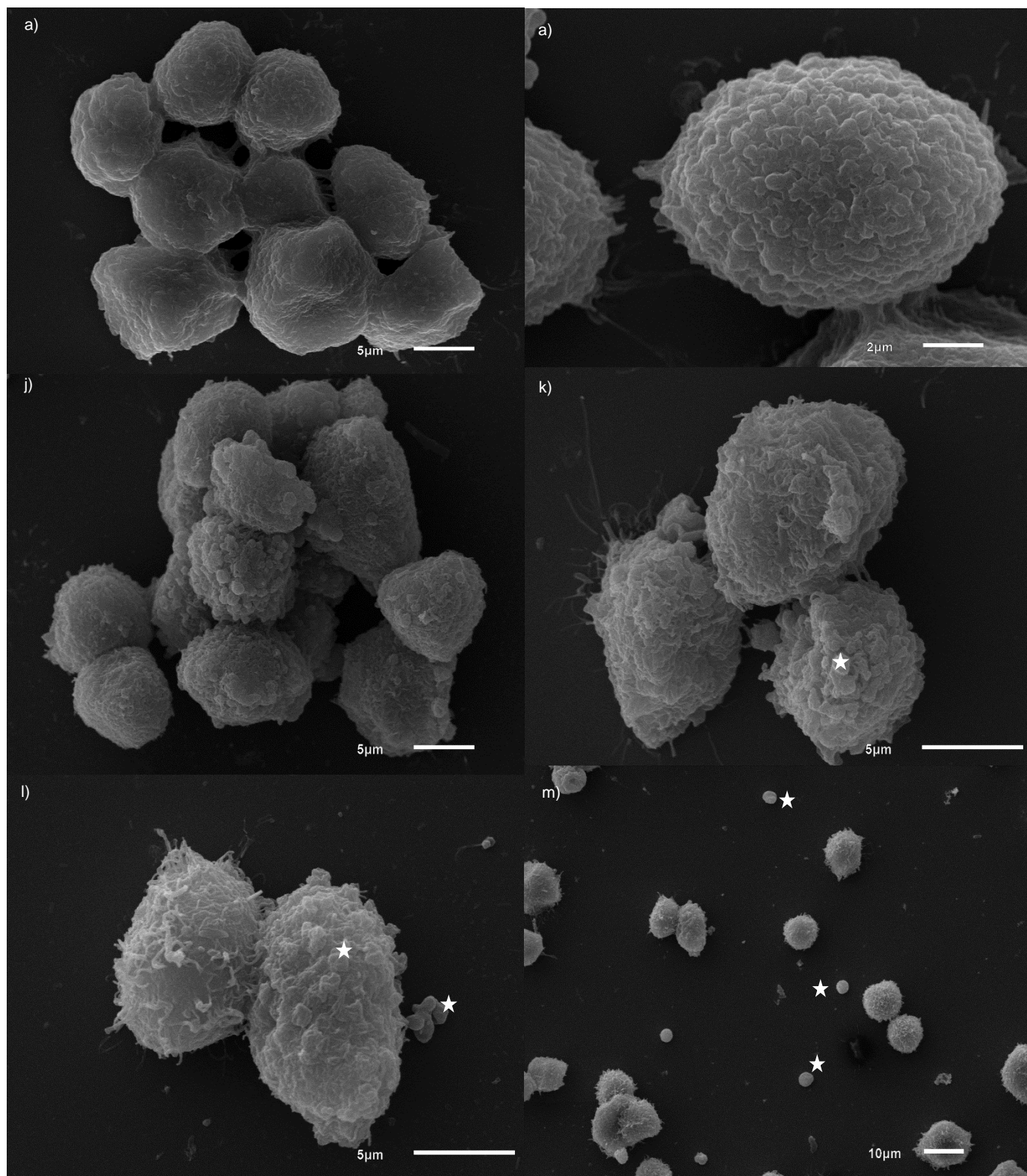


Figura 11: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; tratadas com MIX concentração de 4,9 mg/L CC1 e 10,8 mg/L de CDDP (j) e (k) por 6 horas, (l) e (m) 12 horas. Asterisco indicam a formação de *blebbing* de membrana e setas indicam alterações na granulose.

5.10. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As alterações ultraestruturais das células MDA-MB231 foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. As células do grupo controle apresentam morfologia regular, com granulosidade semelhante ao observado anteriormente por microscopia eletrônica de varredura. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático estão distribuídos de forma homogênea no citoplasma celular, com morfologia normal (Fig. 12 a).

As células tratadas com cisplatina apresentam morfologia semelhante ao controle, no tempo de 6 horas, porém algumas células apresentam invaginações e inicia-se o processo de alargamento de organelas (Fig. 12 b, c). Após 12 horas de incubação observa-se o alargamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático, que se tornam mais eletrodensos e há aparentemente a associação dessas organelas (Fig. 12 d, e).

Já as células tratadas com CC1, por 6 horas, apresentam mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo alterados, com a formação inicial de uma rede de retículo. Essa rede reticular se torna intensa, após 12 h de tratamento, observa-se a cromatina espalhada no núcleo, vaculização intensa e a presença de células em grumo semelhante ao observado em microscopia eletrônica de varredura (Fig. 12 f, g, h, i).

O MIX também parece alterar a morfologia das organelas, após 6 horas de tratamento, observa-se mitocôndrias e retículo endoplasmático alterados e mais eletrodensos, vaculização inicial do citoplasma e do núcleo (Fig. 12 j, k). Já em células incubadas por 12 horas, verificou-se a presença de vacúolos contendo membranas internas, sugerindo que as mitocôndrias ou retículo endoplasmático estejam se alargando, observa-se uma possível associação entre mitocôndrias e retículo e maior eletrodensidade dessas organelas (Fig. 12 l, m).

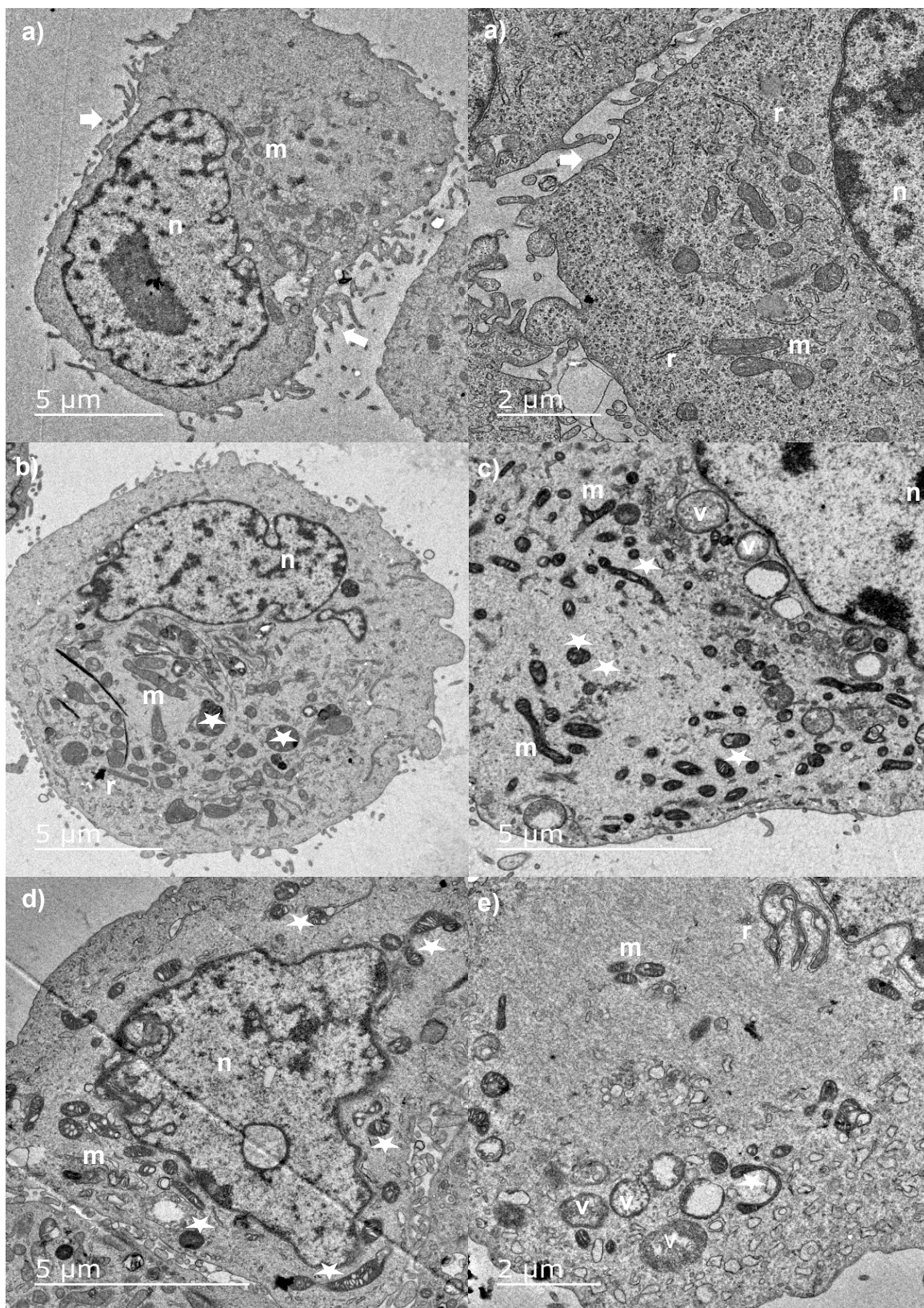


Figura 12: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle, (b) e (c) tratadas com CDDP concentração de 24,2 mg/L, por 6 horas, (d) e (e) 12 horas. Presença de várias organelas eletrodensas nas células tratadas (estrela); Nota-se a morfologia alterada de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e (v) vesícula, em células tratadas, no citoplasma da célula. Presença de várias microvilosidades (setas) na periferia da célula e o (n) núcleo.

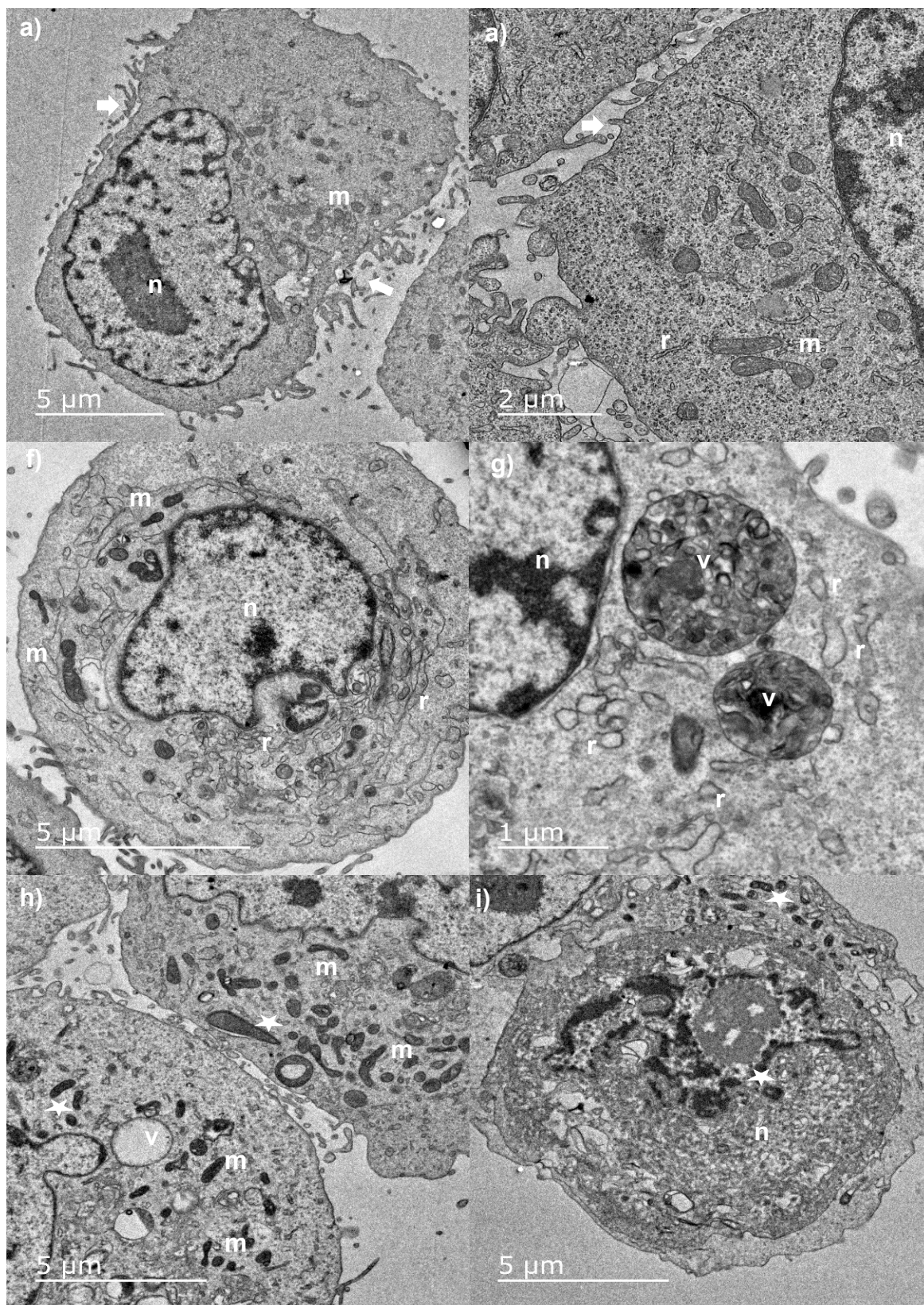


Figura 12: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; (f) e (g) tratadas com CC1, concentração de 11,1 mg/L, por 6 horas, (h) e (i) 12 horas. Presença de várias organelas eletrodensas nas células tratadas (estrela); Nota-se a morfologia alterada de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e (v) vesícula, em células tratadas, no citoplasma da célula. Presença de várias microvilosidades (setas) na periferia da célula e o (n) núcleo.

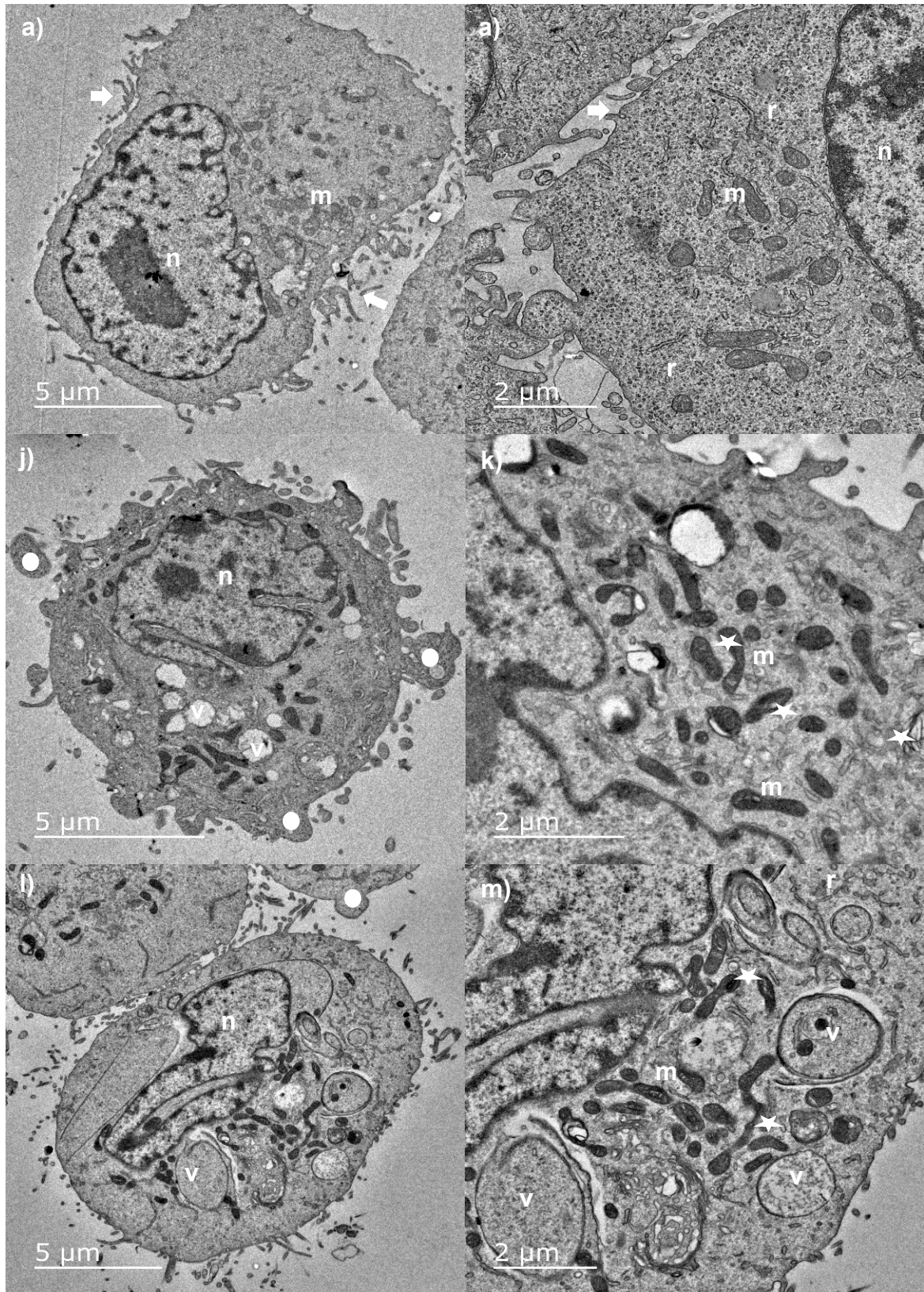


Figura 12: Linhagem MDA-MB-231, (a) controle; (j) e (k) tratadas com MIX concentração de 4,9 mg/L CC1 e 10,8 mg/L de CDDP, por 6 horas, (l) e (m) 12 horas. Nota-se a morfologia alterada de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e (v) vesícula, em células tratadas, no citoplasma da célula. Presença de várias microvilosidades (setas) na periferia da célula, corpos apoptóticos (círculos) e o (n) núcleo.

5.11. INTERAÇÕES QUÍMICAS

A possibilidade de interação entre o CC1 e a CDDP, resultando em novas estruturas, foi verificada por meio da análise dos valores do espectro de CC1 isolado e em associação com a CDDP.

A análise da combinação do CC1 e da CDDP foi realizada após três dias de reação, pois inicialmente foi observada a suspensão da CDDP na solução. Após a homogeneização foi possível verificar que a solução apresentou mudança de coloração, tornando-se mais azul.

O deslocamento de aproximadamente 100 nm entre os compostos indica que há interação entre a CDDP e o CC1 (Figura 12), o que sugere a formação de novas estruturas.

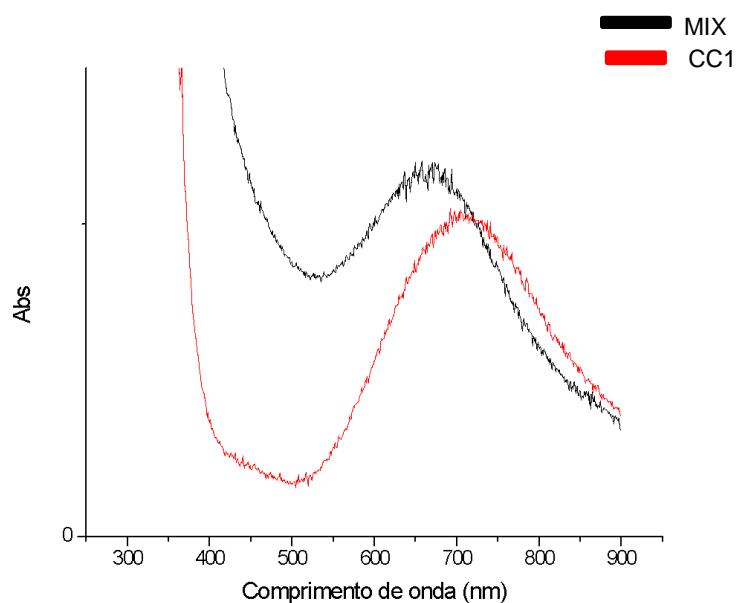


Figura 12: Interação entre a cisplatina (CDDP) e o composto de cobre (CC1), por espectro eletrônico obtido a partir da solução etanol/água (50:50), após a reação entre CDDP (10 mg) e o CC1 (18 mg).

6. DISCUSSÃO

O cobre (Cu^{2+}) é um dos elementos traço de grande importância para o funcionamento celular, pois atua como cofator para muitas enzimas, participando assim de diferentes vias metabólicas (BHATTACHARJE *et al.*, 2017). Além de atuar na homeostase celular, relata-se o aumento do influxo do referido íon atua no desenvolvimento e progressão do câncer (BRADY *et al.*, 2014; BHATTACHARJE *et al.*, 2017). Tendo em voga a dualidade funcional do íon, ao conferir em um primeiro momento certa seletividade e o seu papel na homeostase do tumor, neste trabalho foram avaliados os efeitos citotóxicos do composto de coordenação de cobre $[(\text{H}_2\text{L}_2)\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (CC1), da cisplatina (CDDP) e a associação dos mesmos (MIX).

O CC1 apresentou efeito citotóxico frente a diferentes linhagens tumorais, MDA-MB231, BXP3, PC3, H460 e A549. Sendo observado uma significativa diferença entre as EC_{50} da CC1 e CDDP de 120%, 40% e 30% nas linhagens MDA-MB231, PC-3 e A549, respectivamente (Tabela 1). Quando os compostos foram associados na curva de dose-resposta observou-se a redução da dose administrada e a proporção de MIX frente a essas linhagens para aproximadamente 1:2 (CC1: CDDP) (Fig.5 e tabela 2).

A atuação citotóxica do CC1 já foi demonstrada por Fernandes e colaboradores (2015) ao analisar a ação antineoplásica de quatro compostos de cobre, dentre esses houve destaque para o CC1, por sua atividade frente às linhagens leucêmicas THP-1 e U-937. Além dessas linhagens, Borges (2013) relatou a atuação do composto em duas linhagens de melanoma SKMEL-5 e B16F10. Posteriormente, Maciel (2016) analisou as alterações morfofuncionais de células de câncer de pulmão ocasionadas em resposta ao tratamento. O efeito antineoplásico do CC1 também foi observado *in vivo*, tendo o composto apresentado baixa toxicidade, ocasionando uma pequena redução da massa corporal dos animais (FERNANDES, *et al.*, 2014).

Devido à relevância do câncer de mama e a diferença de sensibilidade aos tratamentos, optou-se por realizar testes quantitativos e qualitativos para investigar os mecanismos de atuação dos compostos de forma isolada e em associação com a linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB231. Essa linhagem apresentou a

EC₅₀ de CC1 igual a $11,1 \pm 0,8$ mg/L e CDDP $24,2 \pm 1,0$ mg/L, o que demonstra a necessidade de uma dose aproximadamente 2,2 vezes maior da CDDP para induzir citotoxicidade em 50% das células tratadas. Quando associados, foi detectada a redução de mais de 50% das doses requeridas para determinar EC₅₀ de CC1 e CDDP, respectivamente, sendo a EC₅₀ de MIX correspondente a $15,8 \pm 0,2$ mg/L (CC1 4,9 mg/L e CDDP 10,9 mg/L). Além da redução da dose administrada, observa-se o sinergismo de MIX, apresentando o valor de CI correspondente a 0,89.

Essa atuação sinérgica relatada entre compostos de cobre e derivados de platina já foi observada frente à linhagem de câncer de mama T47D (GEROMICHALOS *et al.*, 2005), leucêmica CCRF-CEM e de carcinoma de ovário humano A2780 e em sub-linhagens resistentes desta natureza (PIVETTA *et al.*, 2015) e colo uterino HELA (DAVILA-MANZANILLA *et al.*, 2017).

O sinergismo relatado mostra-se como promissor, uma vez que a sinergia entre fármacos é uma estratégia eficaz no tratamento de doenças, pois resulta na redução de doses administradas, no aumento da eficácia farmacológica e na redução ou retardo dos mecanismos de resistência e de efeitos colaterais (JIA *et al.*, 2009; CHOU, 2006). No entanto, a gênese desse perfil farmacológico pode ser algumas vezes controversa, uma vez que esse efeito pode ser resultante da atuação complementar dos fármacos, atuando assim sobre um único ou um conjunto de alvos ou pela potencialização de uma droga em função da outra (PEMOVSKA *et al.*, 2018). Além destes aspectos, o aumento da eficiência terapêutica também pode ser observado pela atuação independente das drogas devido à heterogenia das neoplasias (PALMER; SORGER, 2017).

Outra dúvida que permeia os estudos da associação de fármacos, é a possível interação entre os compostos resultando em novas estruturas. Dessa forma, avaliamos a interação química entre o CC1 e a CDDP, sendo observado que há interação, o que pode indicar a formação de novas estruturas (Fig. 12), que podem apresentar maior atividade farmacológica e menor custo de produção.

Além dessa interação entre os compostos, foi verificado o mecanismo de morte celular deflagrado em resposta aos tratamentos isolados e em associação para a compreensão do mesmo e posteriormente, estruturar um protocolo mais coeso, econômico e seguro para o trabalho *in vivo*.

O mecanismo de atuação da CDDP é controverso, porém resulta na morte celular apoptótica (NEMATBAKHS *et al.*, 2017; DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Estudos anteriores observaram que o CC1 também desencadeia morte celular por apoptose em diferentes linhagens (MACIEL, 2016; NADAI, 2016; FERNANDES *et al.*, 2015; BORGES, 2013). Por isso, analisou-se a distribuição das células nas fases do ciclo celular com base na marcação do DNA, uma vez que, a fragmentação do DNA é um evento característico do processo de morte celular por apoptose devido a atuação de endonucleases nos estágios finais do processo (KAJSTURA *et al.*, 2007; NUNEZ, 2001).

Os resultados de citometria indicaram que a fragmentação do DNA inicia-se após 12 h de incubação, sendo os valores 3,9 %, 9,93 %, 9,41 % e 10,1 %, de sub-G1 correspondentes ao controle, CC1, CDDP e MIX, respectivamente (Fig. 7). Após 24 h de incubação, o CC1 promoveu o deslocamento da população de células neoplásicas para a fase sub-G1 do ciclo, correspondendo a 30,7 %. Essa fragmentação do DNA assemelha-se aos dados obtidos por Fernandes e colaboradores (2015) e Maciel (2016) ao analisarem as alterações do ciclo celular ocasionadas por esse composto em linhagens de leucêmicas U937 e THP-1 e de pulmão H460, respectivamente.

Embora tenha sido observado o deslocamento da população de células neoplásicas tratadas com CDDP e MIX para a fase sub-G1 do ciclo, após 12 h de incubação, não foi possível a obtenção de um percentual de células viáveis para análise após 24 h de incubação.

Além da fragmentação do DNA, a perda do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspases são marcadores fundamentais para o estudo da apoptose. A via extrínseca da ativação de caspases envolve a transdução de sinais através de receptores de morte celular, resultando na ativação de caspase 8, que por sua vez ativa caspases efetoras como a caspase 3 e caspase 7. Já a via intrínseca envolve a perda do potencial de membrana (PMM) como ponto chave para deflagrar o processo de apoptose, pois resulta na liberação do citocromo c, que forma um complexo com Apaf-1. Sendo este complexo responsável por recrutar a procaspase-9 e ativa-la, para que essa ative subsequentemente as caspases efetoras 3, 6 e 7 (PEIXOTO *et al.*, 2017).

A perda do PMM foi observada após 24 h de incubação para as células tratadas com CC1 e MIX, com o aumento de percentual "Q3" para 27,9 % e 22,5 %, respectivamente.

respectivamente. Já as células tratadas com CDDP observa-se a perda PMM a partir de 12 h, apresentando o percentual 12,3 % e 42,3 % no tempo de 12 h e 24 h, respectivamente (Fig. 8). Essa redução do PMM também foi observada na linhagem H460, sendo essa perda equivalente a 50,2 % para as células tratadas com CDDP, no tempo de 24 h. Embora, essa redução seja semelhante para o tratamento com CDDP, há diferença no percentual da redução do PMM em células tratados com CC1 (MACIEL, 2016; FERNANDES *et al.*, 2015). Estes dados indicam que o CC1 e MIX podem atuar por um mecanismo de ação distinto da CDDP nesta linhagem.

Embora tenha sido observado neste trabalho a redução do PMM para os tratamentos o CC1 e MIX a partir de 24 h, no tempo de 12 h já relata-se a ativação da caspase 9 para esses tratamentos, indicando que esse evento ocorreu em resposta independente da liberação de citocromo c. Há duas vias alternativas para a ativação da caspase 9 no citosol: (i) a hidrólise pela caspase 12 ou 4, que são residentes do retículo endoplasmático (ER), e subseqüentemente ativação da caspase 3 (RAO *et al.*, 2002; BORTOLOZZI *et al.*, 2014); (ii) em resposta a caspase 8 (MCDONNELL *et al.*, 2003; 2008).

Para analisar via alternativa da hidrólise da pro-caspase 9, Rao e colaboradores (2002) usaram como modelo de estudo fibroblastos murinos *knockout* para Apaf-1^{-/-} conhecidas pela relativa resistência a determinados estímulos pro-apoptóticos da via intrínseca. No entanto, neste estudo foi observado a susceptibilidade da linhagem a apoptose induzida por fármacos como a taspigargina e a brefeldina-A, que atuam através de estresse do ER com a ativação da caspase 12, 9 e 3. Observou-se que essa via foi inibida por mutantes catalíticos das caspase 12 e 9 ou por inibidores das mesmas, porém não foi inativada por inibidores da caspase 8, sugerindo a independência da via extrínseca. Também não foi observada a presença de citocromo c no citoplasma de células tratadas com taspigargina ou brefeldina, sugerindo que a ativação de caspase 9 aconteça de forma independente de Apaf-1 e citocromo c.

Bortolozzi e colaboradores (2014) relataram que o complexo de cobre (I) (thp)₄[PF₆] testado em linhagens leucêmicas aumentou levemente a PMM, sem a liberação de citocromo c, o que sugere o não envolvimento da via mitocondrial ou, pelo menos, não apresenta papel relevante na atuação do composto. Os autores também avaliaram a ativação de caspases, inclusive a caspase 12, confirmando a via alternativa da morte celular por apoptose.

Ao analisar as alterações ultraestruturais do tratamento observa-se, a partir 6 horas de incubação com MIX, dilatações do retículo endoplasmático e de mitocôndrias proeminente e intensa vaculização do citoplasma (Fig. 12 k, l, m, n). Essas alterações se intensificam a partir 12 h de incubação com o CC1 e a CDDP (Fig. 12 d, f, i, j), sugerindo que as células possam estar sofrendo estresse reticular e esse compor parte do mecanismo de atuação dos tratamentos, sendo esse evidenciado inicialmente na associação dos compostos.

As dilatações no retículo endoplasmático também foram observadas por Maciel (2016), em linhagem H460 tratada com CC1, em análises de microscopia eletrônica de transmissão, e posteriormente, a ativação da caspase 12, indicando o estresse reticular como parte do mecanismo de atuação de CC1.

A outra via alternativa para ativação da caspase 9 é sua hidrólise em resposta à caspase 8. Sendo assim, a caspase 9 atua no primeiro momento como efetora, sendo substrato para a caspase 8 logo após a estimulação apoptótica, portanto, uma tática para ampliação do sinal de deflagração da apoptose. Além desse papel, a caspase 8 cliva a proteína Bcl-2-Bid, fazendo *crossstalk* entre via extrínseca e intrínseca e cliva a pro-caspase 3, ampliando o sinal da apoptose por via intrínseca (MCDONNELL *et al.*, 2003; 2008).

Os dados obtidos sugerem que a morte celular por apoptose em células tratadas com CC1 e MIX aconteça no primeiro momento pela via extrínseca com a ativação da caspase 8, 6 e 3, como visto por Fernandes e colaboradores (2015). Essa obliteração de células cancerosas pela via extrínseca é amplamente explorada, pois um dos fatores de resistência da cisplatina está associado à absorção de fármaco (XU *et al.*, 2019). Desta forma, esse mecanismo de ação é um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.

A ativação da caspase 9 sem a perda do PMM, no primeiro momento sugere que o processo de morte celular pode estar correlacionado com estresse reticular com a ativação da caspase 9 por caspases residentes do RE, como visto por Maciel (2016), Bortolozzi e colaboradores (2014), Rao e colaboradores (2002) e indicado por dilatações do RE observados em microscopia eletrônica de transmissão. Alternativamente ou atuando concomitante com esse evento, a caspase 8 pode ampliar o sinal de morte celular ativando a caspase 9 (MCDONNELL *et al.*, 2003; 2008

(2002). Desta forma, serão necessários mais testes para elucidar o mecanismo alternativo responsável pela ativação da caspase 9.

Apesar da dissimilaridade entre as vias que disparam a apoptose, as alterações morfológicas resultantes são similares, sendo documentada a formação de *blebbing* de membrana e corpos apoptóticos, a redução do volume celular, a fragmentação nuclear, a condensação e fragmentação de DNA (XU *et al.*, 2019).

As alterações morfológicas observadas neste trabalho corroboram a hipótese que as células tratadas por MIX, CC1 e CDDP estejam sofrendo apoptose. Essas alterações são evidenciadas pela presença de *blebbing* na membrana das células tratadas por 12 h e 24 h com MIX ou CDDP, 24 h para CC1. A formação de *blebbing* da membrana é regulado por muitas proteínas quinases, em particular as proteínas quinase 1 associada a Rho (ROCK 1). Durante a apoptose, a caspase 3 cliva ROCK 1 e dispara a ativação da quinase por liberar seu domínio autoinibitório C-terminal. Por sua vez, ROCK 1 ativada fosforila a cadeia leve da miosina II e promove a contração da actomiosina formando *blebbing* da membrana (ATKIN-SMITH; POON, 2017).

Além da observação de *blebbing*, por microscopia de varredura, foi observada a diminuição do volume citoplasmático e a migração do núcleo para periferia celular e sua fragmentação, por microscopia de fluorescência, indicando a ocorrência do processo de morte por apoptose em células tratadas com CDDP, CC1 e MIX, incubadas por 24 h (Fig.10).

Estudos anteriores analisando o efeito do CC1 frente às linhagens THP-1, U-937 e H460, também relataram o processo apoptótico em células tratadas, indicando a presença de *blebbing* de membrana, corpos apoptóticos, diminuição do volume citoplasmático e nuclear das células, migração do núcleo para periferia celular e sua fragmentação e condensação de DNA (FERNANDES *et al.*, 2015; MACIEL, 2016).

Apesar de não ser um indicativo de morte celular, as modificações da granulosidade da superfície celular são importantes parâmetros de avaliação, pois essas podem diminuir ou dificultar a movimentação e adesão das células cancerosas. Além das alterações no nível de granulosidade observadas nas células tratadas com CDDP (Fig. 11 d, f) e MIX (Fig.11 m e l) incubadas por 12 h, as alterações dos lamelipódios observadas para esses tratamentos após 6 h e 12 h (Fig. 11. b, c, d, e, j, k, l e m) podem indicar potenciais modificações no grau de invasividade das células.

Segundo Al-Bahlani e colaboradores (2017), as células de adenocarcinoma mamário apresentam protrusões superficiais únicas que aumentam a capacidade de movimentação e adesão ao estroma circundante, sendo essa superfície diferente da célula normal de mama. Já os lamelipódios, isto é, protrusões largas e achatados com função de auxiliar o deslocamento e comunicação entre membranas, estão correlacionadas com as características metastáticas de várias linhagens, incluindo MDA-MB231, para a qual, quando tratadas com os derivados de platina, foi observada a diminuição da granulosidade e lamelipódios, sendo esse mecanismo descrito como uma forma de inibição da metástase.

Além de analisar a atuação farmacológica do CC1, CDDP e MIX em células cancerosas, observamos a citotoxicidade entre os tratamentos nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC). A CDDP isolada mostrou-se mais citotóxica para as células normais em comparação com as células do adenocarcinoma mamário, porém menos tóxica que o CC1 isolado (Tabela 5).

Essa atuação citotóxica mais acentuada de CC1 diante das células sadias indica aparentemente uma desvantagem para uma futura aplicação, porém estudos *in vivo* com o composto indicam que a dose letal mediana (DL_{50}) é sete vezes menos tóxica que a CDDP (DL_{50} CDDP 6,6 mg/ Kg⁻¹; DL_{50} CC1 48,98 mg/ Kg⁻¹), abrindo perspectivas para a continuidade dos testes (FERNANDES *et al.*, 2015; FREITAS, 2014).

Ao ser analisada a citotoxicidade dos compostos isolados e em associação observa-se que não há diferença entre os tratamentos em PBMC, porém verifica-se a necessidade de uma dose quase duas vezes maior de MIX para inibir 50% da viabilidade celular de células normais, quando comparadas com os valores obtidos para MDA-MB231 (Tabela 5), indicando que em um tratamento conjunto, as células neoplásicas são mais susceptíveis que as PBMC, sendo a concentração requerida de MIX não inferente na viabilidade de células normais.

Desta forma, os dados obtidos demonstram que MIX é promissor, devido a sinergia apresentada, resultando na redução da dose administrada da CDDP e do CC1 e alterações morfológicas semelhantes a CDDP, o que sugere a redução da toxicidade, mantendo ao mesmo tempo a atuação desejada frente a células cancerosas. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar a farmacodinâmica do CC1 e MIX, determinando a interação desses com moléculas biológicas, o seu mecanismo de transporte no organismo e as suas propriedades terapêuticas.

7. CONCLUSÃO

- O ensaio de viabilidade celular (MTT) mostrou que o CC1 apresentou atividade citotóxica mais acentuada que a CDDP nas linhagens MDA-MB231, PC3 e A549.
- MIX mostrou-se sinérgica, reduzindo 50% da dose requerida de CC1 e CDDP para determinar a EC_{50} .
- As células neoplásicas são mais susceptíveis que as células normais, sendo que a concentração requerida de MIX, em um tratamento conjunto, não é interferente na viabilidade de células normais.
- Os resultados de microscopia de fluorescência, varredura e transmissão, da avaliação do ciclo celular (Sub-G1) e potencial de membrana mitocondrial (JC1) e ativação de caspases demonstraram que CC1 e MIX induzem morte celular por apoptose na linhagem de adenocarcinoma mamário.
- De acordo com os resultados obtidos, é consistente a hipótese de que MIX apresenta-se como promissor, uma vez que, foi observada a redução da dose administrada e alterações morfológicas semelhantes à CDDP, sugerindo uma potencial redução da toxicidade, mantendo ao mesmo tempo a atuação desejada. Entretanto, estudos farmacológicos são necessários para elucidar o mecanismo de atuação.

REFERÊNCIAS

- ABU-SURRAH, A.; KETTUNEN, M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1337-1357, 2006.
- ADAN, A. *et al.* Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163-176, 2017.
- AL-BAHLANI, S. M. *et al.* Calpain-1 expression in triple-negative breast cancer: a potential prognostic factor independent of the proliferative/apoptotic index. **BioMed research international**, v. 2017, p.1-10, 2017.
- ALIZADEHNOHI, M. *et al.* The synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on human ovarian cancer cell line A2780cp. **Journal of venom research**, v. 3, p. 22-27, 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Treating advanced cancer. Disponível: <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/advanced-cancer/treatment.html>. Acesso: agosto, 2019.
- ANGAHER, L. T. An overview of breast cancer epidemiology, risk factors, pathophysiology and cancer risk reduction. **MedCrave Online J Biol Med**, v. 1, n. 4, p.92-96, 2017.
- APOSTOLOU, P. *et al.* Anvirezol in combination with cisplatin in breast, colon, lung, prostate, melanoma and pancreatic cancer cell lines. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 14, p. 18, 2013.
- ARYA, R.; WHITE, K. Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 39, p. 12-19, 2015.
- ATKIN-SMITH, G. K.; POON, I. K. H. Disassembly of the dying: mechanisms and functions. **Trends in cell biology**, v. 27, n. 2, p. 151-162, 2017.
- BARBOSA, I. R. *et al.* Cancer mortality in Brazil. **Medicine**, v. 94, n. 16, p.1-12, 2015.
- BENNETT, S.; BREIT, S. N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. **J. Leukoc. Biol**, v. 56, p.236-240, 1994.
- BHATTACHARJEE, A.; CHAKRABORTY, K.; SHUKLA, A. Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. **Metallomics**, 2017
- BRADY, D. C. *et al.* Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 492-496, 2014.

BORGES, F. V. Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de complexos de cobre e zinco frente a células leucêmicas e melanômicas. 2013. 136f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

BORGES, L. J. H. *et al.* In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 128-140, 2016.

BORTOLOZZI, R. *et al.* A novel copper (I) complex induces ER-stress-mediated apoptosis and sensitizes B-acute lymphoblastic leukemia cells to chemotherapeutic agents. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, p. 5978-5991, 2014.

BOULSOURANI, Z. *et al.* Synthesis, structure elucidation and biological evaluation of triple bridged dinuclear copper (II) complexes as anticancer and antioxidant/anti-inflammatory agents. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 1026-1040, 2017.

BULL, E. S. Síntese, caracterização e avaliação das atividades de nuclease e antitumoral de compostos de coordenação de cobre. 2008. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ.

CAI, L. *et al.* Telodendrimer nanocarrier for co-delivery of paclitaxel and cisplatin: A synergistic combination nanotherapy for ovarian cancer treatment. **Biomaterials**, v. 37, n. 1, p. 1-32, 2015.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in enzyme regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHOU, T. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 623-674, 2006.

COUTO, V. B. M. *et al.* "Além da mama": o cenário do Outubro Rosa no aprendizado da formação médica. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 41, n. 1, p. 30-37, 2017.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 5, n. 358, p. 502-511, 2008.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364-378, 2014.

DAVILA-MANZANILLA, S. G. *et al.* Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 266-274, 2017.

DI SIBIO, A. *et al.* Female breast cancer in Central and South America. **Cancer epidemiology**, v. 44, p. S110-S120, 2016.

DILDA, P. J.; HOGG, P. J. Arsenical-based cancer drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 6, p. 542-564, 2007.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1103-1124, 2016.

DJOKO, K. Y. *et al.* Antimicrobial effects of copper(II) bis(thiosemicarbazonato) complexes provide new insight into their biochemical mode of action. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 6, n. 4, p. 854-63, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FERNANDES, C. *et al.* Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper (II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 153, p. 68-87, 2015.

FERNANDES, C. *et al.* Síntese e aplicação de um composto de cobre no tratamento de tumores sólidos. Brasil Pat.: BR1020140173978, 15 jun. 2014.

FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper: An essential metal in biology. **Current Biology**, v. 21, n. 21, p. 877-883, 2011.

FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology research & perspectives**, v. 3, n. 3, 2015.

FREITAS, W. R. Efeitos antineoplásicos in vitro da caulibugulona a e in vivo do complexo de coordenação de cobre [CU(L1)CL]CL.2H2O. 2014. 103f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biociências Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

GARCÍA, M. A. *et al.* Apoptosis as a therapeutic target in cancer and cancer stem cells. **Novel Strategies and Futures Perspectives**, v. 2, 2012.

GARCÍA-RAMOS, J. *et al.* The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu (II) antineoplastic compounds (Casiopéínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. **Biometals**, v. 30, n. 1, p. 43-58, 2017.

GASKIN, D. *et al.* **The Societal and Economic Impact of Cancer Health Disparities**, Washington: C-Change, 2011. 69 p.

GEROMICHALOS, G. D. *et al.* Synergistic interaction between a mixed ligand copper (II) chelate complex and two anticancer agents in T47D human breast cancer cells in vitro. **Journal of B.U.ON.**, v. 10, n. 2, p. 235-240, 2005.

GLASS, G. Cardiovascular combinations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p. 731-732, 2004.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3-12, 2010.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 615-627, 2002.

GRAF, N.; LIPPARD, S. J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 993-1004, 2012.

GUDISEVA S. et al. Molecular biology of head and neck cancer. **Journal of Dr. NTR University of Health Sciences**, v. 6, p. 1-7, 2017.

GUICHARD, N. et al. Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. **The Analyst**, v. 142, n. 13, p. 2273-2321, 2017.

HARRACH, S.; CIARIMBOLI, G. Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 1-7, 2015.

HORN, A. *et al.* Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 128, p. 38-47, 2013.

HUMPHREY, R. W. *et al.* Opportunities and challenges in the development of experimental drug combinations for cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, p. 1222-1226, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2015, 171 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2018, 130p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Tratamento do câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Acessado em: Fevereiro, 2019.

IVERS, L. P. *et al.* Dynamic and influential interaction of cancer cells with normal epithelial cells in 3D culture. **Cancer cell international**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2014.

JIA, J. *et al.* Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. **Nature Reviews**, v. 8, p. 111-128, 2009.

KAJSTURA, M. *et al.* Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 71, n. 3, p. 125-131, 2007.

KANDUC, D. *et al.* Cell death: apoptosis versus necrosis (review). **International journal of oncology**, v. 21, n. 1, p. 165-70, 2002.

KENIFIC, C. M.; DEBNATH, J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 37-45, 2015.

KOSTOVA, I. Platinum complexes as anticancer agents. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2006.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Robbins and cotran pathologic basis of disease. 10. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2018. 910p.

LARDER, B. A. *et al.* Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. **Science**, v. 269, p. 696-699, 1995.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

LEWIS, E. A., TOLMAN, W. B. Reactivity of dioxygen-copper systems. **Chemical Reviews**, v. 104, p.1047–1098, 2004.

LOPES, B. F. Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de compostos de coordenação de cobre: influência do naftol e da cumarina na atividade biológica. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 123, p. 95-113, 2018.

MA Z. Y. *et al.* Activities of a novel Schiff Base copper (II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, n.2, p. 1-9, 2012.

MACIEL, L. L. F. Estudo in vitro das alterações morfo-funcionais de células de câncer de pulmão, tratadas com composto de coordenação de cobre. 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

MARZANO, C. *et al.* Copper complexes as anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p.185-211, 2009.

MCDONNELL, M. A. *et al.* Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF α -induced apoptosis in murine cells. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 9, p. 1005, 2003.

MCDONNELL, M. A. *et al.* Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, 20149-20158, 2008.

MIYAKE, T.; MCDERMOTT, J. C.; GRAMOLINI, A. O. A method for the direct identification of differentiating muscle cells by a fluorescent mitochondrial dye. **Plos one**, v. 6, n. 12, p. e28628, 2011.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NADAI, E. S. B. Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de compostos de coordenação de cobre(II) e gálio (III). 2016. 172f. Tese (Doutorado), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ.

NELSON, H. S. Advair: combination treatment with fluticasone propionate/salmeterol in the treatment of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 398-416, 2001.

NEMATBAKHSH, M. *et al.* Cisplatin-induced nephrotoxicity; protective supplements and gender differences. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 2, p. 295-314, 2017.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v.3, p. 67-70, 2001.

Organização Mundial da Saúde. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: Janeiro, 2019.

OU, L. *et al.* The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6633-6646, 2017.

OUN, R.; MOUSSA, E. Y.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, p. 6645-6653, 2018.

OUTUBRO ROSA. História. Disponível em: <<http://www.outubrorosa.org.br/historia.htm>>. Acesso em: Fevereiro, 2019.

OVERSTEEGEN, L. M.; ROVINI, H. HIV combination products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 951-952, 2007.

PALMER, A. C.; SORGER, P. K. Combination cancer therapy can confer benefit via patient-to-patient variability without drug additivity or synergy. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1678-1691, 2017.

PEIXOTO, M. S.; DE OLIVEIRA, M. F.G.; DE MEDEIROS, S. R. B. Cell death pathways of particulate matter toxicity. **Chemosphere**, v. 188, p. 32-48, 2017.

PEMOVSKA, T.; BIGENZAHN, J. W.; SUPERTI-FURGA, G. Recent advances in combinatorial drug screening and synergy scoring. **Current opinion in pharmacology**, v. 42, p. 102-110, 2018.

PEREIRA, L. M. Análise das alterações morfológicas de células de câncer de pulmão tratadas com composto de coordenação de cobre β . 2017. Monografia de Conclusão de Curso, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

PIVETTA, T. *et al.* Mixed copper-platinum complex formation could explain synergistic antiproliferative effect exhibited by binary mixtures of cisplatin and copper-1,10-phenanthroline compounds: An ESI-MS study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 151, p. 107-114, 2015.

PORTES, J. A. *et al.* Toxoplasma gondii apoptosis and cellular division alterations after in vitro treatment with copper(II) complexes. **Veterinary Parasitology**, p. 1-12, 2016.

PORTUGAL, J.; BATALLER, M.; MANSILLA, S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. **Tumori**, v. 95, n. 4, p. 409-21, 2009.

RAJESWARAN A. *et al.* Efficacy and side effects of cisplatin and carboplatin based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. **Lung Cancer**. v.59, n.1, p.1-11, 2008.

RAO, R. V. *et al.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program An Apaf-1-independent intrinsic pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21836-21842, 2002.

REVATHI, N. *et al.* Biologically active Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes of pyrimidine derivative schiff base: dna binding, antioxidant, antibacterial and in vitro anticancer studies. **Journal of Fluorescence**, n.1, 2017.

ROGOLINO, D. *et al.* Anti-proliferative effects of copper(II) complexes with hydroxyquinoline-thiosemicarbazone ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 140-153, 2017.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1799-1802, 1970.

RUIZ, R. *et al.* Improving access to high-cost cancer drugs in Latin America: Much to be done. **Cancer**, v. 123, n. 8, p. 1313-1323, 2017.

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

SCHENK, P. W. *et al.* SKY1 is involved in Cisplatin-induced cell kill in *Saccharomyces cerevisiae*, and inactivation of human homologue, SRPK1, induces Cisplatin resistance in a human ovarian carcinoma cell line. **Cancer Research**, v. 61, p. 6982-6986, 2001.

SERMENT-GUERRERO, J. *et al.* Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 166, p. 68-75, 2017.

SINHA, T. Tumors: Benign and malignant. **Cancer Therapy & Oncology International Journal**, v. 10, n. 3, p. 001-003, 2018.

SPRAGUE, B. L. *et al.* Variation in breast cancer–risk factor associations by method of detection: Results from a series of case-control studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 181, n. 12, p. 956-969, 2015.

SPRECKELMEYER, S.; ORVIG, C.; CASINI, A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15584-15610, 2014.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **International Agency for Research on Cancer**, 2014.

TABTI, R. *et al.* Progress in copper complexes as anticancer agents. **Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 875-879, 2017.

TOKLU, H.; NOGAY, N. H. Effects of dietary habits and sedentary lifestyle on breast cancer among women attending the oncology day treatment center at a state university in Turkey. **Nigerian journal of clinical practice**, v. 21, n. 12, p. 1576-1584, 2018.

TOMASETTI C.; VOGELSTEIN B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science**, v. 347, n. 6217, p. 78-81, 2015.

TÜRKKAN, E. *et al.* Anticancer, antimicrobial, spectral, voltammetric and DFT studies with Cu(II) complexes of 2-hydroxy-5-methoxyacetophenone thiosemicarbazone and its N(4)- substituted derivatives. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 831, p. 23-35, 2017.

VOGELSTEIN B.; KINZLER K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n.8, p. 789-799, 2004.

WANG, X. *et al.* Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs. **Chemical Reviews**, v. 119, p. 1138-1192, 2019.

WAXMAN, S.; ANDERSON, K. C. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. **The oncologist**, v. 6, n. 2, p. 3-10, 2001.

WEHBE, M. *et al.* A Perspective – Can copper complexes be developed as a novel class of therapeutics? **Dalton Trans.**, 2017.

XIE, F.; PENG, F. Anti-Prostate cancer activity of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde–thiosemicarbazide copper complexes by fluorescent microscopic imaging. **Journal of Fluorescence**, p. 3-7, 2017.

XU, J. X. *et al.* Shikonin induces an anti-tumor effect on murine mammary cancer via p38-dependent apoptosis. **Oncology reports**, v. 41, n. 3, p. 2020-2026, 2019.

YANG, Q. Y. *et al.* Syntheses, crystal structures, and antitumor activities of Copper (II) and Nickel (II) complexes with 2-((2-(Pyridin-2-yl) hydrazono) methyl) quinolin-8-ol. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1874, 2018.

YUAN, R. Traditional Chinese medicine an approach to scientific proof and clinical validation. **Pharmacol Ther**, v. 86, p. 191-198, 2000.

ZOLI, W. *et al.* In vitro preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, n. 1, p. 69-82, 2001.