

**EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS *IN VITRO* DA CAULIBUGULONA A E
IN VIVO DO COMPLEXO DE COORDENAÇÃO DE COBRE
[Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O**

WILLIAM RODRIGUES DE FREITAS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
JULHO DE 2014**

**EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS *IN VITRO* DA CAULIBUGULONA A E
IN VIVO DO COMPLEXO DE COORDENAÇÃO DE COBRE
[Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O**

WILLIAM RODRIGUES DE FREITAS

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

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
JULHO DE 2014

**EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS *IN VITRO* DA CAULIBUGULONA A E
IN VIVO DO COMPLEXO DE COORDENAÇÃO DE COBRE
[Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O**

WILLIAM RODRIGUES DE FREITAS

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

Aprovada em 29 de julho de 2014

Comissão Examinadora:

Luciana Ferreira Romão, doutora em Ciências Morfológicas – UFRJ

Gerlinde Agates Platais Brasil Teixeira, doutora em Patologia – UFF

Elena Lassounskaia, doutora em Imunologia – UENF

Milton Masahiko Kanashiro, doutor em Biociências e Biotecnologia – UENF

Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, que investiram em minha formação com zelo e primor, acreditando que a educação é o legado maior a ser deixado para um filho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Milton Masahiko Kanashiro, que me acolheu na UENF desde o estágio de graduação e me orientou no mestrado e doutorado, permitindo o meu crescimento pelos caminhos da ciência.

Aos meus irmãos André e Wallace, pelo apoio ao longo de toda a vida de estudos.

Aos amigos discentes da grande família do LBR: Andreza, Fabrício, Thatiana, Sanderson, Gislane, Simone, David, Monique, Marina, Jaques, Laura, Pedro e Thais, pelos momentos de descontração e colaboração nas atividades discentes.

A Dona Marina, pelo espírito guerreiro que me encoraja a enfrentar os desafios e adversidades impostos pela vida.

A Dra. Marcela Boechat, pela revisão desta tese.

Aos pesquisadores do LCQUI/UENF, Drs. Christiane Fernandes e Adolfo Horn Jr e a doutoranda Érika Bull, pelo fornecimento do complexo de cobre utilizado nesta tese.

Ao pesquisador Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda, da UNICAMP, que forneceu gentilmente as caulibugulonas a serem testadas nesta tese.

As agências de fomento a pesquisa: CAPES, CNPQ e FAPERJ pelas bolsas de doutorado e pela verba para custear a manutenção das pesquisas.

Ao técnico de biotério Maurício, que zelou pela criação dos animais Balb/C nude, fornecendo animais em quantidade e condições necessárias para a realização dos experimentos.

Ao corpo técnico do LBR: Rita, Juliana, Verônica, Núbia e Fernando, pela manutenção da qualidade do laboratório, permitindo que as atividades de ensino e pesquisa pudessem ser realizadas e os resultados alcançados.

A doutoranda Giliane, pelas colaborações nas imunohistoquímicas.

Aos professores do LBR: Elena, Andrea, Elizângela, Alba e ao amigo Jorge, pelos momentos de discussão e aprendizado dentro do laboratório, instigando o pensamento crítico sobre ciências.

Aos amigos da UENF e da cidade de Campos dos Goytacazes, pelo apoio em todos os momentos em que estive na região da planície Goytacaz.

SUMÁRIO

1.Introdução	1
1.1.Câncer.....	1
1.1.1.Epidemiologia.....	1
1.1.2.Conceitos	1
1.1.3.Classificação	3
1.2.Tratamentos antineoplásicos.....	4
1.2.1.O Ciclo celular	5
1.2.1.1.Controle do ciclo celular	5
1.2.1.2.Mecanismos de checagem do ciclo celular	6
1.2.2.Apoptose	7
1.2.3.Tipos de tratamentos antineoplásicos	9
1.2.3.1.Cirurgia.....	9
1.2.3.2.Radioterapia	9
1.2.3.3.Terapia-alvo	10
1.2.3.4.Imunoterapia	12
1.2.3.5.Terapia fotodinâmica.....	13
1.2.3.6.Quimioterapia	14
1.2.3.6.1.Antimetabólicos	15
1.2.3.6.2.Antibióticos	16
1.2.3.6.3.Inibidores mitóticos.....	16
1.2.3.6.4.Alquilantes	17
1.3.Complexos de coordenação de cobre.....	17
1.4.Quinonas e quinolinas	19
1.4.1.Caulibugulonas Sintéticas	21
1.4.2.Efeitos biológicos das caulibugulonas.....	22
2.Justificativas	23
3.Capítulo 1: Potencial antineoplásico <i>in vitro</i> da caulibugulona A.....	24
3.1.Objetivos	24
3.1.1.Objetivo geral	24
3.1.2.Objetivos específicos.....	24
3.2.Metodologias	25
3.2.1.Reagentes	25
3.2.2.Preparação das caulibugulonas A-D	25

3.2.3.Linhagens celulares tumorais e culturas de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs)	25
3.2.4.Avaliação da viabilidade celular	26
3.2.5.Observação morfológica por microscopia de fluorescência	26
3.2.6.Ensaio da atividade das caspases 2, 3, 4, 8 e 9	27
3.2.7.Detecção de apoptose por ensaio de Anexina V-FITC/PI	28
3.2.8.Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	28
3.2.9.Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	29
3.2.10.Análises estatísticas	29
3.3.Resultados	29
3.3.1.Caulibugulonas promovem citotoxicidade seletiva em células de linhagens tumorais humanas.....	29
3.3.2.Tratamento com caulibugulona A promove alteração morfológica característica de apoptose.....	30
3.3.3.Caulibugulona A induz apoptose com ativação de caspase 3.....	31
3.3.4.Tratamento com a caulibugulona A induz apoptose com marcação de Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI).....	32
3.3.5.Caulibugulona A ativa caspases iniciadoras 2 e 9	34
3.3.6.Caulibugulona A promove redução do potencial de membrana mitocondrial em células U937.....	34
3.3.7.Caulibugulona A promove aumento na geração de ROS em células u937.....	37
3.3.8.Tratamento com inibidor de ROS previne citotoxicidade induzida pela caulibugulona A em células u937.....	37
3.3.9.Tratamento com inibidor de ROS inibe apoptose em células U937 tratadas com caulibugulona A.....	39
3.4.Discussão.....	40
3.5.Conclusões.....	48
4.Capítulo 2: Potencial antineoplásico <i>in vivo</i> do complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$	49
4.1.Objetivos	49
4.1.1.Objetivo geral	49
4.1.2.Objetivos específicos.....	49
4.2.Metodologias	49
4.2.1.Reagentes	49
4.2.2.Preparação do complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$	49
4.2.3.Linhagens celulares Tumorais.....	50

4.2.4. Animais.....	50
4.2.5. Modelos experimentais de câncer.....	50
4.2.5.1. Modelo de melanoma subcutâneo de células B16-F10.....	50
4.2.5.2. Modelo de melanoma subcutâneo de células SK-MEL-5.....	51
4.2.5.3. Modelo heterotópico subcutâneo de células U937.....	51
4.2.5.4. Modelo heterotópico subcutâneo de células H460.....	51
4.2.5.5. Modelo heterotópico subcutâneo de células COLO205.....	52
4.2.6. Determinação da toxicidade aguda (DL ₅₀) do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O ...	52
4.2.7. Avaliação da toxicidade pela administração de 50% da DL ₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	52
4.2.8. Testes <i>in vivo</i> da atividade antineoplásica do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O....	53
4.2.9. Avaliação <i>in situ</i> da indução de apoptose e inibição da proliferação celular	53
4.2.10. Análises estatísticas.....	53
4.3. Resultados.....	54
4.3.1. Determinação da DL ₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	54
4.3.2. Determinação da toxicidade do Complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O após administrações de doses repetidas.....	54
4.3.3. Inibição do desenvolvimento das lesões subcutâneas induzidas por células B16-F10 em animais tratados com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	56
4.3.4. Inibição do desenvolvimento das lesões subcutâneas induzidas por células SK-mel-5 em animais tratados com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	60
4.3.5. Inibição do desenvolvimento das lesões subcutâneas induzidas por células h460 em animais tratados com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	68
4.3.6. O complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O não exibe efeito antineoplásico em lesões subcutâneas induzidas por células COLO205.....	75
4.3.7. O complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O não exibe efeito antineoplásico em lesões subcutâneas induzidas por células U937.....	80
4.4. Discussão.....	84
4.5. Conclusões.....	87
5. Referências Bibliográficas.....	88
6. Anexos.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Caulibugulona A induz morfologia de apoptose em células U937.	31
Figura 2.Caulibugulona A induz ativação de caspase 3 em células U937..	32
Figura 3.Caulibugulona A induz marcação com anexina V/FITC e PI em células U937.....	33
Figura 4.Caulibugulona A induz ativação das caspases iniciadoras 2 e 9 em células U937.....	35
Figura 5.Caulibugulona A induz redução do potencial de membrana mitocondrial em células U937.....	36
Figura 6.Caulibugulona induz aumento da geração endógena de ROS em células U937.....	38
Figura 7.NAC inibe o efeito citotóxico produzido pelo tratamento com a caulibugulona A.....	39
Figura 8.NAC inibe apoptose em células U937 tratadas com a caulibugulona A.....	41
Figura 9.Determinação da DL ₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	55
Figura 10.O complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O promove redução da massa corporal de camundongos Balb/C nude tratados com doses seguidas de 50% da DL ₅₀	55
Figura 11.Células B16-F10 promovem lesões subcutâneas em animais C57/BL6... ..	57
Figura 12.Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O e doxorrubicina inibem o desenvolvimento de lesões tumorais de células B16-F10 em animais C57/BL6.....	58
Figura 13.Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O inibe o desenvolvimento das lesões de células B16-F10..	59
Figura 14.Lesões de células B16-F10 de animais tratados com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam massa menor.....	60
Figura 15.Tratamento de lesões de células B16-F10 com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O induz intensa produção de melanina.....	61
Figura 16.Células SK-MEL-5 induzem lesões subcutâneas em animais balb/C nude.. ..	62
Figura 17.Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células SK-MEL-5 em animais Balb/C nude.....	63
Figura 18.Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O inibe o desenvolvimento das lesões de células SK-MEL-5.....	65
Figura 19.Lesões de células SK-MEL-5 de animais tratados com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam massa menor.....	65
Figura 20.Tratamento de lesões de células SK-MEL-5 com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam redução na marcação com Ki-67.....	67

Figura 21. Tratamento com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O induz pouca marcação para TUNEL em lesões de células SK-MEL-5.....	68
Figura 22. Células H460 induzem lesões subcutâneas em animais Balb/C nude.....	69
Figura 23. Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células H460 em animais Balb/C nude.....	70
Figura 24. Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O inibe o desenvolvimento das lesões de células H460.....	72
Figura 25. Lesões de células H460 de animais tratados com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam massa menor.....	72
Figura 26. Tratamento de lesões de células H460 com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam redução na marcação com Ki-67.....	74
Figura 27. Tratamento com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O induz pouca marcação para TUNEL em lesões de células H460.. ..	75
Figura 28. Células COLO205 induzem lesões tumorais em camundongos Balb/C nude.. ..	76
Figura 29. Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O não inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células COLO205 em animais Balb/C nude.....	78
Figura 30. Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O não inibe o desenvolvimento das lesões de células COLO205.. ..	79
Figura 31. Lesões de células COLO205 de animais tratados com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam massa equivalente aos animais não tratados.....	79
Figura 32. Células U937 induzem lesões tumorais em camundongos Balb/C nude. .	80
Figura 33. Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O não inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células U937 em animais Balb/C nude.....	82
Figura 34. Tratamento com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O não inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células U937 em animais Balb/C nude.....	83
Figura 35. Lesões de células COLO205 de animais tratados com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O apresentam massa equivalente aos animais não tratados.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. IC ₅₀ das caulibugulonas.....	30
Tabela 2. Quantidade de animais utilizados nos teste de atividade antineoplásica do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância Entre Grupos
APAF-1 - Apoptosis Protease Activating Factor-1
APO-1 - Apoptosis Antigen-1
ATCC - American Type Culture Collection
ATP – Adenosina Tri-Fosfato
BAX - BCL2 Associated X Protein
BCL-2 - B-Cell Lymphoma/Leukemia-2
BID - Interacting Domain Death Agonist
BMK1 – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno Big 1
CAD - DNase Ativada por Caspase
CD20 - Cluster of Differentiation 20
CD52 - Cluster of Differentiation 52
CD95 - Cluster of Differentiation 95
CDC25 – Proteína 25 do Ciclo de Divisão Celular
CDK – Ciclina Dependente de Quinase
C-LEVD-pNa - Peptídeo com a sequência de aminoácidos Ac-Leu-Glu-Val-Asp-pNA (pNA=p-Nitroaniline)
COLO205 – Linhagem de Adenocarcinoma da Colon Humano
Cu/Zn-SOD - Cobre Zinco Superóxido Dismutase
DCFH-DA - 2,7-Diclorofluoresceína diacetato
DEVD-pNA - Peptídeo Com a Sequência de Aminoácidos Ac-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (pNA=p-Nitroaniline)
DL₅₀ - Dose Letal Para 50% da Amostra
D-MEM/F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DNase - Desoxirribunuclease
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
ERK – Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FADH₂ . Dinucleótido de Flavina e Adenina Reduzido
FASE G1 – Fase de Gap 1
FASE G2 – Fase de Gap 2
FASE M – Fase de Mitose
FASE S – Fase de Síntese
FITC - Isotiocianato de Fluoresceína
FSB - Soro Fetal Bovino
H460 – Linhagem de Câncer de Pulmão Humano de Células Grandes
HBPA - Ligante 2- hydroxybenzyl)(2-methylpyridyl)amine
HBV - Vírus da Hepatite B
HCl – Ácido Clorídrico

HCT 116 - Linhagem de Carcinoma de Colon Humano
HeLa - Linhagem de Cancer de Colo Uterino Humano
HER2 - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
HL-60 - Linhagem de Leucemia Promieocítica Aguda Humana
HPV - Papiloma Virus Humano
IC₅₀ - Concentração Necessária Para Matar 50% das Células
IETD-pNA - Peptídeo Com a Sequência de Aminoácidos Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-pNA (pNA=p-Nitroaniline)
JC-1 - 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-imidacarbocianina iodeto, 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocianina iodeto
JNK – Proteína Quinase N-Terminal
Ki-67 - Proteína Nuclear de Proliferação
LEHD-pNA - Peptídeo Com a Sequência de Aminoácidos Ac-Leu-Glu-His-Asp-pNA (pNA=p-Nitroaniline)
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MaPK p38 - Mitogen-Activated Protein Kinases p38
MOLT4 - Linhagem de Leucemia Linfoblástica Aguda Humana 4
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
NAC - N-Acetil-L-cisteine
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
OMS – Organização Mundial de Saúde
P388 - Linhagem de Leucemia Linfoblástica Murina
PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS - Phosphate Buffered Saline
pH – Potencial Hidrogeniônico
PI – Iodeto de Propidio
RNA – Ácido Ribonucléico
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
SAPK – Proteína Quinase Ativada por Estresse
SEB - Enterotoxina B Staphylococcica
SKMEL-5 - Linhagem de Melanoma Metastático Humano 5
THP-1 - Linhagem de Leucemia Monocítica Aguda Humana
TNF – Fator de Necrose Tumoral
U937 – Linhagem Celular Humana Estabelecida de um Linfoma Histiocítico
UV - Ultra-Violeta
VDVAD-pNA - Peptídeo Com a Sequência de Aminoácidos Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-pNA (pNA=p-Nitroaniline)
VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VM-26 - Teniposídeo
VP-16 - Etoposídeo

RESUMO

Os tratamentos para o câncer são muito agressivos, incluindo mutilações pela excisão cirúrgica das lesões e a administração de drogas antineoplásicas altamente tóxicas. Aliado a estes fatores e a baixa eficácia da maioria das drogas, novos quimioterápicos antineoplásicos continuam a ser pesquisados. A caulibugulona A é uma isoquinolino quinona citostática capaz de inibir o ciclo celular, atuando diretamente nas vias da MAPK p38 e das ciclinas CDC25 e o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é um agente citotóxico, capaz de induzir apoptose em várias linhagens celulares cancerígenas humanas e murinas. Este trabalho objetivou pesquisar *in vitro* o potencial citotóxico da caulibugulona A e *in vivo* a eficácia do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no tratamento de lesões cancerígenas em modelos murinos de câncer. Nos testes realizados, a caulibugulona A demonstrou potencial citotóxico seletivo, sendo até 13 vezes mais ativo para células tumorais do que para células mononucleares do sangue periférico. Os testes de microscopia de fluorescência com coloração com brometo de etideo e laranja de acridina, atividade da caspase 3 e citometria de fluxo com marcação para anexina V/FITC+PI confirmam que a citotoxicidade relacionada a caulibugulona A ocorre pela indução de apoptose. As análises de citometrias de fluxo com marcação para DCFH-DA mostraram que a caulibugulona A induz intensa produção de espécies reativas de oxigênio, sendo esta produção o principal fator indutor de citotoxicidade. O complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentou baixa toxicidade em camundongos, com redução de 6,25% da massa corporal quando administrado em múltiplas doses de 50% da DL_{50} . Este complexo demonstrou notável potencial antineoplásico no tratamento de lesões cancerígenas de células B16-F10, SK-MEL-5 e H460, e as análises imunohistoquímicas destas lesões confirmaram o efeito antineoplásico. Tais resultados apontam que a caulibugulona A e o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ demonstraram-se promissores como agentes antineoplásicos, abrindo a perspectiva para novas pesquisas para a aplicação clínica.

Palavras-Chaves: Caulibugulona A, complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e antineoplásico.

ABSTRACT

The treatments for cancer are very aggressive, as the mutilation by surgical excision of the lesions and the administration of highly toxic antineoplastic drugs. Due to the high toxicity and low efficacy of some of these drugs such, new drugs continue to be investigated. The caulibugulone A is an cytostatic isoquinoline quinone capable of inhibiting the cell cycle acting directly on MAPK p38 and CDC25 cyclins and the copper complex $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ is a cytotoxic agent capable of inducing apoptosis in several human cancer cell lines. The objective of this work is to investigate *in vitro* cytotoxicity potential of caulibugulone A and *in vivo* with the complex $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ in the treatment of cancerous lesions in cancer murine models. Caulibugulone A showed a selective cytotoxic potential, being up to 13 times more active for tumor cells than for PBMC. Fluorescence microscopy with ethidium bromide and acridine orange staining, caspase 3 activity and flow cytometry with annexin V/FITC and PI staining indicate that this cytotoxicity occurs through induction of apoptosis. Flow cytometry analysis with DCFH-DH staining showed that caulibugulone A induces intense ROS production, which the main cytotoxicity factor. The complex $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ demonstrated low toxicity in mice, leading to a 6,25% of body weight when administered in multiple doses of LD_{50} . This complex showed a remarkable antineoplastic potential in the treatment of murine lesions of B16-F10, SK-MEL-5 and H460 cells. The immunohistochemical analysis of tumor lesions of treated animals confirmed the antineoplastic potential observed by monitoring the average tumor volumes. These results indicate that caulibugulone A and the complex $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ are promising antineoplastic agents, opening the prospect for further research to clinical application.

Keywords – Caulibugulone A, complex $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ and antineoplastic.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

As estatísticas para o ano de 2014 revelam que as tendências da incidência de mortalidade no mundo por câncer estão crescendo a um ritmo alarmante. Em 2012, o número de novos casos de câncer aumentou para 14 milhões, com 8,2 milhões de mortes. Espera-se para as duas próximas décadas que o número de novos casos de câncer chegue a 22 milhões por ano, com 13 milhões de mortes anuais (STEWART e WILD, 2014). Globalmente, em 2012, os cânceres mais diagnosticados foram de pulmão (1,8 milhão de casos, 13,0% do total), de mama (1,7 milhões, 11,9%) e intestino grosso (1,4 milhões, 9,7%). As causas mais comuns de morte por câncer foram câncer de pulmão (1,6 milhões, 19,4% do total), fígado (0,8 milhão, 9,1%) e estômago (0,7 milhão, 8,8%). Para o ano de 2014, as previsões apontam que uma em cada quatro mortes deva ocorrer em virtude do câncer (SIEGEL *et al.*, 2014). A maior incidência de casos de câncer e conseqüentemente de mortes ocorrem nos países em desenvolvimento. No total, 60% dos casos novos de câncer do mundo se concentram nas populações da África, Ásia e Américas do Sul e Central, representando cerca de 70 % das mortes por câncer no mundo. Esta situação é agravada pela falta de detecção precoce e de tratamento eficaz (STEWART e WILD, 2014; SIEGEL *et al.*, 2014). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 revela uma ocorrência esperada de 576 mil novos casos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o tipo mais frequente (182 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (FACINA, 2014).

1.1.2. CONCEITOS

O câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças, sendo todas caracterizadas pela proliferação desordenada de células anormais, denominadas de células cancerígenas. Apesar de serem próprias do organismo, as células cancerígenas apresentam alterações genéticas que lhes conferem a alta capacidade de proliferação e invasão de tecidos e órgãos. Tais alterações genéticas também resultam na perda da funcionalidade e assim, estas células proliferam em meio às células normais, comprometendo o funcionamento dos tecidos e órgãos (KUMAR, *et al.*, 2005).

Os proto-oncogenes são um grupo de genes que controlam a proliferação, diferenciação e a morte celular. Quando são acometidos por mutações que comprometem o seu funcionamento normal, os proto-oncogenes passam a ser denominados de oncogenes e seus produtos proteicos são chamados de oncoproteínas. Os oncogenes exibem produções descontroladas das proteínas que controlam o ciclo, morte e a diferenciação celular, resultando em células com alta capacidade proliferativa e com pouca diferenciação, que se organizam em massas denominadas de tumores (CHIAL, 2008; BILD, 2006; FEARON e VOGELSTEIN, 1990; MITCHELL, 2007). Quando a mutação sofrida pelo proto-oncogene não compromete a diferenciação celular, formam-se massas tumorais que apresentam células que proliferam lentamente e possuem alto grau de diferenciação. Estes tumores não são cânceres, sendo denominados de tumores benignos. Alguns destes tumores trazem riscos à saúde, como os que afetam o sistema nervoso, mas a maioria apresenta uma localização bem delimitada, o que permite uma completa remoção cirúrgica e baixa taxa de recorrência (DOMINGO, 2008).

As células cancerígenas que compõem a massa tumoral apresentam intensa atividade proliferativa, o que as levam a acumular mutações. Algumas das células do tumor acumulam mutações que as tornam tão indiferenciadas que passam a comportar-se semelhantemente a células tronco, sendo denominadas de células tronco tumorais (GIANCOTTI, 2013; REYA, *et al.*, 2001). Estas células possuem reduzida capacidade proliferativa, no entanto, acumulam muitas mutações, de tal forma que as células geradas pelas células tronco tumorais podem ter reativados os oncogenes para proliferação e tornarem-se células cancerígenas altamente proliferativas (DEAN, *et al.*, 2005). Devido a baixa atividade proliferativa, as células tronco tumorais não são eliminadas pelas terapias antineoplásicas que atuam sobre o ciclo celular, sendo as principais responsáveis pela recidiva do câncer (HUNTER, *et al.*, 2008).

Além de apresentarem baixa capacidade proliferativa, algumas células derivadas das células tronco tumorais apresentam capacidade de invadir a matriz extracelular e a membrana basal de vasos sanguíneos e linfáticos. Ao invadirem os sistemas circulatório e linfático, essas células sofrem metástase e se disseminam pelo corpo (BOGENRIEDER e HERLYN, 2003; KAWADA e MAKOTO, 2011). O pior prognóstico para o paciente com câncer ocorre quando o mesmo passa a ser acometido por metástases, pois a extensão e a localização destas lesões podem ser

incompatíveis com remoções cirúrgicas e radioterapia (KAWADA e MAKOTO, 2011; EICHLER, *et al.*, 2011).

1.1.3. CLASSIFICAÇÃO

Os cânceres são classificados de acordo com a classificação internacional de doenças oncológicas (PAUL, *et al.*, 2000) e podem ser classificados de duas formas: de acordo com o tipo celular em que o câncer se originou (tipo histológico da lesão) ou pelo sítio principal em que a lesão se desenvolveu pela primeira vez. Como o câncer pode ter origem de qualquer célula que sofra mutações e comece a proliferar invariavelmente, a classificação mais importante é a histológica, pois permite identificar qual o tipo celular envolvido e assim, indicar o tratamento mais adequado, já que em um mesmo sítio pode haver células diferentes e que tenham sensibilidades diferentes aos agentes terapêuticos (KUMAR, *et al.*, 2005). Do ponto de vista histológico, existem centenas de diferentes tipos de cânceres, que são agrupados em seis categorias principais: carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma e tipos mistos.

Carcinoma refere-se a uma neoplasia maligna de origem epitelial ou câncer do revestimento interno ou externo do corpo e são responsáveis por 80 a 90% de todos os casos de câncer no mundo. Os carcinomas são subdivididos em dois subtipos principais: adenocarcinoma, que se desenvolve em um órgão ou glândula, e o carcinoma propriamente dito, que desenvolve dos epitélios de revestimento interno e externo do corpo (KUMAR, *et al.*, 2005; FROM, *et al.*, 2007).

Os sarcomas referem-se aos cânceres que se originam dos tecidos de suporte e conjuntivos como ossos, tendões, cartilagem, músculo e gordura. Os sarcomas geralmente se assemelham ao tecido em que crescem, sendo subdivididos em: osteossarcoma ou sarcoma osteogênico (osso), condrossarcoma (cartilagem), leiomiossarcoma (músculo liso), rabdomiossarcoma (músculo esquelético), sarcomas mesoteliais ou mesotelioma (revestimento membranoso de cavidades do corpo), fibrossarcoma (tecido conjuntivo fibroso), angiosarcoma ou hemangioendotelioma (vasos sanguíneos), lipossarcoma (tecido adiposo), mixossarcoma (tecido conjuntivo embrionário primitivo), tumor mesodermal misto (tipos mistos de tecido conjuntivo) (KUMAR, *et al.*, 2005; PAUL, *et al.*, 2000; LACERDA, 2007; COINDRE, 2006).

O mieloma é um câncer que se origina nos plasmócitos da medula óssea. Estas células produzem uma grande quantidade de anticorpos anormais, que circulam pelo sangue e tecidos corporais e por vezes, interagem com estruturas próprias do organismo (KUMAR, *et al.*, 2005; PAUL, *et al.*, 2000).

As leucemias compreendem os cânceres que desenvolvem na medula óssea. Neste tipo de câncer ocorre uma produção excessiva de leucócitos imaturos e sem função, que povoam a medula óssea vermelha impedindo a formação de células maduras, o que enfraquece o sistema imunológico. As leucemias também afetam as células vermelhas e os precursores de plaquetas, impedindo a maturação destas células na medula óssea vermelha, o que promove anemias e problemas de coagulação do sangue. As leucemias podem ser subdivididas em: mielóide ou leucemia granulocítica (afeta os leucócitos granulocíticos), linfática, linfocítica ou leucemia linfoblástica (afeta os linfócitos) e a policitemia vera (afeta vários tipos de células sanguíneas, com predominância dos eritrócitos) (KUMAR, *et al.*, 2005; PAUL, *et al.*, 2000; BRASILEIRO-FILHO, 2006).

Os linfomas se desenvolvem no sistema linfático, afetando os glândulos e vasos linfáticos, timo, baço e órgãos linfáticos de mucosa. Diferente das leucemias, em que as células encontram-se suspensas no sangue, às células dos linfomas forma tumores sólidos. Os linfomas também podem afetar órgãos específicos, tais como estômago, mama e cérebro, sendo referenciados como linfomas extra-nodais. Os linfomas são subclassificados em duas categorias: o linfoma Hodgkin e linfoma não-Hodgkin. A presença de células de Reed-Sternberg em linfoma Hodgkin o distingue do linfoma não-Hodgkin (KUMAR, *et al.*, 2005; PAUL, *et al.*, 2000; ROMAN e SMITH, 2011).

Os cânceres de tipos celulares mistos podem apresentar células de categorias histológicas distintas (epiteliais e conjuntivas). Os principais exemplos são: carcinoma adenoescamoso, tumor mesodermal misto, carcinosarcoma e teratocarcinoma (PAUL, *et al.*, 2000).

1.2. TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS

Os tratamentos aplicados aos pacientes com câncer visam sempre à eliminação das células tumorais. Como as células tumorais são próprias do organismo, células normais do paciente também ficam susceptíveis a sofrer com o tratamento. Buscando peculiaridades existentes entre as células tumorais e normais,

têm-se percebido que as primeiras proliferam-se muito mais rápido que as segundas, sendo o ciclo celular o principal alvo de tratamento e combate as células tumorais (BRASILEIRO-FILHO, 2006; CASCIATO, 2008).

1.2.1. O CICLO CELULAR

O ciclo celular é o mecanismo básico pelo qual todos os seres vivos são formados, partindo de uma série de eventos de duplicação e divisão de uma célula pré-existente. Apesar de este mecanismo variar de acordo com o tipo de célula e de organismo, certas características são universais, tais como copiar e transferir a informação genética para a próxima geração (ALBERTS *et al.*, 2009).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. Na fase G1, a célula desempenha suas tarefas básicas enquanto produz proteínas e nucleotídeos necessários para a duplicação do DNA. Na fase S, o DNA celular é duplicado, formando cromossomos com cromátides homólogas. Após a duplicação do material genético, as células entram na fase G2, em que a maquinaria celular que estava empenhada na duplicação dos cromossomos adquire um novo aspecto, direcionado para a síntese de componentes do citoesqueleto, que são necessários para a divisão celular e formação das células filhas. Com a estruturação do citoesqueleto voltado para a divisão celular, o ciclo entra na fase M, em que o conteúdo de DNA e as organelas serão divididos durante o processo em que uma célula gera duas idênticas (ALBERTS *et al.*, 2009; SCHAFER, 1998; SCLAFANI e HOLZEN, 2011).

1.2.1.1. CONTROLE DO CICLO CELULAR

O controle do ciclo celular é realizado por um conjunto de proteínas que atuam sequencialmente para que cada etapa ocorra de forma ordenada. Estas proteínas compreendem uma família de proteíno-quinases conhecidas como quinases dependentes de ciclinas (Cdks), específicas para cada etapa do ciclo. As Cdks atuam fosforilando proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os eventos que ocorrem em cada etapa do ciclo. Como o próprio nome indica, as Cdks são ativadas por outras proteínas, as ciclinas, que se ligam as Cdks formando o complexo ciclina-Cdk (ALBERTS *et al.*, 2009; GOLIAS *et al.*, 2004; BLOOM e CROSS, 2007). As ciclinas são expressas e degradadas em etapas específicas do ciclo celular, atuando sobre Cdks específicas de cada etapa. Enquanto as Cdks são expressas constantemente durante todo o ciclo celular, mas tornam-se ativas

apenas na presença da sua ciclina ativadora (ALBERTS *et al.*, 2009; BLOOM e CROSS, 2007).

As CDC25 compreendem um conjunto de três proteínas que desfosforilam o sítio ativo das Cdks, permitindo sua atividade catalítica. Assim, as fosfatases CDC25 exercem papel crítico na regulação do ciclo celular, controlando as atividades das Cdks (LYON *et al.*, 2002). CDC25 A induz a transição da fase G1 para S por desfosforilação das Cdks dos complexos Cdk2/ciclinas E e A (HOFFMANN *et al.*, 1994; BLOMBERG e HOFFMANN, 1999). A CDC25 B atua sobre os complexos Cdk4 e 6/ciclina D, sendo responsável pela transição da fase M para G1, enquanto que a CDC25C atua sobre o complexo Cdk1/ciclina A, sendo necessária para a transição da fase G2 para M (GARNER-HAMRICK e FISHER, 1998; TUROWSKI *et al.*, 2003).

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) são um grupo de proteínas envolvidas nas vias de sinalização que convertem estímulos extracelulares em vias de sinalização intracelular para a mitose. Podem atuar em alvos tanto no citoplasma quanto no núcleo e são divididas em quatro subgrupos: quinases reguladoras de sinais extracelulares (ERKs), proteínas quinases ativadas por estresse ou C-jun e N-terminal (JNK/SAPK), MAPK 1 ligadora ERK (BMK1) e proteínas quinases do grupo p38. Este último grupo é representado por quatro isoformas (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) com rotas fisiológicas e expressões distintas dependendo dos tecidos (ZARUBIN e HAN, 2005; ENSLEN *et al.*, 2000). A via de sinalização das MAPK p38 regula uma variedade de respostas celulares a estresse ambiental, citocinas pró-inflamatórias e lipopolissacarídeos (HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994, ROUSE, *et al.*, 1994).

1.2.1.2. MECANISMOS DE CHECAGEM DO CICLO CELULAR

Se alguma das etapas do ciclo celular não estiver em condições de ocorrer, a progressão é parada por mecanismos de checagem (ALBERTS *et al.*, 2009). Na fase G1, se o ambiente extracelular estiver desfavorável à duplicação celular, tais como privação metabólica, ocorre à inibição da formação do complexo Cdk/ciclinas desta fase, e o ciclo celular não progride para a replicação do DNA. Durante a fase S, eventos que impeçam a replicação do DNA ativam o gene p53, que bloqueia a progressão para G2 (COSETTA *et al.*, 2013). Na fase G2, proteínas promovem o reparo do DNA que pode ter sofrido mutações durante a replicação. Se as mutações

não podem ser reparadas, o ciclo é bloqueado e não ocorre à progressão para a fase M (TAO, *et al.*, 2012; CONLY, 2011). A fase M é checada quanto à correta separação das cromátides e integridade dos cromossomos (ALBERTS *et al.*, 2009). Quando as cromátides não forem corretamente duplicadas na fase S ou os cromossomos pareados se fundem e aderem, os mecanismos de checagem param a fase M, impedindo que as células filhas tenham conteúdos de DNA diferentes (SEAN, *et al.*, 2012; HAYASHI, *et al.*, 2012). Quando a progressão do ciclo celular é inviável, os pontos de checagem são ativados e deflagram uma resposta de morte celular programada, impedindo que a informação genética seja repassada de forma errônea para as células filhas. Este processo de morte celular fisiológico é denominado de apoptose (ALBERTS *et al.*, 2009).

1.2.2. APOPTOSE

A apoptose é um tipo de "auto-destruição celular" que ocorre de forma ordenada. Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode também ser deflagrada por um estímulo patológico (como a lesão ao DNA celular). Para sua execução, o processo de apoptose depende de gasto energético para a ativação e a atividade das caspases, que são proteases endógenas que clivam substratos específicos para o "suicídio celular" (KANDUC, *et al.*, 2002; KUMAR, *et al.*, 2005, ELMORE, 2007; ALBERTS, *et al.*, 2009).

A ativação de caspases compromete a integridade do citoesqueleto, levando a perda na estrutura do arcabouço celular. Em resposta, há contração do volume citoplasmático, na membrana celular formam-se bolhas e o posicionamento de alguns lipídios, como a fosfatidilserina, é alterado. Este lipídio, em células normais, está presente na camada interna da membrana enquanto que em células apoptóticas apresenta-se na camada externa. Esta inversão é um sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação. Durante a apoptose ocorre alterações características no núcleo celular levando à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, formam-se bolhas no citoplasma que separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do

núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos). Os restos celulares são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (KUMAR, *et al.*, 2005).

As caspases estão presentes no citoplasma e já foram descritos em mamíferos 14 membros da família que estão envolvidos no processo de inflamação e apoptose (ALBERTS, *et al.*, 2009; ELMORE, 2007).

Quando ativadas, as caspases ativam outros membros da família e amplificam a cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição inicial na cascata e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspase-3 são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular. Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomos ou ativadas no citoplasma por íons como o cálcio, que têm espectro ubíquo de substratos, as caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura maior seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, na transdução de sinais e na manutenção da integridade da estrutura celular (ALBERTS, *et al.*, 2009; FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007; ELMORE, 2007).

Um dos mecanismos do processo de apoptose é a ativação dos receptores de morte presentes na superfície celular através do acoplamento de seus ligantes específicos. A maior parte dos receptores de morte identificados faz parte da família de receptores do TNF e são classificados assim pela presença, na porção extracelular, de uma sequência de aminoácidos rica em cisteína ("death domain"). Estes receptores transmitem o sinal de morte para o meio intracelular. O receptor Fas (CD95 ou APO-1) é o mais estudado e caracterizado (KUMAR, *et al.*, 2005).

Quando o ligante-Fas se acopla ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando um agregado de cadeias de morte que se liga a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia de morte associada ao Fas. Este por sua vez se liga à pro-caspase-8 resultando na ativação dessa enzima que atua como proteolítica ativando a caspase-3 (FINK E COOKSON, 2005; KUMAR, *et al.*, 2005; ELMORE, 2007).

Além dos receptores de morte, a apoptose pode também ser deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene *p53*), alterações nas vias metabólicas, drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Estímulos que interferem na cadeia respiratória promovem intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que oxidam

proteínas, lipídios e o DNA celular. Os danos promovidos pelo excesso de ROS induzem a ativação das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bid, que uma vez ativadas são translocadas do citosol para a mitocôndria. No interior das mitocôndrias, estas proteínas induzem a liberação para o citosol do citocromo-c (ALBERTS, *et al.*, 2009; KANDUC, *et al.*, 2002; ELMORE, 2007). No citosol, o citocromo-c se associa as proteínas apaf-1 e a pró-caspase-9. Na presença de ATP, a pró-caspase 9 é ativada e convertida em caspase-9, que por sua vez, ativa as pró-caspases-3 e 7, que executam o processo de apoptose. As lesões do DNA celular promovidas por ROS ativam o gene *p53*, que favorece maior expressão da proteína pró-apoptótica Bax o que promove a abertura de poros na membrana mitocondrial. A membrana mitocondrial interna, por apresentar várias pregas, pode acomodar o aumento do volume da matriz, enquanto a membrana externa, que é esférica, se rompe liberando componentes pró-apoptóticos, como o fator indutor da apoptose e o citocromo-c (ELMORE, 2007; MAYER e OBERBAUER, 2003; MIGNOTTE e VAYSSIERE, 2001; WANG, 2001).

1.2.3. TIPOS DE TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS

1.2.3.1 CIRURGIA

A cirurgia pode ser utilizada para diagnosticar, tratar e em alguns casos, ajuda a prevenir o câncer. Assim, a maioria das pessoas com câncer terá algum tipo de cirurgia, nem que seja para remoção de parte da lesão para diagnóstico histopatológico. A remoção cirúrgica de toda a massa tumoral compreende a forma mais eficaz de cura para o câncer, pois, se ainda não ocorreu metástase, permite a remoção de todas as células cancerígenas em um determinado sítio, evitando a recidiva (NIEDERHUBER, 2008; CASCIATO, 2008).

1.2.3.2. RADIOTERAPIA

A radioterapia é um dos tratamentos mais comuns para o câncer, sendo utilizada de forma isolada ou em combinação com outras formas de tratamento. Na radioterapia, um feixe de radiação ionizante é regulado para incidir sobre uma região pré-estabelecida em que se encontram as células cancerígenas. A quantidade de radiação a ser empregada depende do tipo tumoral e do tecido em que irá incidir, pois as células do organismo apresentam sensibilidades diferentes à radiação. O sucesso desta terapia é obtido quando todas as células tumorais são erradicadas

(CONSTINE, *et al.*, 2008; ROSS, 1999; GRUTTERS, *et al.*, 2010; JONES, 2001). A radioterapia pode ser utilizada também como suporte a quimioterapia ou a cirurgia para excisão da massa tumoral. O princípio de ação da radioterapia parte de que as ondas eletromagnéticas aplicadas aos tecidos possuem grande quantidade de energia, promovendo a ionização de moléculas intracelulares, como a água e as cadeias de DNA (CONSTINE, *et al.*, 2008; ROSS, 1999). Um efeito importante da radiação, de relevância clínica para a radioterapia, é a indução da morte celular por falência reprodutiva ou morte clonogênica, que se caracteriza pela perda da capacidade de divisão celular. Neste caso, a célula irradiada permanece morfológicamente íntegra, às vezes conseguindo até processar algumas divisões, mas perde a capacidade de dividir-se inúmeras vezes ao longo da vida, como ocorreria em outra célula normal do mesmo tecido. Considerando o ciclo celular, a fase de divisão celular ou mitose (M), é extremamente sensível à radiação, pois existe grande possibilidade de que os danos provocados pela radiação fiquem permanentemente no DNA, provocando aberrações cromossômicas e morte celular (LOWE e LIN, 2000). Isso, pois a grande compactação da cromatina durante a mitose torna as lesões inacessíveis às enzimas reparadoras. Quando os danos sofridos pelo DNA são identificados e o sistema de reparo não os consegue recuperar, é deflagrado um sinal de morte celular que culmina na célula em apoptose, pela ativação de caspases (ALBERTS, *et al.*, 2009).

1.2.3.3. TERAPIA-ALVO

A terapia-alvo é um novo tipo de tratamento para o câncer, que tem crescido muito nos últimos anos. Utiliza-se drogas ou outras substâncias para identificar e eliminar com precisão às células cancerígenas, provocando poucos danos às células normais. Surgiu com as mais recentes investigações sobre os perfis genéticos das células cancerígenas, identificando genes e proteínas-alvos que controlam o processo de cancerogênese. Assim, na terapia-alvo, aplica-se o medicamento que interfere diretamente sobre as células cancerígenas, minimizando os impactos sobre as células normais. Dependendo do tipo de câncer e do seu estágio, esta terapia pode ser utilizada para obtenção da cura completa do câncer, para retardar a evolução do câncer, para matar as células cancerosas que podem ter sofrido metástase ou para aliviar os sintomas e aumentar a sobrevida dos pacientes. A terapia-alvo pode ser usada como tratamento isolado ou associada a outra forma de

terapia, a depender do tipo de câncer (CASCIATO, 2008; STEGMEIER, *et al.*, 2010; SAWYERS, 2004).

Os principais estímulos para a cancerogênese são oncogenes envolvidos na expressão de enzimas que aumentam a proliferação celular, que inibem a apoptose ou que promovem angiogênese (CHIAL, 2008; BILD *et al.*, 2006). Os principais agentes de terapias-alvo atuam como inibidores enzimáticos, bloqueando a atividade de enzimas necessárias para a sobrevivência das células cancerígenas. Atuando sobre estas enzimas, é possível inibir a metástase e controlar a progressão do câncer, melhorando o prognóstico dos pacientes. Os principais agentes desta classe atuam como inibidores de: tirosina quinase, proteassoma, fator de crescimento, transdução de sinal e multiquinase (BILD *et al.*, 2006; STEGMEIER, *et al.*, 2010; SAWYERS, 2004).

Diferente dos antineoplásicos não-alvos e da radioterapia, os agentes da terapia-alvo que induzem apoptose atuam diretamente sobre proteínas específicas do interior das células cancerígenas, sendo denominados de fármacos indutores de apoptose. Atuam diretamente sobre os oncogenes que inibem a apoptose, bloqueando a atividade dos mesmos e levando as células cancerígenas a apoptose (BILD *et al.*, 2006, SAWYERS, 2004).

O outro foco de atuação das terapias-alvo é sobre a angiogênese que desenvolve para a manutenção da viabilidade da massa tumoral e contribui para a metástase. Os agentes que atuam sobre a angiogênese bloqueiam os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), sendo estes fatores os responsáveis pela indução da formação de novos vasos em torno da massa tumoral. Ao inibir a formação de novos vasos, o aporte de nutrientes no tumor é reduzido e as células cancerígenas reduzem a taxa de proliferação ou entram em necrose (STEGMEIER, *et al.*, 2010; SAWYERS, 2004).

Alguns exemplos de medicamentos que atuam na terapia-alvo são:

- Gleevec (mesilato de imatinib), sendo aplicado para a terapia específica de tumor estromal gastrintestinal e alguns tipos de leucemias. Atua como um inibidor da tirosina quinase, bloqueando o crescimento das células cancerígenas (DRUKER, 2002; VERWEIJ *et al.*, 2003).
- Iressa (gefitinib) é usado no tratamento do câncer de pulmão de células não-pequenas em estágio avançado. Este fármaco tem como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), encontrado na superfície de muitas células

normais, mas certas células cancerígenas os expressam em grande quantidade. O EGFR traduz um sinal interno que induz a proliferação celular. Assim, o gefitinib atua retardando o crescimento das células cancerígenas, aumentando a sobrevida dos pacientes (THATCHER *et al.*, 2005; CIARDIELLO, *et al.*, 2000).

- Sutent (sunitinib) é usado para tratar o câncer renal avançado e alguns tumores estromais gastrointestinais. É considerado um inibidor multiquinase, atuando sobre VEGF e a enzima tirosina quinase, retardando o crescimento do tumor e a metástase (CHOUHAN, *et al.* 2007, SHUKLA *et al.*, 2009).
- Velcade (bortezomib) é um inibidor enzimático do proteassoma e utilizado no tratamento do mieloma múltiplo que não responde a outros tratamentos. Atua interrompendo o funcionamento do proteassoma, evitando a destruição de proteínas que são utilizadas para regular o ciclo celular. Com isto, o ciclo celular para e as células cancerígenas entram em apoptose (ADAMS e KAUFFMAN, 2004).

1.2.3.4. IMUNOTERAPIA

A imunoterapia é utilizada para ajudar a tratar o câncer, e pode ser realizada de duas formas: estimulando o próprio sistema imunológico a reagir com as células cancerígenas ou fornecer ao organismo componentes do sistema imunológico produzidos de modo artificial (CASCIATO, 2008; ROSENBERG, *et al.*, 2004; BLATTMAN e GREENBERG, 2004).

Os principais tipos de imunoterapia incluem:

- **Anticorpos humanizados:** São versões artificiais de anticorpos projetados para se ligarem a antígenos encontrados nas células cancerígenas. São úteis para o tratamento do câncer, pois difundem para todo o organismo e reagem diretamente com as células cancerígenas, inibindo a proliferação e induzindo apoptose. Os anticorpos antitumorais podem atuar diretamente ou serem conjugados a agentes radioativos ou quimioterápicos, servindo como meio de entrega destes agentes para as células cancerígenas (WEINER, *et al.*, 2010). O Alemtuzumab é um anticorpo monoclonal que atua sozinho, sendo usado para tratar alguns pacientes com leucemia linfocítica crônica. Ele se liga ao antígeno CD52, marcando os linfócitos cancerígenos para serem destruídos pelo sistema imunológico (LUNDIN, 2002). Outro anticorpo antineoplásico que atua sozinho é o Trastuzumab, direcionado a proteína HER2. Em alguns tipos de câncer, tais como os de mama e estômago, as células têm grandes quantidades desta proteína na sua superfície, estimulando a

proliferação celular. O Trastuzumab liga-se a essas proteínas e as impede de se tornarem ativas, inibindo a proliferação celular (VOGEL, *et al.*, 2002; VU, 2012). O Ibritumomab tiuxetan é um exemplo de um anticorpo monoclonal marcado radioativamente. Ele é direcionado ao antígeno CD20, encontrado em linfócitos B, sendo utilizado no tratamento de alguns tipos de linfoma não-Hodgkin (WITZIG, *et al.*, 2002). Para o tratamento do linfoma de Hodgkin utiliza-se o Vedotin brentuximab, um anticorpo que tem como alvo o antígeno CD30. Ele é acoplado ao agente quimioterápico monometil auristatina E (NEWLAND, *et al.*, 2013).

- **Vacinas contra o câncer:** Induzem a geração de uma resposta imunológica para reagir com as células cancerígenas. Algumas vacinas atuam na prevenção, enquanto que outras atuam diretamente no tratamento do câncer. Alguns tipos de câncer são causados por vírus, assim vacinas que ajudam a proteger contra estes vírus também ajudam a prevenir os respectivos tipos de câncer. Por exemplo, algumas cepas do papiloma vírus humano (HPV) são associados a câncer cervical, anal e de garganta e as vacinas contra o HPV ajudam a proteger destes tipos de câncer. Infecções crônicas pelo vírus da hepatite B (HBV) estão relacionadas a câncer hepático. As vacinas contra o HBV reduzem o risco de contrair esta virose, prevenindo também o desenvolvimento de câncer hepático. As vacinas para o tratamento do câncer estimulam o sistema imunológico a montar uma resposta direta contra as células cancerígenas e atuam assim no tratamento direto do câncer (ROSENBERG, *et al.*, 2004; BLATTMAN e GREENBERG, 2004; WANG e ROSENBERG, 1999). A vacina Sipuleucel-T é a única vacina aprovada até agora nos Estados Unidos para o tratamento de câncer. É usada para tratar o câncer de próstata avançado que não responde a terapia hormonal. Para a produção desta vacina, células do sistema imunológico são extraídas do sangue do paciente e induzidas *in vitro* a se diferenciarem em células dendríticas, que são expostas a proteína fosfatase ácida prostática (PAP). Quando devolvidas ao corpo do paciente, estas células induzem uma resposta imunológica contra o câncer de próstata (CHEEVER e HIGANO, 2011).

1.2.3.5. TERAPIA FOTODINÂMICA

Na terapia fotodinâmica (PDT) utilizam-se medicamentos especiais denominados agentes fotossensibilizantes, que são convertidos em princípios ativos na presença da luz. Outros sinônimos para PDT são terapia de fotorradiação,

fototerapia ou fotoquimioterapia. Para o tratamento, o agente fotossensibilizante é administrado sistemicamente, sendo carregado pela corrente sanguínea e absorvido pelas células. Em seguida, aplica-se a frequência específica de luz, que converte o agente para sua forma ativa que consegue matar as células cancerígenas. Como a ação da luz é local, outras regiões do organismo são poupadas. O período de tempo entre o momento em que a droga é administrada até a aplicação da luz é chamado intervalo de fármaco-para-luz. Estudos mais recentes apontam que a PDT pode funcionar melhor que à cirurgia ou a radioterapia no tratamento de certos tipos de cânceres e pré-cânceres de pele e esôfago. Isto, pois, não apresentam efeitos colaterais em longo prazo, é menos invasiva do que a cirurgia e ao contrário da radiação, pode ser repetida muitas vezes no mesmo sítio deixando pouca ou nenhuma cicatriz e muitas vezes, custa menos do que outros tratamentos de câncer. No entanto, esta terapia se limita a tratamentos de áreas onde é possível a irradiação com a luz. Isto significa que é utilizado principalmente no tratamento de problemas na ou sob a pele, ou no revestimento de órgãos que podem ser alcançados com a fonte de luz, como alguns que compõem os sistemas respiratórios e digestório (BROWN, *et al.*, 2004; HOPPER, 2000; ORTEL, *et al.*, 2009; WANG, *et al.*, 2012).

O porfímero de sódio é o fotossensibilizador mais amplamente utilizado e estudado, sendo ativado por um feixe de laser vermelho, sendo aprovado para o tratamento do câncer do esôfago e um tipo de câncer de pulmão de células não pequenas que afeta o revestimento dos brônquios (ETHIRAJAN , *et al.*, 2011).

1.2.3.6. QUIMIOTERAPIA

Na quimioterapia são aplicados medicamentos que atuam nas células cancerígenas, induzindo efeitos citotóxicos que inibem a proliferação celular e induzem apoptose. A quimioterapia é aplicada principalmente quando a remoção cirúrgica não consegue eliminar todas as células cancerígenas. O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos (FUCHS e WANNMACHER, 2010). A partir da publicação, em 1946, dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com

leucemias, verificou-se um avanço crescente no tratamento do câncer. O conhecimento acerca do funcionamento da maquinaria celular abriu o leque de opções a serem exploradas para a busca de novas drogas antineoplásicas. A maioria dos agentes utilizados atualmente no tratamento do câncer afetam diretamente o DNA celular. Assim, promovem danos tanto as células normais como as neoplásicas, porém, acarretam maiores danos a estas últimas, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos e ao ciclo de divisões celulares dessas células (LEEN, *et al.*, 2005). Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antineoplásicos, os inibidores mitóticos e outros (FUCHS e WANNMACHER, 2010).

A melhor compreensão do ciclo celular normal levou a definição dos mecanismos de ação da maioria das drogas. A partir dessa definição que Bruce e Lin (BRUCE e LIN, 1969) classificaram os quimioterápicos conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em:

- **Ciclo-inespecíficos** - Aqueles que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, como, por exemplo, a mostarda nitrogenada.
- **Ciclo-específicos** - Os quimioterápicos que atuam somente nas células que se encontram em proliferação, como é o caso da ciclofosfamida.
- **Fase-específicos** - Aqueles que atuam em determinadas fases do ciclo celular, como, por exemplo, o metotrexato (fase S), o etoposídeo (fase G2) e a vincristina (fase M).

1.2.3.6.1. ANTIMETABÓLICOS

Os antimetabólicos afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo, impedem a multiplicação e função normais da célula. Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas (como é a ação dos quimioterápicos 6-mercaptopurina e 6-tioguanina), à produção de ácido timidílico (5-fluoruracil e metotrexato) e a outras etapas da síntese de ácidos nucleicos (citosina-arabinosídeo C). Estas drogas são particularmente ativas contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular (fase S). A duração da vida das células tumorais suscetíveis determina a média de destruição destas células, as quais são impedidas de entrar em mitose pela ação dos agentes

metabólicos que atuam na fase S (FUCHS e WANNMACHER, 2010; ALMEIDA, 2005).

1.2.3.6.2. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos antineoplásicos são um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Apesar de apresentarem tal variação, possuem em comum, anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos. Podem apresentar outro grupo funcional que lhes acrescentam novos mecanismos de ação, como alquilação (mitomicina C), inibição enzimática (actinomicina D e mitramicina) ou inibição da função do DNA por intercalação (bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D e adriamicina e seus análogos mitroxantona e epirrubicina). Como todos os quimioterápicos, os antibióticos atuam tanto sobre as células normais como sobre as malignas. Por isso, também apresentam efeitos colaterais indesejáveis (CASCIATO, 2008; FUCHS e WANNMACHER, 2010).

1.2.3.6.3. INIBIDORES MITÓTICOS

Os inibidores mitóticos paralisam a mitose na metáfase, atuando sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos. Deste modo, os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo à interrupção da divisão celular. Esta função tem sido útil na "sincronização" da divisão das células quando os inibidores mitóticos são combinados com agentes específicos da fase S do ciclo. Devido ao seu modo de ação específico, os inibidores mitóticos devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia (ALMEIDA, 2005). Neste grupo de drogas estão incluídos os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina e vindesina) e os derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposídeo; e o VM-26, teniposídeo) (CASCIATO, 2008; FUCHS e WANNMACHER, 2010).

Algumas drogas não podem ser agrupadas em uma determinada classe de ação farmacológica (BRUCE e LIN, 1969). Entre elas, destacam-se a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado, sarcomas de partes moles e linfomas; a procarbazina, cujo mecanismo de ação não foi ainda completamente

explicado, e que é utilizada no tratamento da doença de Hodgkin; a L-asparaginase, que hidrolisa a L-asparagina e impede a síntese protéica, utilizada no tratamento da leucemia linfocítica aguda (CASCIATO, 2008; FUCHS e WANNMACHER, 2010).

1.2.3.6.4. ALQUILANTES

Os compostos alquilantes substituem em molécula próximas um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Quando ligam ao DNA, impedem a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico (KOSTOVA, 2006). Apesar de efetivos como agentes isolados para inúmeras formas de câncer, eles raramente produzem efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes fase-específicos do ciclo celular. As principais drogas alquilantes incluem a mostarda nitrogenada, a mostarda fenil-alanina, a ciclofosfamida, o bussulfam, as nitrosuréias, a cisplatina e o seu análogo carboplatina e a ifosfamida (BRUCE e LIN, 1969; ALMEIDA, 2005).

A cisplatina promove ligações cruzadas com o DNA e foi um dos primeiros alquilantes empregados no tratamento do câncer. Este alquilante também é classificado como um complexo de coordenação de platina por possuir um íon de platina acoplado a um ligante. Assim, complexos de coordenação são aqueles que possuem moléculas orgânicas (ligantes) acoplados a íons metálicos. Essa interação ligante-metal é importante, pois os ligantes potencializam ou inibem os efeitos tóxicos dos metais (BAKHTIAR e OCHIAI, 1999).

1.3. COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE

O cobre é um metal que desempenha papel importante em vários organismos microbianos, plantas e seres humanos. Este metal apresenta-se como constituinte de proteínas como a citocromo C oxidase (CCO), que participa da cadeia respiratória mitocondrial e conseqüentemente da formação de ATP, e a cobre zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), que atua na resposta de defesa antioxidante, entre outras funções (KIM, *et al.* 2008). As proteínas utilizam da natureza redox do cobre para realizarem mais facilmente reações de transferência de elétrons. Esta propriedade química deste metal é também potencialmente tóxica uma vez que estas reações redox podem gerar radicais hidroxila que podem resultar em danos a lipídios de membrana, proteínas e DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). Apesar do teor

médio de cobre no corpo humano estar em torno de 100,0mg, dificilmente este metal é encontrado livre na célula (RAE, *et al.*, 1999).

A química inorgânica medicinal busca explorar as propriedades únicas de íons metálicos para a concepção de novos medicamentos. No desenvolvimento de metalofármacos, as moléculas orgânicas (ligantes) apresentam papel importante, uma vez que podem limitar os efeitos tóxicos dos metais e potencializar suas propriedades terapêuticas. Ligantes sintéticos planejados para obtenção de complexos de coordenação podem permitir a obtenção de novos agentes terapêuticos (STORR, *et al.*, 2006; BRUIJNINCX e SADLER; 2008).

Após a descoberta da cisplatina, muitas pesquisas foram desenvolvidas para a síntese de novos ligantes e investigação das atividades biológicas dos complexos formados com os ligantes e os metais (BAKHTIAR e OCHIAI, 1999; JONES e THORNBACK, 2007).

O grupo de pesquisa em Química Bioorganica da Universidade Estadual do Norte Fluminense tem investigado a síntese e atividade biológica de complexos metálicos com atividade antitumoral. Uma das pesquisas, desenvolvida por Bull (2008), investigou a atividade antineoplásica de dois compostos orgânicos, um contendo piridina em sua estrutura (BMPA) e outro apresentando uma piridina e um fenol em sua estrutura (HBPA). Em seu trabalho, Bull verificou que os compostos de coordenação de cobre obtidos a partir do BMPA e HBPA, além de apresentarem maior atividade biológica do que os seus respectivos ligantes, mantiveram a característica dos ligantes de partida induzindo morte celular por apoptose em células de origem leucêmicas humanas (U-937 e THP-1).

Em outro trabalho desenvolvido por Figueredo (2012), investigou-se a síntese e atividade antitumoral *in vitro* de oito complexos de coordenação de cobre e seus respectivos ligantes. Os resultados deste trabalho estão apresentados resumidamente a seguir e deram suporte para a continuidade dos estudos *in vivo* para investigar o potencial antineoplásico do composto mais ativo, abordado nesta tese de doutorado.

Em seu trabalho, Figueredo (2012) avaliou o potencial de oito complexos de coordenação de cobre e seus respectivos ligantes na redução da viabilidade das células tumorais de origem leucêmica THP1 e U937. Dentre os compostos testados, o complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ foi o mais ativo, exibindo um IC_{50} de 13,85 μM para as células U937 e 11,06 μM para as células THP1. Estes resultados foram duas

vezes (para as células U937) e três vezes (para as células THP1) menores que os exibidos pela cisplatina, o complexo de coordenação escolhido como controle positivo.

Quando os complexos foram testados em células normais do sangue eriférico humano (PBMC), os valores de IC_{50} foram superiores aos obtidos para as células tumorais, indicando que num tratamento conjunto, a concentração necessária dos complexos para reduzir a viabilidade das células tumorais não interfere na viabilidade das células humanas normais, sugerindo uma baixa toxicidade e abrindo perspectivas para a continuidade dos testes.

O mecanismo de morte celular induzido pelo complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ também foi investigado por Figueredo (2012) em células U937 e THP1, sendo o complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ capaz de induzir apoptose em ambas às linhagens celulares, onde as células U937 foram mais sensíveis que as células THP1. As análises do ciclo celular destas células quando tratadas com o complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ indicam que após o tempo de tratamento de 36 horas 86,9% das células apresentavam conteúdo de DNA correspondendo ao período Sub-G1 em que se encontram as células em apoptose. As células THP1 tratadas exibiram 74,08% de conteúdo em Sub-G1, confirmando a capacidade indutora de apoptose deste complexo.

1.4. QUINONAS E QUINOLINAS

Dentre as moléculas mais pesquisadas para o tratamento do câncer destacam-se os derivados das quinonas. Essas moléculas são isômeros de posição da ciclohexanodiona e possuem a fórmula molecular $C_6H_4O_2$ e nomes *orto*-benzoquinona (benzoquin-1,2-ona) e a *para*-benzoquinona (benzoquin-1,4-ona). As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. As orto-quinonas metídios estão presentes numa grande variedade de compostos bioativos que têm sido objeto de interesse durante muitos anos. Estes compostos têm sido estudados para atividades antitumorais, leischmanicida, anti-inflamatória, antifúngica e tripanomicida (MARSIK, *et al.*, 2005).

A quinolina ou 1-azanaphthalene é um composto aromático azotado caracterizado por uma dupla estrutura que contém um anel de benzeno fundido a uma piridina em dois átomos de carbono adjacentes. A isoquinolina difere da quinolina pela posição do heteroátomo que na primeira molécula está presente na

posição 2. Ambos os compostos são muito empregados na indústria farmacêutica como estruturas orgânicas bases para a síntese de fármacos e na modelagem e aprimoramento de compostos já existentes (SEDIC, *et al.*, 2008).

A quinaldina ou 2-metilquinolina é utilizada como um antimalárico e está sendo testada como suporte para a produção de antimaláricos mais potentes. A quinazolina é utilizada como intermediário para a produção de alguns anti-hipertensivos periféricos, como o prazosin e doxazosina. Já as quinoxalinas são intermediárias na síntese de fungicidas. A síntese de outras drogas importantes também passa pela estrutura básica das isoquinolinas, como é feito para a obtenção da morfina. A atividade destes compostos sugere uma ação na via das quinases celulares, mas ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos de ação (SEDIC, *et al.*, 2008).

O Lapachol é uma naftoquinona de conhecida atividade biológica. Os primeiros relatos científicos da atividade antitumoral do Lapachol datam de 1974, quando um estudo mostrou a atividade antitumoral contra tumores de ratos. Em 1978, foi feito um teste clínico com 9 pacientes com vários tipos de cânceres e o Lapachol exibiu efeito antitumoral considerável, reduzindo os tumores e as dores sentidas por todos os pacientes. Porém, estudos clínicos posteriores mostraram que entre os efeitos colaterais existe um potencial teratogênico e sobre o sistema de coagulação sanguínea, levando a interrupção das pesquisas (SAID, *et al.*, 2003; HUSSAIN, *et al.*, 2007).

Atualmente, as drogas utilizadas no tratamento do câncer apresentam efeitos colaterais superiores aos relatados na década de 70 para o Lapachol, levando diversos grupos de pesquisa a retomarem as investigações sobre o potencial farmacológico dessa quinona (SAID, *et al.*, 2003; HUSSAIN, *et al.*, 2007). No entanto, os principais entraves nas terapias com Lapachol é a obtenção de concentrações plasmáticas terapêuticas, pois essa quinona possui baixa solubilidade em pH fisiológico. Apesar de bem tolerado, as doses administradas são elevadas e as concentrações plasmáticas são baixas (SAID, *et al.*, 2003). Portanto, cabe buscar novos veículos para administração do Lapachol, que permitam a obtenção de concentrações plasmáticas mais elevadas.

As isoquinolino quinonas são metabólitos secundários encontrados principalmente em organismos de vida marinhas, sendo isolados principalmente de algas unicelulares, poríferos, celenterados e moluscos. Das algas marinhas

unicelulares do gênero *Streptomyces*, foram isoladas cinco isoquinolino quinonas, sendo quatro inéditas (mansouramicinas A-D) e a não inédita 3-metil-7-(metilamino)-5,8-isoquinolinediona. Todas as cinco moléculas isoladas destas algas apresentaram perfil de citotoxicidade significativo contra 36 linhagens de células tumorais, com destaque para os efeitos seletivos em células de câncer de pulmão de células não-pequenas, câncer de mama, melanoma e câncer de próstata, com valores de IC₅₀ entre 0,008 e 0,02μM (HAWAS, *et al.*, 2009). A jorumicina é uma isoquinolino quinona isolada do muco e da pele do molusco *Jorunna funebris*, coletado do oceano Pacífico. Este alcaloide demonstrou potencial citotóxico contra várias linhagens de células tumorais humanas, com IC₅₀ de 12,5 ng/mL (FONTANA, *et al.*, 2000). Dentre os organismos marinhos, são das esponjas que se isolam as maiores variedades de isoquinolino quinonas. Das frações de esponjas filipinas do gênero *Petrosia* foram isoladas três isoquinolino quinonas: cribrostatina 7, renierone e O-demetilrenierona, sendo todas citotóxicas contra a linhagem celular HCT 116, de câncer de colon humano, com valores de IC₅₀ entre 45,0μg/mL e 24,0μg/mL (SANDOVAL, *et al.*, 2004). De esponjas marinhas do gênero *Cribrochalina* foram isoladas as isoquinolino quinonas cribrostatins 1 e 2, que demonstraram efeitos citotóxicos contra a linhagem celular leucêmica P388 com IC₅₀ de 1,58μg/mL e 2,73μg/mL, respectivamente (PETTIT, *et al.*, 1992). Dos extratos das esponjas do gênero *Xestospongia*, Edrada e colaboradores (1996) identificaram quatro isoquinolino quinonas: a inédita N-(3-oxo-1-butenil) derivada da renierone e as não inéditas 1,6-dimetil-7-metoxi-5,8-di-hidroisoquinolina-5,8-diona, renierone e mimosamicina. As investigações do potencial biológico destas quatro isoquinolino quinonas concluíram que todas as quatro apresentaram atividade antibacterianas contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. A mimosamicina também apresentou atividade antifúngica em testes contra o fungo *Cladosporium cucumerinum* e 1,6-dimetil-7-metoxi-5,8-dihidroisoquinolina-5,8-diona foi ativa como inseticida contra larvas de *Spodoptera littoralis*. Dos briozoários *Membranipora perfragilis* foram isoladas as perfragilinas A e B, que foram altamente citotóxicas contra a linhagem leucêmica P388 com IC₅₀ de 0,8μg/mL e 0,07μg/mL, respectivamente (CHOI, *et al.*, 1993).

1.4.1. CAULIBUGULONAS SINTÉTICAS

No mesmo ano em que foram isoladas, surgiram duas rotas que permitiram a obtenção sintética das cinco caulibugulonas A-E. Ambas partem do composto intermediário 5,8-dimetoxiisouquinolina, disponível para comercialização. A primeira rota, descrita por Alagille em 2004, descreve a obtenção das quatro caulibugulonas A-D. Partindo de quatro reações químicas, foram obtidas as duas caulibugulonas A e D, com rendimentos finais de 74,0% e 50,0% respectivamente. O tratamento da caulibugulona A com N-bromossuccinimida ou N-clorosuccinimida, forneceu as caulibugulonas B e C com rendimentos de 97,0% e 94,0%, respectivamente. A segunda rota forneceu a síntese das caulibugulonas A-E, sendo que as caulibugulonas A e D foram sintetizadas a partir da oxidação do intermediário 5-hidroxiisouquinolina por iodobenzeno bis(trifluoroacetato) e subsequente adição *in situ* dos radicais metilamina (caulibugulona A) e 2-aminoetanol (caulibugulona D). As caulibugulonas B e C foram obtidas a partir da halogenação da caulibugulona A por n-bromosuccinimide e n-clorosuccinimide, respectivamente, seguindo a mesma rota proposta por Alagille (2004). Para a obtenção da caulibugulona E, a caulibugulona A foi tratada com amônia na presença de $Ti(O-iPr)_4$. Os rendimentos das reações para a obtenção das caulibugulonas A, B, C e E foram respectivamente de 51,0%, 74,0%, 82,0% e 74,0%, sendo a caulibugulona D obtida em baixo rendimento (WIPF, *et al.*, 2004). Recentemente foi proposta uma nova rota de síntese para a obtenção das caulibugulonas A-D, partindo das oxidações e halogenações com n-haloimidias adequadas do composto 5,8-Dimethoxiisouquinoline, permitindo em dois passos a obtenção das caulibugulonas A, B, C e D com rendimentos de 55,0%, 35,0%, 68,0% e 29,0%, respectivamente (NACIUK, *et al.*, 2013).

1.4.2. EFEITOS BIOLÓGICOS DAS CAULIBUGULONAS

Os estudos para investigação dos mecanismos de ação das caulibugulonas iniciaram com testes em fosfatases CDC25, responsáveis pela progressão do ciclo celular. *In vitro*, as caulibugulonas sintéticas A-E exibiram capacidade de inibir diretamente a atividade da fosfatase CDC25B, atuando de modo seletivo quando comparado com outras fosfatases não relacionadas com a progressão do ciclo celular (WIPF, *et al.*, 2004; BRISSON, *et al.*, 2007). Células cancerígenas tratadas com a caulibugulona A exibem elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estas atuam sobre a ciclina CDC25B, inativando irreversivelmente esta enzima. Consequentemente, o ciclo celular para em G1 e G2/M.

Interessantemente, células tratadas com a caulibugulona A apresentaram inativação da ciclina CDC25A independente da geração de ROS, degradação por proteassoma ou inativação por Cdk. Esta inativação ocorre pela atuação direta da caulibugulona A sobre a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38), que promove a inativação da CDC25A, parando também a progressão do ciclo celular (BRISSON, *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVAS

O número de novos casos de câncer tem aumentado nos últimos anos, bem como o número de óbitos associados a esta doença. Estima-se que o câncer seja responsável por 25% de todas as mortes associadas a doenças no ano de 2014 e as projeções para as duas próximas décadas apontam um crescimento de 63% no número de novos casos e de mortes associadas ao câncer. Mesmo com os avanços na terapia antineoplásica, o câncer continua provocando grande impacto econômico, pois, associados ao câncer surgem também outras doenças que impossibilitam o trabalhador de exercer suas atividades e mesmo após o tratamento, alguns pacientes podem ficar mutilados, e impossibilitados permanentemente de terem uma vida normal.

Muitos avanços têm surgido nos últimos anos para o combate ao câncer, desde formas precoces de diagnóstico até terapias com medicamentos alvo e vacinas, que são mais eficazes. Porém, as novas descobertas são restritas a alguns tipos de cânceres, possuem custos muito elevados e em sua grande maioria não curam a doença, apenas aumentam a expectativa de vida do paciente. Outro problema para o tratamento do câncer está na aceitação pelo paciente do tratamento imposto, pois a maioria das drogas antineoplásicas são muito agressivas, promovendo diversos efeitos colaterais e colocando inclusive, a vida dos pacientes em risco. Quedas de cabelos, degeneração da mucosa do trato digestivo, vasculites, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade figuram entre os efeitos colaterais que tornam as atuais terapias muito penosas. Neste sentido, a descoberta de drogas que possam atuar seletivamente sobre células tumorais, levando-as a morte e promovendo poucos efeitos colaterais, tem sido preconizada.

Por se tratar de uma doença de grande impacto, busca por fármacos antineoplásicos novos e mais eficientes torna-se cada vez mais importante. Só no Brasil, a indústria farmacêutica movimentou em 2008 mais de 10,0 bilhões de reais

com medicamentos para o tratamento de diversas doenças. Dentro do cenário mundial, o Brasil é o sétimo país que mais consome medicamentos, apresentando uma tendência cada vez maior de aumentar esse consumo. Porém, pouco do lucro obtido pelas indústrias farmacêuticas fica no Brasil, uma vez que a maioria das drogas é sintetizada por laboratórios multinacionais. Assim, pesquisas com investimentos nacionais que busquem novas drogas têm um grande valor econômico, pois a descoberta de drogas feitas por pesquisadores brasileiros tenderia a fortalecer a indústria nacional.

As caulibugulonas são isoquinolino quinonas isoladas do briozoário marinho *Caulibugula intermis*. Este animal habita as profundezas do Oceano Indo-Pacífico, o que dificulta a obtenção destas moléculas. Pesquisas iniciadas na UENF levaram a identificação de uma rota inédita para a síntese das caulibugulonas A-D com um alto grau de rendimento, justificando a continuidade dos testes biológicos com estas moléculas, a fim de confirmar a potencialidade antineoplásica.

Outro grupo de pesquisa da UENF tem investido na síntese de complexo de coordenação de cobre, na tentativa de obter moléculas que assim como a cisplatina, um complexo de coordenação de platina, tenham atividade antineoplásica. O complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ exibiu efeito citotóxico *in vitro*, com capacidade indutora de apoptose em células cancerígenas. Estes resultados *in vitro* justificam a continuidade dos testes em modelos murinos de câncer, buscando investigar o potencial terapêutico deste complexo de coordenação de cobre para o tratamento do câncer.

3. CAPÍTULO 1: POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO *IN VITRO* DA CAULIBUGULONA A

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar *in vitro* em células de linhagens tumorais humanas o mecanismo de morte celular induzido pela caulibugulona A.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a via de indução de morte celular ativada pelo tratamento de células tumorais humanas da linhagem U937 com a caulibugulona A.

- Determinar os mecanismos de ação responsável pelos efeitos citotóxicos induzidos em células tumorais humanas da linhagem U937 pela caulibugulona A.

3.2. METODOLOGIAS

3.2.1. REAGENTES

Os meios de cultivo celular RPMI e DMEM-F12 e seus suplementos soro fetal bovino (FSB) e Gentamicina foram adquiridos da Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). O Ficoll-Paque Plus utilizado no fracionamento celular do sangue periférico foi adquirido da GE Healthcare Bio-Sciences (Björkgatan, Uppsala, Suécia). Os reagentes Dimetilsulfóxido (DMSO), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 2,7-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), Enterotoxina B *Staphylococcica* (SEB), N-Acetil-L-cisteína (NAC), 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilimidacarbocianina iodeto, 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina iodeto (JC-1), VDVAD-pNA, DEVD-pNA, Ac-LEVD-pNa, IETD-pNA, LEHD-pNA, Laranja de Acridina (AO), Brometo de Etídeo (EB) e o Kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC/PI foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As caulibugulonas A-D foram cedidas gentilmente pelo prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda (Unicamp-SP).

3.2.2. PREPARAÇÃO DAS CAULIBUGULONAS A-D

As quatro caulibugulonas A-D foram sintetizadas como descritas por NACIUK (2013). Estes compostos foram dissolvidos em DMSO para obtenção de uma solução estoque de 16,0mg/mL.

3.2.3. LINHAGENS CELULARES TUMORAIS E CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (PBMCS)

As células tumorais U937 (linfoma histiocítico humano), MOLT4 (leucemia linfoblástica aguda humana), H460 (carcinoma pulmonar de células grandes humanas) e COLO205 (adenocarcinoma coloretal humano) foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas *in vitro* em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 20,0µg/ml de gentamicina e 10,0% de soro fetal bovino em garrafas de cultura de 40,0ml e mantidas em estufa a 37,0° C, com 5,0% de CO₂ e umidade controlada.

As PBMCs foram obtidas de amostras de sangue periférico de doadores saudáveis, não usuários de drogas ou fumantes. As amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante EDTA e as PBMCs foram separadas pelo método de centrifugação com gradiente de densidade de Ficoll-Paque Plus. As PBMC foram lavadas e ressuspendidas em meio de cultivo celular RPMI 1640 suplementado com 10,0% de FBS, 20,0µg/mL de gentamicina e estimuladas com 0,25µg/mL de enterotoxina B staphylococcica (SEB).

3.2.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Para isso, as células foram cultivadas em meio de cultivo celular com ou sem NAC (5,0 mM), sendo mantidas em placas de cultivo celular de 96 poços ($1,0 \times 10^5$ células/poço) e tratadas com as quatro caulibugulonas A-D nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0µg/mL, DMSO (controle positivo de viabilidade) e triton 1X (controle negativo de viabilidade) por 48h. Uma solução de MTT (5,0 mg/mL) foi adicionada em cada poço e após 4h de incubação, os cristais de formazan que se formaram foram solubilizados em 120,0µL de isopropanol. A absorbância foi mensurada em um leitor de ELISA a 570nm, sendo a taxa de viabilidade celular calculada conforme a fórmula:

$$\text{TVC} = \frac{(\text{MDOT} - \text{MDOCN}) \times 100}{\text{MDOCP} - \text{MDOCN}}$$

Onde que:

TVC = Taxa de Viabilidade Celular

MDOT = Média das Densidades Ópticas de Cada Teste

MDOCN = Média das Densidades Ópticas do Controle Negativo

MDOCP = Média das Densidades Ópticas do Controle Positivo

Os valores das taxas de viabilidades foram aplicados ao software GraphPad Prism V5.0 para a obtenção da concentração das quatro caulibugulonas A-D necessárias para inibir o crescimento de 50% das células (valor de IC₅₀).

3.2.5. OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Células da linhagem U937 foram colocadas em placas de cultivo celular de 96 poços ($1,0 \times 10^5$ células/poço) e tratadas com a caulibugulona A (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$) e DMSO (grupo controle). Após os períodos de 12, 24 e 48h de tratamento, as células foram marcadas com Brometo de Etideo e Laranja de Acridina ($0,1 \text{mg/mL}$) e a morfologia foi observada por microscopia de fluorescência. Foram contabilizadas 300 células em campos randomizados de cada amostra, sendo as morfologias celulares diferenciadas entre normais, necrose e apoptose de acordo com os seguintes critérios morfológicos:

- Células normais: Coram-se apenas pelo corante laranja de acridina, exibindo núcleo volumoso e sem limite nítido entre o núcleo e o citoplasma. No núcleo, a cromatina é frouxa e corada de verde e observam-se nucléolos intensamente corados de verde. No citoplasma, vesículas ácidas polarizadas ao lado do núcleo estão frequentemente presentes e apresentam coloração laranja.
- Células em apoptose: Coram-se apenas pelo laranja de acridina, apresentando coloração verde pelo laranja de acridina. O volume celular apresenta-se reduzido (picnose). O núcleo apresenta condensação da cromatina, que emite intensa coloração verde. A cromatina condensada tende a acumular na borda da carioteca, formando um anel. O núcleo torna-se picnótico e pode apresentar-se fragmentado. O citoplasma é marcado por uma fraca coloração verde, permitindo observar nitidamente o limite nuclear. Ocorre também o desaparecimento ou dispensão das vesículas ácidas coradas de laranja. A membrana celular apresenta a formação de bolhas e projeções (*blebbing*). As células com núcleo picnótico ou fragmentado corados intensamente em laranja pelo brometo de etídeo são consideradas como necroses secundárias ao processo de apoptose, e foram contabilizadas como apoptose.
- Células em necrose: apresentam núcleo grande e corado intensamente de laranja pelo brometo de etídeo. A cromatina nuclear apresenta-se frouxa. Devido à ruptura da membrana plasmática, não ocorre à coloração por laranja de acridina, e o citoplasma não apresenta coloração alguma.

3.2.6. ENSAIO DA ATIVIDADE DAS CASPASES 2, 3, 4, 8 E 9

A atividade das caspases foi quantificada usando um ensaio colorimétrico. Assim, para quantificar a atividade das caspases 2, 4, 8 e 9 as células U937 ($1,0 \times 10^7$ células/amostra) foram tratadas com a caulibugulona A ($4,0 \mu\text{g/mL}$) ou DMSO por 3,

6, 12 e 24h. Para a quantificação da atividade da caspase 3 as células U937 ($1,0 \times 10^7$ células/amostra) foram tratadas com a caulibugulona A (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DMSO por 24 h. As células foram coletadas por centrifugação a 1000 rpm por 5,0 min e lisadas com tampão de lise (1,0% Triton X-100, 0,32M sacarose, 5,0mM EDTA, 10,0mM Tris-HCl, pH 8,0, 2,0mM dithiothreitol, 1,0mM PMSF, 1,0g/mL aprotinina, 1,0mg/mL leupeptina). Em seguida, 50,0 μL do lisado (concentração proteica de 4,0mg/mL) foram transferidos para uma placa de 96 poços e incubados com 15,0 μL dos substratos VDVAD-pNA, DEVD-pNA, Ac-LEVD-pNa, IETD-pNA, LEHD-pNA na concentração de 1,5mM (específicos para as caspases 2, 3, 4, 8 e 9, respectivamente) e 50,0 μL de tampão de reação de caspase 2X (200,0mM HEPES, 20,0% sacarose, 0,2% CHAPS, 0,2mg/ml albumina bovina e 20,0mM DTT) a 37,0°C por 1h. A atividade enzimática foi quantificada pelo aparecimento de cor, que indica a clivagem do respectivo substrato. A cor foi quantificada por espectrofotometria em leitor de placas de ELISA com comprimento de onda de 405nm.

3.2.7. DETECÇÃO DE APOPTOSE POR ENSAIO DE ANEXINA V-FITC/PI

A quantificação da apoptose foi realizada utilizando o Kit Annexin V-FITC/PI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, células U937 foram mantidas em placas de cultivo celular de 24 poços ($1,0 \times 10^6$ células/poço) com ou sem NAC (5,0mM) e tratadas com diferentes concentrações da caulibugulona A (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e DMSO por 24h, coletadas e lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas gentilmente em 500,0 μL de tampão de ligação de anexina V-FITC e incubadas com anexina V-FITC (5,0 μL) e PI (10,0 μL) no escuro por 10min a 25,0°C para, em seguida, serem analisadas por citometria de fluxo usando o *software* CellQuest.

3.2.8. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi\text{m}$)

Para avaliar as mudanças no $\Delta\Psi\text{m}$, células U937 foram mantidas em placas de cultivo celular de 24 poços ($1,0 \times 10^6$ células/poço) e tratadas com caulibugulona A (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e com controle (DMSO) por 24h. Depois de tratadas, as células foram removidas e lavadas duas vezes com PBS e os *pellets* celulares foram ressuspendidos em 1,0mL de meio de cultivo celular DMEM-F12 contendo JC-1

(2,0 μ M) e incubado a 37,0 $^{\circ}$ C por 30,0min. A fluorescência do JC-1 foi quantificada por citometria de fluxo com excitação e emissão de ondas de 488 e 590 nm, respectivamente.

3.2.9. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

A geração de ROS foi estimada por citometria de fluxo usando DCFH-DA. Para tanto, células U937 foram mantidas por 24h em placas de cultivo celular de 24 poços (1,0 \times 10⁶ células/poço) com ou sem NAC (5,0mM) e tratadas em seguida com diferentes concentrações da caulibugulona A (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μ g/mL) e DMSO por 2h. A marcação com DCFH-DA (10,0 μ M) foi realizada conjuntamente com os tratamentos. Subsequentemente, as células foram removidas, lavadas em PBS, ressuspensas em 500,0 μ L de PBS e analisadas por citometria de fluxo.

3.2.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos e os valores de IC₅₀ foram obtidos através do *software* GraphPad Prism Versão 5.0. Aos resultados obtidos foi aplicado o teste estatístico ANOVA, para verificação da significância entre os dados obtidos. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. CAULIBUGULONAS PROMOVEM CITOTOXICIDADE SELETIVA EM CÉLULAS DE LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS

A capacidade citotóxica das quatro caulibugulonas A-D sintéticas foi verificada pelo ensaio de MTT, sendo as células U937, MOLT4, H460, COLO205 e PBMC incubadas por 48 horas com as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 μ g/mL das caulibugulonas. Os valores de densidade óptica obtidos foram utilizados para calcular as concentrações necessárias para induzir citotoxicidade em 50% das células (IC₅₀), as quais estão apresentadas na Tabela 1. Os valores de IC₅₀ (μ g/mL) demonstram que a caulibugulona A foi a mais ativa de todas as caulibugulonas testadas, obtendo valores de IC₅₀ para todas as células tumorais testadas e sendo estes valores os menores para as células tumorais U937 1,1 \pm 0,15, MOLT4 0,3 \pm 0,07 e H460 0,6 \pm 0,12. A caulibugulona B também induziu citotoxicidade em todas as células tumorais testadas com valores de IC₅₀ entre 1,6 \pm 0,07 e 3,8 \pm 0,12 μ g/mL. A caulibugulona C foi a mais ativa de todas as moléculas testadas para as células da

linhagem COLO205 $1,1 \pm 0,04$, porém, não foi tão ativa quanto às caulibugulonas A e B para as células U937, A e D para as células MOLT4 e não exibiu citotoxicidade suficiente para determinar o IC_{50} nas células H460. A caulibugulona D também apresentou citotoxicidade ativa contra todas as linhagens celulares cancerígenas testadas, exibindo maior citotoxicidade para as células H460 $1,4 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$ e menor para as células U937 $3,5 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$. Interessantemente, as caulibugulonas A, C e D foram citotóxicamente seletivas sobre células tumorais quando comparadas com PBMCs. Os valores de IC_{50} para as células PBMC foram superiores a maior concentração testada ($4,0 \mu\text{g/mL}$) para as caulibugulonas A e D e de $4,0 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$ para a caulibugulona C. Esta seletividade é tão pronunciada, que as PBMCs são 13 vezes mais resistentes ao tratamento com a caulibugulona A do que as células MOLT4. Por outro lado, a caulibugulona B apresentou perfil de seletividade citotóxica apenas com as células da linhagem U937.

Tabela 1. IC_{50} das caulibugulonas

Caulibugulona	Células				
	U937	COLO205	MOLT4	H460	PBMC
A	$1,1 \pm 0,15$	$3,0 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,12$	$> 4,0$
B	$1,6 \pm 0,07$	$3,7 \pm 0,31$	$3,8 \pm 0,12$	$2,8 \pm 0,06$	$2,7 \pm 0,21$
C	$3,0 \pm 0,22$	$1,1 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,15$	$> 4,0$	$4,0 \pm 0,34$
D	$3,5 \pm 0,81$	$2,5 \pm 0,09$	$2,6 \pm 0,12$	$1,4 \pm 0,65$	$> 4,0$

Nota: Todas as caulibugulonas foram analisadas numa série de três experimentos independentes. Os valores de IC_{50} representam a concentração necessária (em $\mu\text{g/mL}$) para reduzir a viabilidade de 50% das células. Dados apresentados em média \pm o desvio padrão e foram obtidos por regressão linear, calculada pelo software GraphPad Prism Versão 5.0.

3.3.2. TRATAMENTO COM CAULIBUGULONA A PROMOVE ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA CARACTERÍSTICA DE APOPTOSE

Para investigar a capacidade da caulibugulona A em induzir apoptose nas células tumorais U937, uma cinética de tratamento com as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$ pelos tempos de 12, 24 e 48 horas foi realizada. No grupo controle as células foram tratadas apenas com DMSO. As células foram marcadas com laranja de acridina e brometo de etídeo e observadas por microscopia de fluorescência, sendo analisadas 300 células por grupo experimental. As células foram diferenciadas quanto à morfologia típica de morte celular por necrose, necrose secundária e apoptose, sendo comparadas com as morfologias

típicas de células normais do grupo controle. As necroses secundárias foram consideradas como apoptose, na contagem final. As células com morfologia de necrose foram raras em todos os tempos e concentrações testados, não ultrapassando a $1,2 \pm 0,66\%$. As análises morfológicas sugeriram que o processo de morte celular predominante foi a apoptose. No tempo de 12 horas de tratamento, nas concentrações de 1,5, 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$ apresentaram respectivamente, $14,55 \pm 1,95\%$, $29,0 \pm 4,0\%$ e $42,0 \pm 4,0\%$ de morfologias típicas de apoptose (Figura 1). Com 24 horas de tratamento $28,25 \pm 4,85\%$ das células tratadas com a concentração de $1,5 \mu\text{g/mL}$ e 100% das células tratadas com as concentrações de 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$ apresentavam morfologia de apoptose. Após 48 horas de tratamento, $60,25 \pm 5,35\%$ das células tratadas com $1,5 \mu\text{g/mL}$ e 100% das células tratadas com as concentrações de 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$ apresentavam morfologia de apoptose.

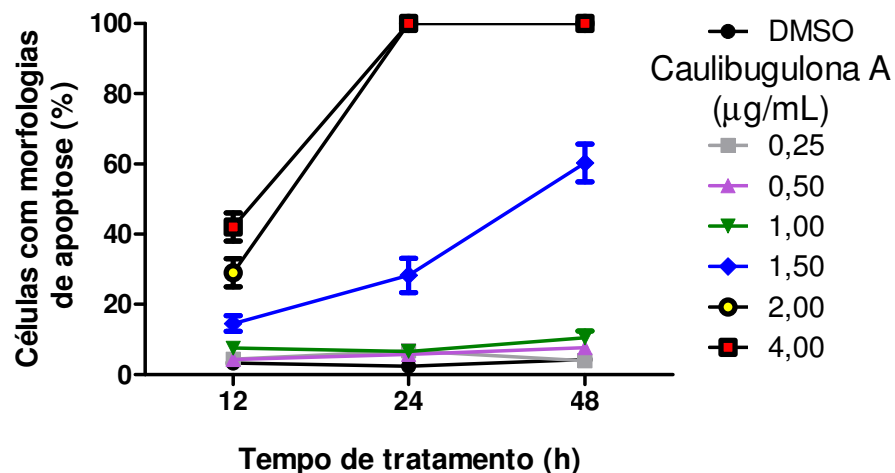


Figura 1. Caulibugulona A induz morfologia de apoptose em células U937. Células U937 foram tratadas por 12, 24 e 48 horas com a caulibugulona A nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$ e a morte celular por apoptose verificada por microscopia de fluorescência, observando a morfologia das células coradas com laranja de acridina e brometo de etídeo. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.3.3. CAULIBUGULONA A INDUZ APOPTOSE COM ATIVAÇÃO DE CASPASE 3

A atividade da enzima caspase 3 é um indicador de morte celular por apoptose. Para confirmar as suspeitas de indução de apoptose, levantadas pelas análises de microscopia de fluorescência, células U937 foram tratadas por 24 horas com a caulibugulona A (0,5, 1,0, 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$) ou DMSO. Os lisados citoplasmáticos das células foram preparados para a quantificação da atividade da enzima caspase 3 através da clivagem do substrato colorimétrico DEVD-pNA. Os valores obtidos indicam que houve um acréscimo estatisticamente significativos na

atividade da enzima caspase 3 nas células tratadas com 2,0µg/mL ($52,65\pm 4,04\%$) e 4,0µg/mL ($65,41\pm 14,48\%$) da caulibugulona A (Figura 2). Estes valores confirmam as suspeitas de que o tratamento com a caulibugulona A nas concentrações de 2,0 e 4,0 µg/mL induz apoptose, conforme observado por microscopia de fluorescência.

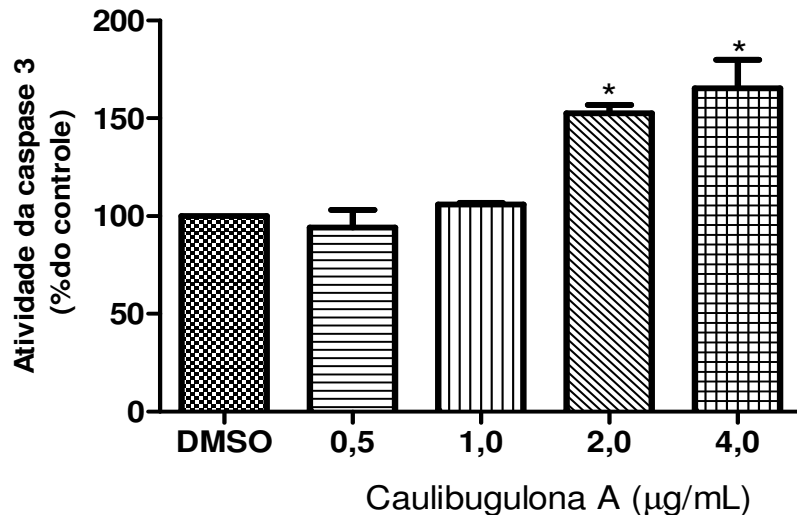


Figura 2. Caulibugulona A induz ativação de caspase 3 em células U937. Células U937 foram tratadas por 24 horas com a caulibugulona A nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg/mL. A atividade enzimática da caspase 3 foi mensurada pela clivagem do substrato colorimétrico DEVD-pNA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.3.4. TRATAMENTO COM A CAULIBUGULONA A INDUZ APOPTOSE COM MARCAÇÃO DE ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDEO (PI)

Para quantificar a apoptose induzida pelo tratamento com a caulibugulona A, células U937 foram tratadas por 24 horas com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg/mL da caulibugulona A ou DMSO, incubadas com anexina V-FITC e PI e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados mostrados na Figura 3 A-C apontam pouca marcação para apoptose (células positivas para anexina V/FITC+PI) no controle ($4,1\pm 0,86$) e nos grupos tratados com as concentrações de 0,5 e 1,0µg/mL ($4,4\pm 0,6\%$ e $9,06\pm 0,06\%$, respectivamente) da caulibugulona A. Nas células tratadas com as concentrações de 2,0 e 4,0µg/mL da caulibugulona A houve intensa indução de apoptose, com marcação positiva em $48,8\pm 1,9\%$ e $92,6\pm 6,63\%$, respectivamente.

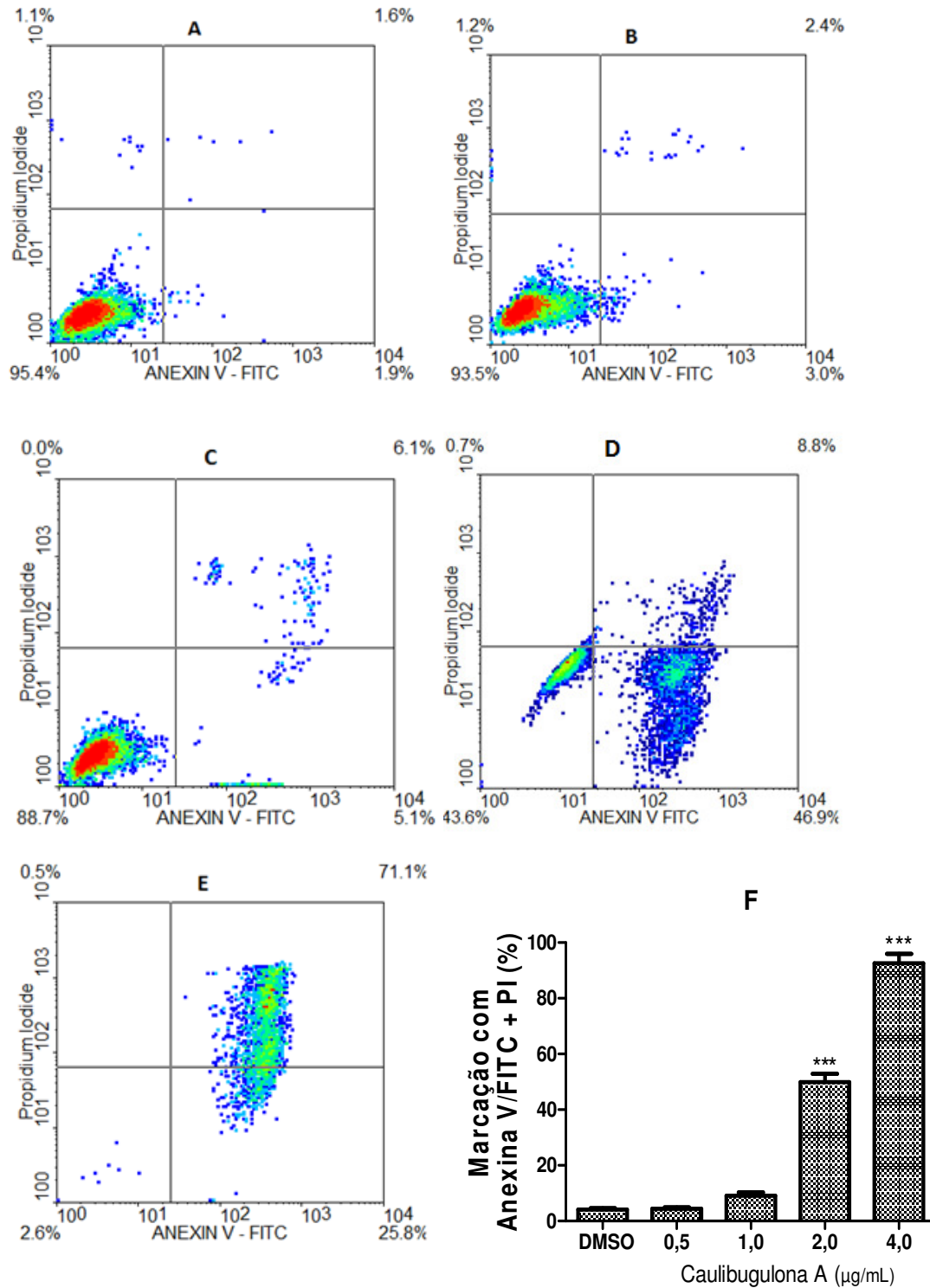


Figura 3. Caulibugulona A induz marcação com anexina V/FITC e PI em células U937. Células U937 foram tratadas com concentrações crescentes da caulibugulona A e marcadas com anexina V/FITC e PI para análise por citometria de fluxo. A - Controle não tratado. B, C, D e E – Tratamentos com a Caulibugulona A nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 µg/mL por 24h, respectivamente. Células marcadas positivamente para anexina V/FITC e PI foram consideradas em apoptose. F - Média dos valores de apoptose. Todos os testes foram repetidos em triplicata e as Figuras A-E indicam os resultados de um experimento representativo. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.3.5. CAULIBUGULONA A ATIVA CASPASES INICIADORAS 2 E 9

A via de apoptose induzida pela caulibugulona A foi verificada através do perfil cinético temporal de atividade das caspases iniciadoras 2, 4, 8 e 9. As células U937 foram tratadas por 3, 6, 12 e 24 horas com 4,0µg/mL da caulibugulona A ou DMSO e seus lisados foram utilizados para quantificar a atividade das caspases iniciadoras. A atividade destas caspases foi avaliada pela capacidade de clivagem dos respectivos substratos cromogênicos VDAD-pNA (Caspase 2), Ac-LEVD-pNa (Caspase 4), IETD-pNA(Caspase 8), LEHD-pNA (Caspase 9). Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em porcentagens, levando-se em consideração os valores obtidos para o grupo controle tratados apenas com DMSO. A indução de atividade das caspases iniciadoras foi confirmada quando houve acréscimo estatisticamente significativo da atividade em relação ao controle negativo.

Na Figura 4 estão apresentados os valores do perfil cinético de atividade das caspases iniciadoras, onde se observa que apenas as caspases 2 e 9 apresentaram acréscimos estatisticamente significativos de suas atividades quando comparadas ao grupo controle. No tempo de 6 horas foi possível identificar um acréscimo de 110,39±19,19% na atividade da caspase 2 e de 78,88±16,09% da caspase 9 nos grupos tratados com a caulibugulona A. Com 12 horas de tratamento, o acréscimo na atividade da caspase 2 foi de 163,02±16,09% e com 24 horas o acréscimo chegou a 254,97±13,15%. A atividade da caspase 9 também apresentou aumento tempo-depedente, passando para um acréscimo de 88,32±17,15% com 12 horas para 372,29±61,64% com 24 horas de tratamento.

3.3.6. CAULIBUGULONA A PROMOVE REDUÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$) EM CÉLULAS U937

Estímulos apoptóticos que iniciam pela via mitocondrial promovem a ativação da caspase 9. Para confirmar a suspeita de que a caulibugulona A atua por esta via, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial das células U937 após o tratamento por 24 horas com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg/mL da caulibugulona A ou apenas com DMSO. O potencial de membrana mitocondrial foi quantificado por citometria de fluxo utilizando o JC-1 como marcador e os valores obtidos estão apresentados na Figura 5. Nesta figura, observa-se em A uma pequena população de células que se desloca para a porção inferior do histograma,

indicando que na média (Figura - 5 F) apenas $4,16 \pm 0,86\%$ das células do grupo controle apresentam perda de potencial de membrana mitocondrial. Nos grupos tratados com a caulibugulona A, a perda do potencial de membrana mitocondrial foi concentração dependente, onde se observa na Figura 5 – B a E que a população de células desloca-se para a porção inferior do histograma, indicando perda do potencial de membrana mitocondrial. Na Figura 5-F observa-se que nos grupos tratados com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$ da caulibugulona A, a perda do potencial de membrana mitocondrial alcançou em média $29,2 \pm 3,6\%$, $27,2 \pm 5,23\%$, $39,96 \pm 4,36\%$ e $61,6 \pm 4,7\%$ das células, respectivamente no tempo de 24h.

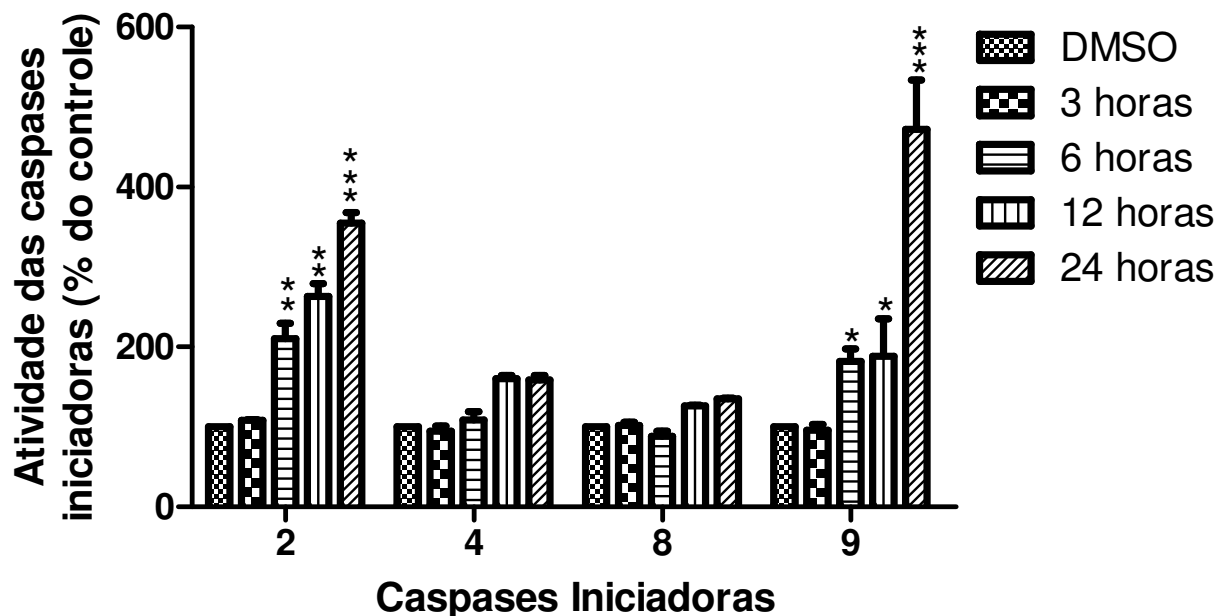


Figura 4. Caulibugulona A induz ativação das caspases iniciadoras 2 e 9 em células U937. A atividade das caspases iniciadoras foi verificada em células U937 tratadas com a caulibugulona A na concentração de $4,0 \mu\text{g/mL}$ por 3, 6, 12 e 24 horas, utilizando os substratos cromogênicos específicos VDVAD-pNA (Caspase 2), Ac-LEVD-pNa (Caspase 4), IETD-pNA (Caspase 8), LEHD-pNA (Caspase 9). Os valores representam as médias dos experimentos repetidos em triplicata. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

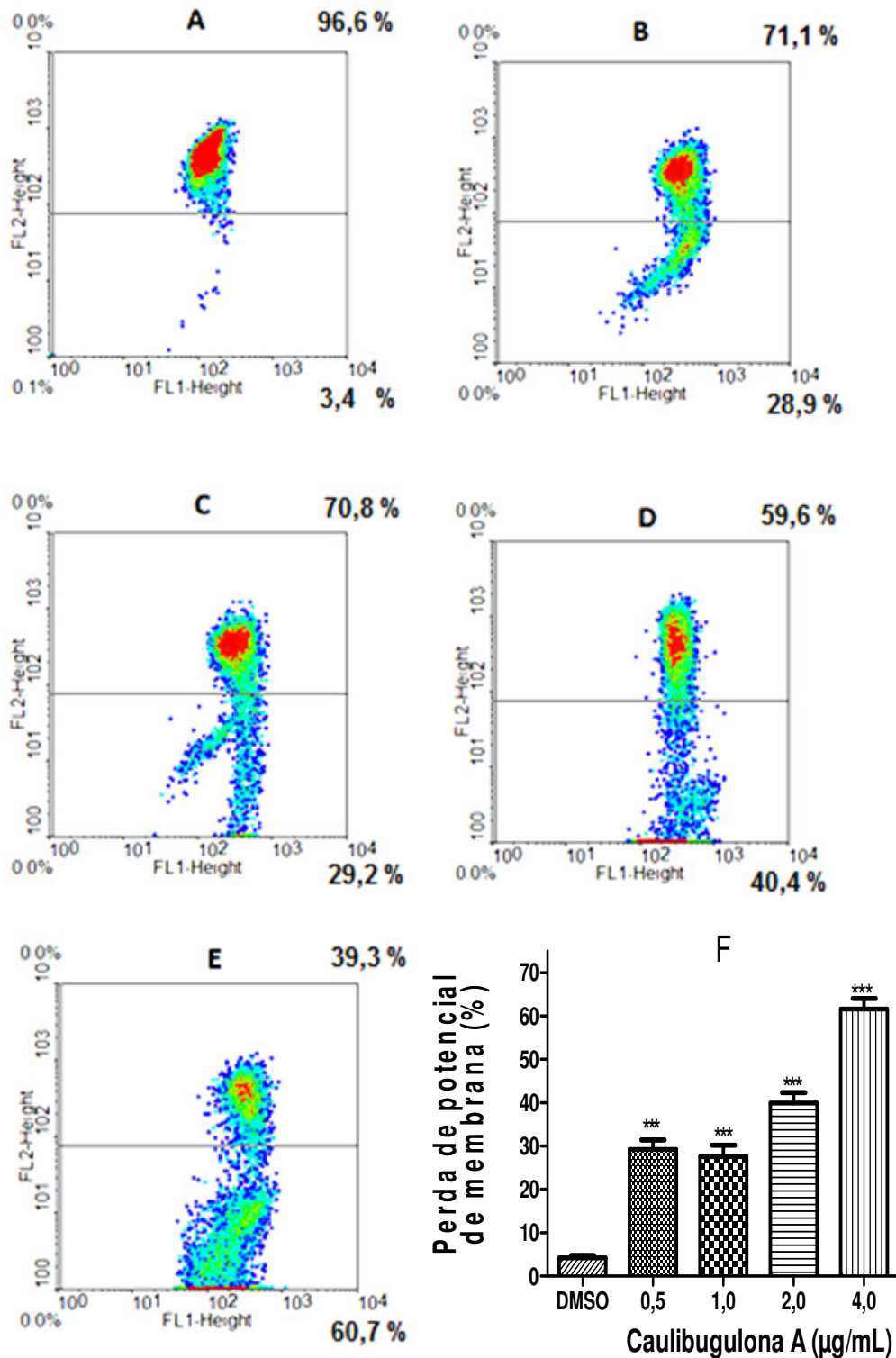


Figura 5. Caulibugulona A induz redução do potencial de membrana mitocondrial em células U937. As células U937 foram tratadas por 24h com concentrações crescentes da caulibugulona A e marcadas com JC-1 para análise por citometria de fluxo. O quadrante inferior dos histogramas A-E representam a população de células com perda do potencial de membrana mitocondrial. A - Controle não tratado. B, C, D e E - Caulibugulona A nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg/mL, respectivamente. F - Média dos valores de perda de potencial de membrana mitocondrial. Todos os testes foram feitos em triplicata e as Figuras A-E indicam os resultados mais representativos. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.3.7. CAULIBUGULONA A PROMOVE AUMENTO NA GERAÇÃO DE ROS EM CÉLULAS U937

Estímulos que afetam as mitocôndrias interferem na cadeia respiratória, promovendo intensa produção de ROS. Para avaliar se o tratamento com a caulibugulona A estimula a produção endógena de ROS, confirmando assim sua atuação mitocondrial, células U937 foram tratadas por 2h com concentrações crescentes da caulibugulona A ou apenas DMSO, na presença ou ausência de um inibidor da geração endógena de ROS (NAC 5,0 mM). As células foram marcadas com DCFH-DA para quantificação por citometria de fluxo da produção de ROS. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 6. Em A, observa-se o perfil de produção constitutiva de ROS das células U937 tratadas apenas com DMSO, onde se verifica no histograma que apenas 6,6% das células produzem constitutivamente ROS. Quando as células foram tratadas com 2,0 e 4,0µg/mL da caulibugulona A, 45,74% e 71,45% das células apresentavam produção de ROS, apontando que o tratamento com a caulibugulona A estimula a geração destes radicais livres. Quando as células foram tratadas conjuntamente com NAC e 4,0µg/mL da caulibugulona A (Figura 6-D), apenas 1,65% das células apresentavam produção de ROS, confirmando a atividade do NAC em inibir a geração endógena de ROS, mesmo em elevadas concentrações da caulibugulona A. Os valores das fluorescências médias geradas pelas células revelam a intensidade de ROS gerado pelos tratamentos e estão apresentados na Figura 6-E. Nota-se que o tratamento com a caulibugulona A aumenta de modo dose-dependente a geração endógena de ROS nas células U937 e que o tratamento com NAC foi capaz de inibir a geração endógena de ROS em todos os grupos testados.

3.3.8. TRATAMENTO COM INIBIDOR DE ROS PREVINE CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA CAULIBUGULONA A EM CÉLULAS U937

Para avaliar se o aumento na produção endógena de ROS, induzida pela caulibugulona A, interfere na citotoxicidade, células U937 foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes da caulibugulona A na presença ou na ausência de NAC (5,0mM) e a citotoxicidade foi verificada pelo ensaio metabólico do MTT. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7, onde se observa que o tratamento com o inibidor da geração de ROS reverteu o efeito citotóxico induzido pelo tratamento com 1,0 - 4,0µg/mL de caulibugulona A. As células U937 tratadas

com 0,5µg/mL da caulibugulona A não exibiram efeitos citotóxicos estatisticamente significativos quando tratadas concomitantemente ou não com NAC, corroborando dados mostrados anteriormente de que a concentração de 0,5µg/mL da caulibugulona A não induzem efeitos citotóxicos nas células U937.

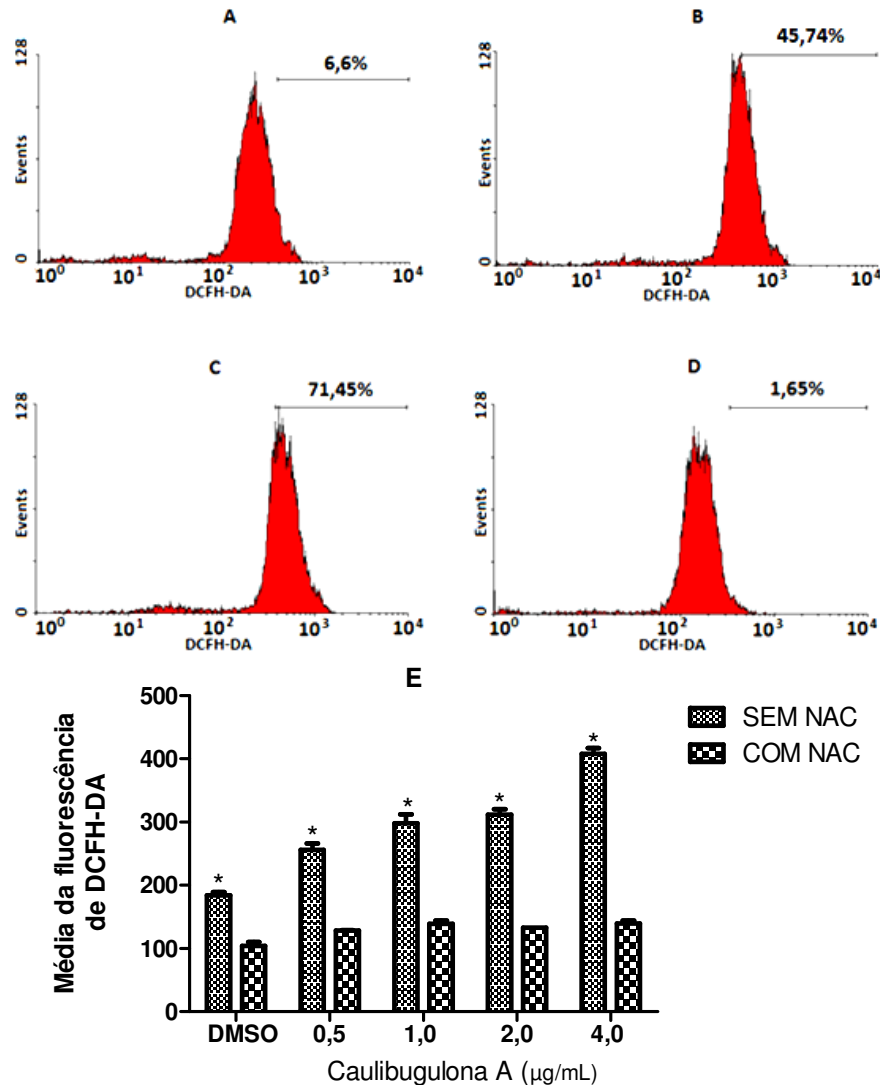


Figura 6. Caulibugulona induz aumento da geração endógena de ROS em células U937. As células U937 foram tratadas com concentrações crescentes da caulibugulona A na presença ou na ausência do inibidor da geração endógena de ROS (NAC 5,0mM) e analisadas por citometria de fluxo com marcação por DCFH-DA. A-Histograma do grupo controle, B e C - Histogramas dos tratamentos com 2,0 e 4,0µg/mL da caulibugulona A, respectivamente. D-Histograma do tratamento conjunto com NAC (5,0mM) e 4,0µg/mL da caulibugulona A. E - Gráfico da fluorescência média emitida pelas células tratadas com a caulibugulona A com e sem o NAC (5,0 mM). Os experimentos foram repetidos em triplicata e os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento com NAC inibiu a citotoxicidade induzida pelo tratamento com 1,0µg/mL da caulibugulona A, mantendo $94,0 \pm 6,4\%$ das células viáveis mesmo após

o tratamento com essa concentração, o que representa diferença de 53,5% de células viáveis em comparação com o grupo não tratado com NAC. Após tratadas com 2,0µg/mL da caulibugulona A, apenas 3,5±5,2% das células apresentavam-se viáveis. No entanto, o tratamento conjunto com NAC foi capaz de manter 63,8±2,16% das células viáveis. Mesmo no maior tratamento testado, de 4,0µg/mL da caulibugulona A, NAC inibiu a citotoxicidade, mantendo 39,29±5,83% das células viáveis após 24 horas de tratamento, enquanto que na ausência do inibidor da geração de ROS apenas 2,76±3,5% das células estavam viáveis.

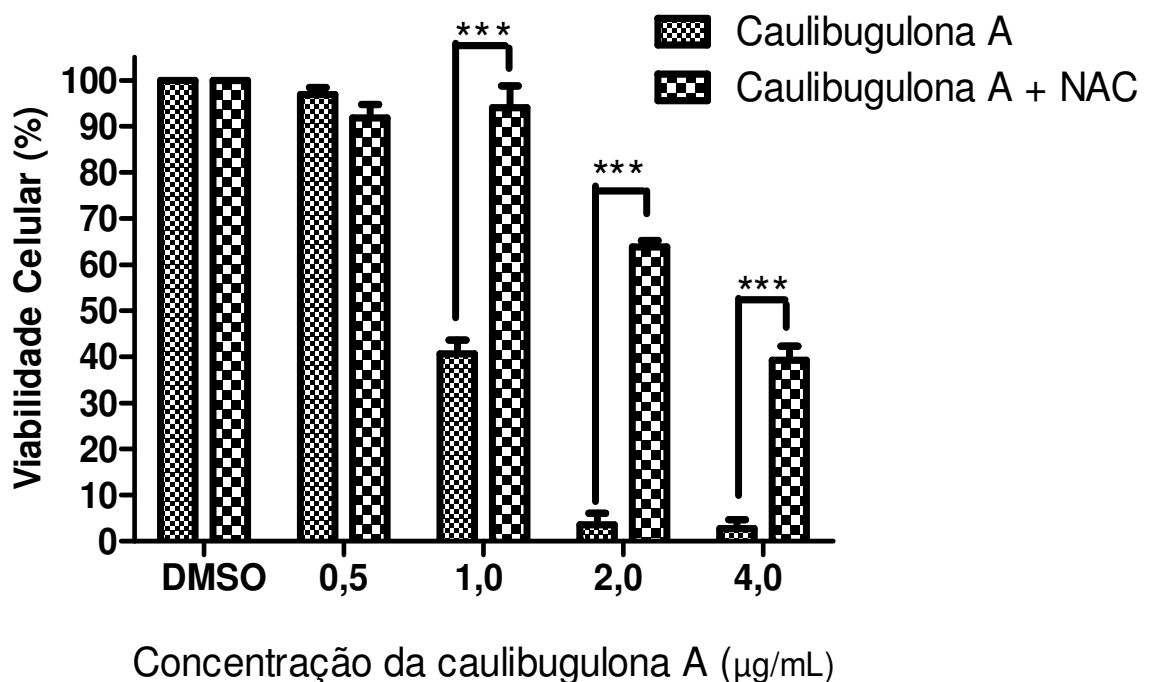


Figura 7. NAC inibe o efeito citotóxico produzido pelo tratamento com a caulibugulona A. Células U937 foram tratadas com as concentrações indicadas da caulibugulona A na presença ou ausência de NAC por 24 horas e a viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio de MTT. Os experimentos foram repetidos em triplicata e os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.3.9. TRATAMENTO COM INIBIDOR DE ROS INIBE APOPTOSE EM CÉLULAS U937 TRATADAS COM CAULIBUGULONA A

Para confirmar que a geração endógena de ROS é o principal mecanismo citotóxico induzido pela caulibugulona A, células U937 foram tratadas por 24h com concentrações crescentes desta caulibugulona concomitantemente com o inibidor da geração de ROS (NAC) e a morte celular por apoptose foi analisada por citometria

de fluxo usando Anexina V-FITC e PI como marcadores. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8, sendo A-E os histogramas mais representativos e F os valores médios das marcações para apoptose, sendo as células duplamente marcadas para Anexina V-FITC e PI consideradas como apoptose. Na Figura 8 A-D observa-se um pequeno deslocamento da população celular para os quadrantes com marcação para Anexina V-FITC/PI, demonstrando que o NAC inibiu a indução de apoptose quando as células foram tratadas com concentrações de até 2,0µg/mL da caulibugulona A. O tratamento com a concentração de 4,0µg/mL da caulibugulona A (Figura 8-E) deslocou parte da população para os quadrantes indicativos de marcações com Anexina V-FITC/PI, indicando que parte das células entrou em apoptose. Os valores médios das taxas de apoptose (Figura 8-F) apontam que o tratamento com NAC inibiu a indução de apoptose nas concentrações de 2,0 e 4,0µg/mL, quando comparado com as células U937 que não foram tratadas com NAC. Na concentração de 2,0µg/mL houve inibição completa do efeito indutor de apoptose, enquanto que na concentração de 4,0µg/mL, o tratamento com NAC inibiu em 81% a indução de apoptose.

3.4. DISCUSSÃO

As quinonas e as isoquinolinas são metabólitos secundários de ampla distribuição natural (BENITES, *et al.*, 2008; PANDEYA e TYAGI, 2011), existindo drogas comercializadas que apresentam a função de quinona, como o antineoplásico lapachol e seus derivados (LU, *et al.*, 2013), e de isoquinolina, no caso dos anti-hipertensivos quinapril e quinapirilat (KIEBACK, *et al.*, 2009; CULY e JARVIS, 2002). Apesar dos alcaloides isoquinolino quinóides apresentarem expressivas atividades biológicas em testes *in vitro*, atuando como antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e antineoplásicos, ainda não existem drogas aprovadas para utilização que contemplem esta classe de compostos (HAWAS, *et al.*, 2009; FONTANA, 2000; SANDOVAL, *et al.*, 2004; PETTIT, *et al.*, 1992; EDRADA, *et al.*, 1996; MILANOWSKI, *et al.*, 2004).

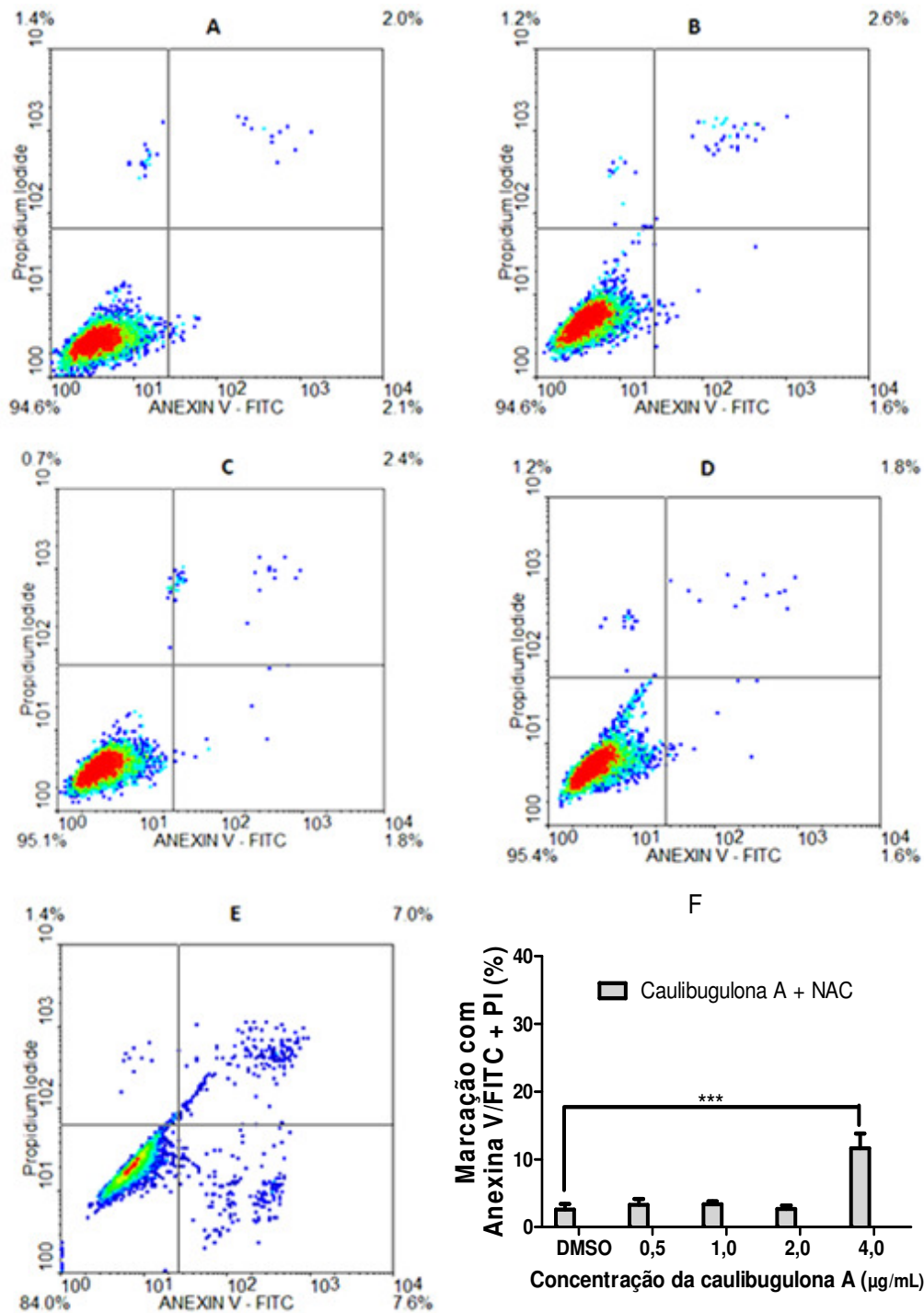


Figura 8. NAC inibe apoptose em células U937 tratadas com a caulibugulona A. Células U937 foram tratadas por 24h com NAC (5,0mM) e concentrações variadas da caulibugulona A para determinação de apoptose por citometria de fluxo com marcação com Anexina V-FITC e PI. Os grupos controles foram constituídos por células tratadas apenas com DMSO ou concentrações variadas da caulibugulona A. Os testes foram repetidos em triplicata e os histogramas mais representativos dos tratamentos conjuntos com NAC e a caulibugulona A estão demonstrados de A – E, sendo A - Controle tratado com DMSO, B, C, D, E - Tratamentos com 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0µg/mL da Caulibugulona A e F – Médias de apoptose obtidas dos experimentos. Os experimentos foram repetidos em triplicata e os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle (DMSO) estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As caulibugulonas representam um grupo de seis alcaloides isolados dos extratos do briozoário *Caulibugula intermis*, que habita o oceano Indo-Pacífico em Palau. Das seis caulibugulonas, quatro são isoquinolino quinonas (A-D) e duas (E e F) são iminoquinolino quinonas. Todas as caulibugulonas isoladas do briozoário foram citotóxicas contra 60 linhagens celulares tumorais obtidas do instituto de câncer dos EUA, com valores de IC_{50} variando entre $0,34\mu\text{g/mL}$ e $1,67\mu\text{g/mL}$ (MILANOWSKI, *et al.*, 2004). Estes resultados despertaram o interesse nestes alcaloides, o que levou ao estabelecimento de três rotas de síntese que permitem a obtenção das caulibugulonas A-E (WIPF, *et al.*, 2004; ALAGILLE, *et al.*, 2004; NACIUK, *et al.*, 2013). As moléculas sintéticas mantiveram as características citotóxicas e seus mecanismos de ação começaram a ser elucidados (ALAGILLE, *et al.*, 2004; BRISSON, *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram testados os efeitos citotóxicos das quatro caulibugulonas A-D, obtidas com alto rendimento por uma rota sintética recentemente descrita (NACIUK, *et al.*, 2013). Os dados de ensaios de MTT (Tabela 1) demonstram que todas as quatro caulibugulonas foram citotóxicas contra as células de linhagens cancerígenas humanas U937, MOLT4, COLO205 e H460, com valores de IC_{50} entre $0,3\pm 0,07$ e $3,8\pm 0,12\mu\text{g/mL}$. Esses valores indicam que as moléculas obtidas pela rota sintética mantiveram as características citotóxicas das moléculas isoladas do briozoário, permitindo que os testes para a investigação das vias de citotoxicidade fossem realizados.

Os efeitos tóxicos das drogas antitumorais se devem a baixa seletividade, ou seja, as drogas não poupam as células normais dos efeitos citotóxicos. Dessa forma, substâncias que possam atuar diretamente sobre as células tumorais e poupar as células normais são um bom indicador para a continuidade dos testes de avaliação do potencial antitumoral.

Interessantemente, as caulibugulonas A, B e D demonstraram citotoxicidade seletiva para as células tumorais humanas U937, MOLT4, H460 e COLO205, quando comparadas com as PBMCs. Estes dados, inéditos na literatura, indicam que os valores de IC_{50} obtidos para as PBMCs chegam a ser até treze vezes maiores do que apresentados para as células tumorais. Este fato sugere que num tratamento conjunto, como o proposto para o câncer, as doses necessárias para induzir a morte das células cancerígenas não induziria a morte de células normais, como as PBMC, acarretando menos efeitos colaterais.

Esses dados foram muito animadores, pois se buscam drogas que tenham como alvo terapêutico apenas as células tumorais, e assim, conferindo menos efeitos tóxicos durante o tratamento. Upadhyaya e colaboradores em 2007 em seus testes identificaram efeito semelhante por β -carotenos, atuando seletivamente sobre as linhagens U937 e HL-60, poupando as PBMCs dos efeitos citotóxicos.

Além de serem seletivas atuando sobre as células tumorais, é necessário que as drogas antineoplásicas não induzam morte celular por necrose. Estudos de patologia indicam que um processo de necrose superior a 5% das células totais de um organismo geram reações inflamatórias incompatíveis com a vida (KUMAR, *et al.*, 2005). Assim, promover apoptose sem ou com a liberação de poucos mediadores pró-inflamatórios é um aspecto importante na identificação de uma droga antineoplásica.

Os resultados da investigação do tipo de morte celular induzido pelo tratamento de células U937 com a caulibugulona A, apresentados neste trabalho, são inéditos e indicam que esta molécula tem o potencial indutor de apoptose. As análises de microscopia de fluorescência (Figura 1) demonstram que o tratamento com a caulibugulona A induz morfologia típica de apoptose em células U937 após 12 horas de tratamento. A condensação de cromatina, acompanhada de fragmentação nuclear e por fim, o aparecimento de corpos apoptóticos estão entre as características morfológicas mais marcantes do processo de morte por apoptose e que podem ser facilmente observados nas células em apoptose por testes de microscopia de fluorescência. Por isso, esses testes geralmente são os primeiros a serem realizados para investigar o tipo de morte celular. Alguns autores, no entanto, consideram essa metodologia tendenciosa, pois para ser executada de maneira correta, o avaliador deve ser imparcial e possuir um olho apurado para saber diferenciar as morfologias celulares (LEITE, *et al.*, 2000).

A capacidade de induzir apoptose foi confirmada pela presença da caspase 3 ativada nas células tratadas com a caulibugulona A (Figura 2). As caspases são as enzimas efetoras da apoptose. Quando ativadas, as caspases clivam substratos intracelulares, conferindo às células a característica morfológica de apoptose. Dentre os substratos clivados pelas caspases, encontram-se a actina, um componente do citoesqueleto que quando clivado torna a célula picnótica e desestabiliza a membrana plasmática, surgindo os *blebbings*. A caspase 3 cliva também a enzima DNase ativada por caspase (CAD). Esta enzima quando clivada torna-se ativa e

penetra no núcleo, clivando o DNA em fragmentos de 200 pb, desestruturando o genoma nuclear, que se condensa. A atividade das caspases promove a desestabilização da laminina nuclear, o que torna o núcleo picnótico e fragmentado (MIGNOTTE e VAYSSIERE, 2001; WANG, 2001; MAYER e OBERBAUER, 2003; KUMAR, *et al.*, 2005; ELMORE, 2007;)

A morte celular por apoptose induz a translocação de fosfatidilserina do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo, servindo de marcador de apoptose por ligantes de fosfatidilserina, como a Anexina V. Por se ligar nas células em apoptose, a Anexina V tem sido amplamente utilizada como um marcador para quantificar células em apoptose dentro de uma amostra (LEITE, *et al.*, 2000; VAN ENGELAND, *et al.*, 1998). Nos testes realizados nesta tese, um Kit de detecção de apoptose foi utilizado para quantificar células marcadas com Anexina V-FITC. Os valores obtidos indicam que $92,6 \pm 6,63\%$ das células U937 tratadas por 24 horas com $4,0 \mu\text{g/mL}$ da caulibugulona A estavam em apoptose (Figura 3). Estes resultados corroboram os obtidos por microscopia de fluorescência e a atividade da enzima caspase 3, demonstrando a capacidade da caulibugulona A em induzir apoptose em células U937 nas concentrações de 2,0 e $4,0 \mu\text{g/mL}$.

A indução de apoptose pode ocorrer por vias intrínsecas ou extrínsecas, dependendo do estímulo, e cada uma destas vias inicia com a ativação de caspases iniciadoras específicas. A ativação destas caspases pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos da superfície celular ou por estímulos internos de estresse intracelular que promovem lesão do DNA celular, perturbações no ciclo celular e nas vias metabólicas (BERKE, 1995; VAN ENGELAND, *et al.*, 1998; FADEEL, *et al.*, 1999; GHOBRIAL, *et al.*, 2005). A ativação de receptores de morte celular da membrana plasmática promovem a ativação da caspase 8 (NAGATA, 1997; KISCHKEL, *et al.*, 1995; DONEPUDI, *et al.*, 2003; BRUIN e MEDEMA, 2008).

Estímulos genotóxicos, como produção excessiva de ROS e radiação UV promovem a ativação de proteínas pró-apoptóticas, como BCL-2, que atuam nas mitocôndrias interferindo no potencial de membrana mitocondrial, induzindo a liberação de citocromo C, formação do apoptossoma e a ativação da caspase 9 e subsequentemente, da caspase 2 (ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2005; KUMAR, *et al.*, 2009). Estresse de retículo endoplasmático e reações inflamatórias promovem a ativação das caspases 4 e 12 (NAKAGAWA, *et al.*, 2000; HITOMI, *et al.*, 2004;

WONG, 2010), enquanto que estímulos que promovem danos mitocondriais promovem a liberação de citocromo C, formação do apoptossoma e ativação da caspase 9 (SINHA, *et al.*, 2013; SAMRAJ, *et al.*, 2007, CHEN, *et al.*, 2007).

O tratamento de células U937 com a caulibugulona A promoveu primeiramente a ativação das caspases 2 e 9 (Figura 4), sugerindo a indução de apoptose pelas vias mitocondrial e genotóxica. Em estudo anterior, constatou-se que a caulibugulona A induz intensa produção de ROS (BRISSON, *et al.*, 2007), o que justificaria a ativação da via genotóxica. No entanto, a ativação da via genotóxica por ROS é um evento secundário a um estímulo que promove perturbação na cadeia respiratória mitocondrial. Estes resultados são coerentes com o perfil indutor de apoptose de compostos quinoides, que interferem no citocromo P450, promovendo a geração de ROS, que atuam induzindo danos celulares e apoptose (SIEGEL, *et al.*, 2012; VIJAYARAMAN, *et al.*, 2012; SUN, *et al.*, 2013; SHANG, *et al.*, 2014).

A manutenção do potencial de membrana mitocondrial é um evento importante para a viabilidade celular. É através deste potencial que são geradas a maioria das moléculas de ATP, necessárias para a manutenção das funções básicas que mantêm a viabilidade celular. Este potencial é estabelecido pela cadeia de transporte de elétrons à medida que os compostos energéticos NADH e FADH₂, formados durante o metabolismo celular, são oxidados por complexos proteicos denominados citocromos, existentes na membrana interna da mitocôndria. Os íons H⁺ gerados desta oxidação são transportados para o espaço intermembrana, formando um gradiente de concentração destes íons neste espaço, o que gera o potencial de membrana mitocondrial. Ao retornar para o interior das mitocôndrias, os íons H⁺ ligam-se com íons O²⁻, formando moléculas de água. Estímulos que perturbem a cadeia de transporte de elétrons promovem a perda do potencial de membrana mitocondrial, além de gerarem poucos íons H⁺ e conseqüentemente, levam a uma intensa produção de ROS (ALBERTS, *et al.*, 2009; PERRY, *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que essa perturbação na cadeia de transportes de elétrons e conseqüente, produção de ROS, é um estímulo importante para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos (CHIU e SU, 2010; FAUZI, *et al.*, 2011; KIM, *et al.*, 2011).

Assim como esperado, devido a ativação das caspases 2 e 9 e da capacidade indutora a geração de ROS, previamente publicada (BRISSON, *et al.*, 2007), as células U937 quando tratadas com a caulibugulona A apresentaram perda do

potencial de membrana mitocondrial de modo concentração dependente (Figura 5), confirmando assim atuação da caulibugulona A nas mitocôndrias.

Estudos têm relatado que a produção endógena de ROS está relacionada diretamente com a origem e progressão tumoral (WU, *et al.*, 2004; HONG, *et al.*, 2005). As células cancerígenas exibem uma maior geração de ROS em relação às células normais. Este estágio de estresse oxidativo promove instabilidade genética, favorecendo tanto a origem de mutações cancerígenas quanto o aparecimento de células mais agressivas (ISHIKAWA, *et al.*, 2008).

Para suportar a intensa produção de ROS, as células cancerígenas apresentam elevação na produção de enzimas que degradam o excesso de radicais livres, impedindo danos celulares irreparáveis (D'AUTREAUX e TOLEDANO, 2007). No entanto, estudos apontam que estímulos que induzem um aumento no estado de estresse oxidativo das células cancerígenas promovem danos irreparáveis em lipídeos, proteínas e no DNA destas células em comparação com células normais (FRUEHAUF e MEYSKENS, 2007).

Estudos apontam que as drogas que aumentam significativamente a geração de ROS têm obtido sucesso na terapêutica do câncer, como ocorre com a doxorrubicina (GILLIAM, *et al.*, 2012; ROGALSKA, *et al.*, 2011), paclitaxel (ALEXANDRE, *et al.*, 2006; ALEXANDRE, *et al.*, 2007) e compostos baseados em platina (MARULLO, *et al.*, 2013). No entanto, algumas células tumorais desenvolvem resistência ao tratamento, o que ocorre principalmente pela adaptação endógena para combater os radicais livres (KIM, *et al.*, 2014). Assim, para o sucesso terapêutico, é importante que a droga além de aumentar a produção de ROS, também atue por uma via que independa do estresse oxidativo ou que o tratamento seja feito em conjunto com outra droga que atue por via diferente da indutora da elevação da geração de ROS. Baseado nestes princípios, muitos agentes geradores de ROS têm sido utilizados em combinações para testes com drogas antitumorais, como a associação entre gemcitabine e triapine no combate a câncer de pulmão de células não pequenas e gencitabine e Imexon no combate ao adenocarcinoma pancreático (COHEN, *et al.*, 2010; TRAYNOR, *et al.*, 2010).

Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho são promissores, pois se observa que as células U937 tratadas por 2h com a caulibugulona A na concentração de 4,0 µg/mL apresentam intensidade de produção de ROS 2,24 vezes maiores do que as células não tratadas e 3,24 vezes maiores do que as

células tratadas com inibidor da geração de ROS (Figura 6-E). De toda a população de células tratadas por 2h com a caulibugulona A na concentração de 4,0 µg/mL, 71,45% apresentavam produção endógena de ROS, enquanto que apenas 6,6% das células não estimuladas apresentavam essa produção endógena (Figura 6 A e C).

As fosfatases CDC25 exercem papel crítico na regulação do ciclo celular, controlando as quinases dependentes de ciclina (CDK) (LYON, *et al.*, 2002). A regulação endógena das fosfatases CDC25 são características importantes para a progressão do ciclo celular, sendo que a ausência destas ciclinas relacionadas com a parada do ciclo celular e a ativação dos mecanismos de *checkpoint*, que induzem a apoptose. Clinicamente, observa-se que agentes anticancerígenos como os inibidores das topoisomerase I e II (ansacrina e etopósido) e os alquilantes de DNA (cisplatina) diminuem a expressão de CDC25A, enquanto que compostos quinoides induzem a produção de ROS que atuam sobre as CDC25B por oxidação direta de resíduos catalíticos de cisteína essenciais para o sítio ativo da enzima (AGNER, *et al.*, 2005).

Estudo anterior sobre efeitos biológicos das caulibugulonas relatou duas vias distintas de inibição do ciclo celular. Uma das vias está relacionada diretamente a geração de ROS, que inativa de forma irreversível a ciclina CDC25B pelo estresse oxidativo promovido, parando o ciclo celular e a outra via atua sobre a MAPK p38, de forma independente da geração de ROS (BRISSON, *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos nesta tese complementam os anteriormente publicados por BRISSON em 2007, pois se verifica que a geração de ROS é o evento essencial para a citotoxicidade. Como pode ser observado nas Figuras 3-F e 8-F, quando a geração de ROS é suprimida pelo inibidor NAC, a indução de apoptose por estímulo da caulibugulona A é completamente inibida na concentração de 2,0µg/mL, e reduzida em 81% na concentração de 4,0µg/mL.

A via de sinalização das MAPK p38 regula uma variedade de respostas celulares a estresse ambiental, citocinas pró-inflamatórias e lipopolissacarídeos (HAN, *et al.*, 1994; ENSLEN, *et al.*, 2000; ZARUBIN e HAN, 2005). A ativação da MAPK p38 é frequentemente transitória em condições fisiológicas, interagindo com diversas proteínas que atuam nas células no controle do ciclo e da diferenciação celular, produção de citocinas, indução de apoptose, e supressão tumoral (LEE, *et al.*, 1994; ROUSE, *et al.*, 1994; HAN, *et al.*, 1994).

A indução de apoptose relacionada aos membros da família p38 pode ser observada tanto em estímulos exógenos, como na ativação de receptores faz e na irradiação com UV, quanto em estímulos endógenos, como danos mitocondriais e estresse oxidativo (NEMOTO, *et al.*, 1998; IVANOV e RONAI Z, 2000; LEE, *et al.*, 2002; TAN, *et al.*, 2003). Estudos demonstram que a ativação de MAPK p38 é necessária para a indução de apoptose iniciada por vários agentes antineoplásicos. Em células de meduloblastoma e de câncer de ovário tratadas com ácidos retinóicos, a ativação de MAPK p38 levam a despolarização mitocondrial e liberação de mediadores pró-apoptóticos (HOLMES, *et al.*, 2003). Em células de carcinoma de cérvix humano HeLa, o tratamento com agentes quimioterápicos que promovem despolarização de microtúbulos (nocodazol, vincristina e vimblastina) ou a estabilização (taxol) promovem parada do ciclo celular com ativação de MAPK p38 (DEACON, *et al.*, 2003), assim como o tratamento de várias células tumorais com intercalantes de DNA como cisplatina (LOSA, *et al.*, 2003). Do mesmo modo que o observado para diversos agentes antineoplásicos, estudo prévio (BRISSON, *et al.*, 2007) demonstrou que a caulibugulona A também apresenta a característica de ativar a via das MAPK p38, levando a parada do ciclo celular e a desativação da CDC25A de forma peculiar, independente de proteassoma, geração de ROS e ativação de Cdk.

Neste contexto, quando confrontados os dados obtidos de células U937 tratadas com a caulibugulona A (2,0 e 4,0 µg/mL) e o inibidor de ROS, se observa que mesmo inibindo a geração de ROS (Figura 6) e a indução de apoptose (Figura 8), a viabilidade das culturas celulares tratadas com 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL da caulibugulna A apresentaram viabilidades de $63,8 \pm 2,16\%$ e $39,29 \pm 5,83\%$, respectivamente. A ausência de morte celular e a redução na viabilidade sugerem um efeito citostático, indo de encontro ao esperado pela inibição do ciclo celular pela ativação da MAPK p38 de modo independente de ROS, mecanismo previamente descrito para a caulibugulona A (BRISSON, *et al.*, 2007).

3.5. CONCLUSÕES

A caulibugulona A demonstrou *in vitro*, ter atividade antineoplásica, atuando seletivamente sobre células tumorais humanas da linhagem U937. Seu mecanismo de citotoxicidade é por indução de apoptose, sendo esta dependente da produção de ROS e com envolvimento mitocondrial.

4. CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO *IN VIVO* DO COMPLEXO [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O

4.1. OBJETIVOS

4.1.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antineoplásica *in vivo* do complexo de coordenação cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O em modelos murinos de câncer de células B16-F10, SK-MEL-5, H460, COLO205 e U937.

4.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O em camundongos Balb/C nude e C57/BL6, utilizados como modelos experimentais de câncer.
- Realizar os testes pré-clínicos *in vivo* em modelos murinos de câncer de células B16-F10, SK-MEL-5, H460, COLO205 e U937, para avaliar o potencial antineoplásico do complexo de coordenação cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O.
- Analisar histologicamente as lesões cancerígenas de animais tratados com o complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O.

4.2. METODOLOGIAS

4.2.1. REAGENTES

O meio de cultivo celular DMEM-F12 e seus suplementos soro fetal bovino (FSB) e gentamicina foram adquiridos da Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Os reagentes dimetilsulfóxido (DMSO), e as drogas antineoplásicas cisplatina e doxorrubicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O foi cedido gentilmente pelos Drs. Christiane Fernandes e Adolfo Horn Junior (UENF-RJ). O kit de detecção de apoptose *in situ* TUNEL e o anticorpo anti Ki-67 foram adquiridos da Genscrit (New Jersey, USA).

4.2.2. PREPARAÇÃO DO COMPLEXO [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O

O complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O foi sintetizado conforme previamente descrito (FIGUEREDO, 2012). Para os testes *in vivo*, uma solução estoque em DMSO foi preparada na concentração de 250,0mg/mL.

4.2.3. LINHAGENS CELULARES TUMORAIS

As células tumorais U937 (linfoma histiocítico humano), H460 (carcinoma pulmonar de células grandes humanas), COLO205 (adenocarcinoma coloretal humano) e B16-F10 (melanoma metastático murino da linhagem C57/BL6) foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas *in vitro* em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 20,0µg/mL de gentamicina e 10,0% de soro fetal bovino em garrafas de cultura de 40,0mL e mantidas em estufa a 37,0° C, com 5,0% de CO₂ e umidade controlada.

4.2.4. ANIMAIS

Os testes com os animais seguiram as normas de bem estar e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa com animais da UENF (protocolo em anexo). Camundongos C57BL/6 e BALB/C nude fêmeas de 4-6 semanas de vida foram obtidos do biotério central da UENF. Os animais ficaram confinados em gaiolas com capacidade para seis animais no biotério central da UENF, onde foram realizados os procedimentos. A quantidade de animais utilizados em cada teste está descrita na tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de animais utilizados nos teste de atividade antineoplásica do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O.

Teste	Linhagem do camundongo	Quantidade
DL ₅₀	Balb/C nude	48
Toxicidade em doses repetidas	Balb/C nude	24
Efeito antineoplásico em lesões de células B16-F10	C57/BL6	26
Efeito antineoplásico em lesões de células SK-MEL-5	Balb/C nude	28
Efeito antineoplásico em lesões de células H460	Balb/C nude	28
Efeito antineoplásico em lesões de células COLO205	Balb/C nude	28
Efeito antineoplásico em lesões de células U937	Balb/C nude	28

4.2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER

4.2.5.1. MODELO DE MELANOMA SUBCUTÂNEO DE CÉLULAS B16-F10

Células murinas B16-F10 foram cultivadas *in vitro* conforme metodologia previamente descrita no item linhagens celulares tumorais. Em seguida, uma alíquota de 1,0x10⁶ células foi ressuspensa em 100,0µL de PBS e injetada subcutaneamente no dorso de camundongo C57BL/6, de acordo com a metodologia previamente descrita (MANSOUR, *et al.*, 2007). Após 7 dias, foi realizada a

verificação do aparecimento do nódulo tumoral e os animais com lesões aparentes foram tratados.

4.2.5.2. MODELO DE MELANOMA SUBCUTÂNEO DE CÉLULAS SK-MEL-5

Células humanas SK-MEL-5 foram cultivadas *in vitro* conforme metodologia previamente descrita ítem linhagens celulares tumorais. Posteriormente, alíquotas de $1,0 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^6$ células foram ressuspensas em 100,0 μ L PBS e injetadas subcutaneamente no dorso de camundongo BALB/c nude, conforme previamente descrito (SINGH, *et al.*, 2010). Após 30 dias, foi realizada a verificação do aparecimento dos nódulos tumorais, sendo estabelecida a partir de então, a concentração celular que permitisse o aparecimento de lesões para os demais testes.

4.2.5.3. MODELO HETEROTÓPICO SUBCUTÂNEO DE CÉLULAS U937

Células humanas U937 foram cultivadas *in vitro* conforme metodologia previamente descrita ítem linhagens celulares tumorais. Em resumo: alíquotas de $6,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ foram ressuspensas em 100,0 μ L de PBS e injetada subcutaneamente no dorso de camundongo BALB/c nude, conforme metodologia previamente descrita (CHENG, *et al.*, 2010). Após 5 dias, foi realizada a verificação do aparecimento dos nódulos tumorais, sendo estabelecida a partir de então, a concentração celular que permitisse o aparecimento de lesões para os demais testes.

4.2.5.4. MODELO HETEROTÓPICO SUBCUTÂNEO DE CÉLULAS H460

Células humanas H460 foram cultivadas *in vitro* conforme metodologia previamente descrita ítem linhagens celulares tumorais. Posteriormente, alíquotas de $1,0 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ células para cada animal foi ressuspensa em 100,0 μ L de PBS e injetadas subcutaneamente no dorso de camundongo BALB/c nude, conforme previamente descrito (FABBRI, *et al.*, 2005). Após 5 dias, foi realizada a verificação do aparecimento dos nódulos tumorais, sendo estabelecida a partir de então, a concentração celular que permitisse o aparecimento de lesões para os demais testes.

4.2.5.5. MODELO HETEROTÓPICO SUBCUTÂNEO DE CÉLULAS COLO205

Células COLO205 foram cultivadas *in vitro* conforme metodologia previamente descrita ítem linhagens celulares tumorais. Posteriormente, alíquotas de $5,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ células para cada animal foi ressuspensa em 100,0µL de PBS e injetadas subcutaneamente no dorso de camundongo BALB/c nude, conforme metodologia previamente descrita (LAI, *et al.*, 2012). Após 7 dias, foi realizada a verificação do aparecimento dos nódulos tumorais, sendo estabelecida a partir de então, a concentração celular que permitisse o aparecimento de lesões para os demais testes.

4.2.6. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (DL₅₀) DO COMPLEXO [CU(L1)CL]CL.2H₂O

Um volume de 300,0µL do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O, solubilizado em excipiente composto por PBS+DMSO (v/v =16%), nas doses de 100,0; 80,0; 60,0; 50,0 e 40,0mg/Kg foi inoculado intraperitonealmente em grupos de 8 camundongos Balb/C nude. Aos animais do grupo controle foram administrados 300,0µL do excipiente. Todos os animais foram monitorados por 15 dias para avaliar a mortalidade. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da DL₅₀, utilizando-se do *software* GraphPad Prism V.5.0 e aplicando o teste de regressão não-linear.

4.2.7. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PELA ADMINISTRAÇÃO DE 50% DA DL₅₀ DO COMPLEXO [CU(L1)CL]CL.2H₂O

Para avaliar o efeito tóxico de 50% da DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (25,0 mg/Kg), grupos de 8 animais Balb/C nude foram administrados com três doses consecutivas desta concentração por via intraperitoneal, em intervalos de 6 dias cada dose. Foram conduzidos testes com outros dois grupos de 8 animais, sendo um grupo tratado com o excipiente composto por PBS+DMSO (v/v =16%) e um grupo tratado com 50% da DL₅₀ da cisplatina (3,3 mg/Kg). O peso dos animais foi monitorado a cada 3 dias e no 16º dia após o início do tratamento, os animais foram eutanasiados, necropsiados e o coração, pulmão, baço, rins, fígado e cérebro foram coletados para análises histopatológicas.

4.2.8. TESTES *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO COMPLEXO [CU(L1)CL]CL.2H₂O

Os animais que desenvolveram lesões tumorais aparentes foram separados em grupos e tratados intraperitonealmente para verificar a eficácia dos tratamentos com 50% da DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (25,0 mg/Kg/dose) ou doses terapêuticas dos medicamentos relacionados na literatura para cada tipo de câncer, a saber: doxorubicina (8,0mg/Kg/dose) para o tratamento de lesões de células B16-F10, SK-MEL-5, COLO205 e U937 ou da cisplatina (3,3mg/Kg/dose) para o tratamento de lesões de células H460. Um grupo controle foi tratado apenas com o excipiente composto por PBS+DMSO (v/v =16%). O tempo de tratamento variou de acordo com a agressividade das lesões, sendo interrompido antes que as lesões evoluíssem para óbito dos animais. Os volumes tumorais foram obtidos com base nos diâmetros médios dos tumores, medidos com um paquímetro. A seguinte fórmula foi utilizada para estimar os volumes tumorais:

$$V_{mm^3}=(4\pi R^3)/3$$

Onde R representa o raio médio da lesão, obtido dos diâmetros médios.

Para o ajuste das doses, antes de cada administração do tratamento, os pesos dos animais foram verificados.

4.2.9. AVALIAÇÃO *IN SITU* DA INDUÇÃO DE APOPTOSE E INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Amostras dos tecidos tumorais dos animais tratados e dos grupos controles foram removidas após o término dos tratamentos processadas para as marcações imunohistoquímicas, seguindo as recomendações dos fabricantes. Foi utilizado o anticorpo anti-Ki67 (diluição de 1:100) Genscript (New Jersey, USA) para verificação de proteínas de proliferação celular e o Kit TUNEL Genscript (New Jersey, USA) para a determinação de apoptose *in situ*.

4.2.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos que expressam os resultados, bem como os valores de DL₅₀ foram obtidos através do *software* GraphPad Prism Versão 5.0. Aos resultados obtidos foram aplicados o teste estatístico ANOVA, para verificação da significância entre os dados obtidos. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ DO COMPLEXO [CU(L1)CL]CL.2H₂O

A determinação da DL₅₀ foi realizada em grupos de 48 camundongos Balb/C nude fêmeas, divididos em subgrupos de 8 animais que foram administrado com uma única dose de uma das concentrações do complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O por via intraperitoneal, conforme metodologia previamente descrita na sessão de metodologias. Os valores das porcentagens de sobrevivência para cada uma das concentrações foram calculados após 15 dias da administração do complexo. Estes valores foram utilizados para a determinação da DL₅₀ através do teste de regressão não-linear com ajuste da curva, calculado através do *software* GraphPad Prism V5.0. Conforme pode ser observado na Figura 9, o valor obtido para a DL₅₀ foi de 48,98 mg/Kg. Dentro dos grupos testados, as concentrações de 100, 80 e 60 mg/Kg promoveram a morte de todos os animais tratados com até 72h de administração, enquanto que o grupo tratado com 50mg/Kg apresentou morte de 50% com até 72h de administração e o grupo tratado com 40mg/Kg não apresentou morte.

4.3.2. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPLEXO [CU(L1)CL]CL.2H₂O APÓS ADMINISTRAÇÕES DE DOSES REPETIDAS

A avaliação da toxicidade de 50% da DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (25,0mg/Kg) foi verificada em grupos de 8 animais Balb/C nude e os valores obtidos comparados com um grupo de animais tratados apenas com excipiente constituído por PBS+DMSO (v/v =16%) e outro grupo tratado com 50% da DL₅₀ da cisplatina (3,3mg/Kg). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10, onde se observa que nos grupos tratados com o excipiente e com a cisplatina não houve variação estatisticamente significativa da massa corporal ao longo do tratamento. Por outro lado, após a segunda dose do tratamento com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O, houve redução na massa corporal dos animais, sendo este valor estatisticamente significativo após a terceira dose, atingindo uma redução de 1,71g, equivalente a 6,25% da massa corporal no 15º dia após o início do tratamento.

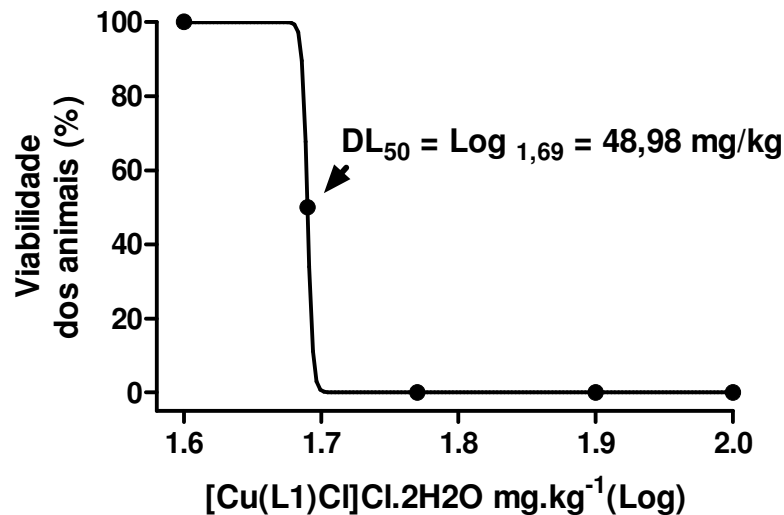


Figura 9. Determinação da DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O. Um grupo de 48 animais Balb/C nude foi tratado intraperitonealmente com concentrações variadas do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O e avaliados por 15 dias quanto à mortalidade. Os dados obtidos foram tratados com o software GraphPad Prism Versão 5.0 utilizando o teste de curva de regressão não-linear com ajuste da curva para determinar a DL₅₀.

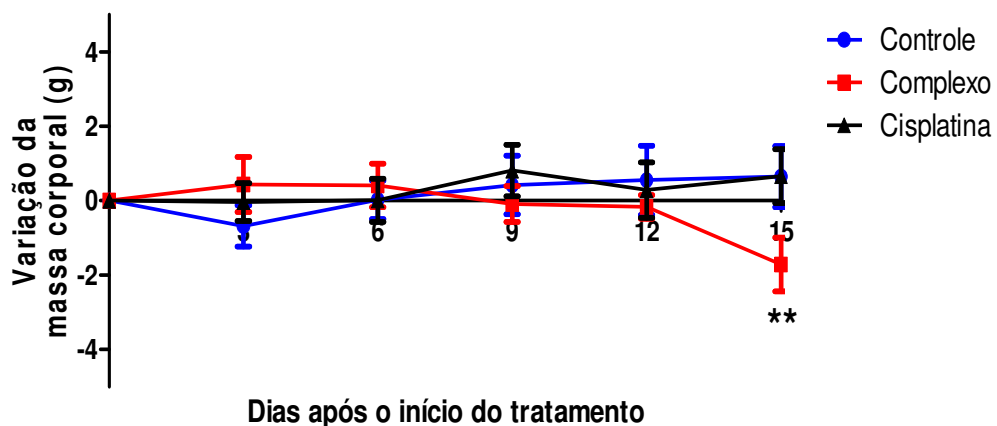


Figura 10. O complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O promove redução da massa corporal de camundongos Balb/C nude tratados com doses seguidas de 50% da DL₅₀. Três grupos cada um com 8 animais Balb/C nude foram tratados nos dias 0, 6 e 12 com o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (25,0mg/Kg), cisplatina (3,3mg/Kg) e controle constituído de PBS+DMSO (v/v =16%). A variação da massa corporal média foi avaliada a cada 3 dias, e os dados obtidos foram tratados com o software GraphPad Prism Versão 5.0 aplicando o teste ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001.

No entanto, mesmo promovendo redução da massa corporal média, o tratamento por 15 dias com 3 doses de 50% da DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O não promoveu morte dos animais tratados, além de não promover lesões

histopatológicas identificáveis nos órgãos coletados (coração, pulmão, baço, rins, fígado e cérebro) após a necropsia (dados não mostrados).

4.3.3. INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES SUBCUTÂNEAS INDUZIDAS POR CÉLULAS B16-F10 EM ANIMAIS TRATADOS COM O COMPLEXO [CU(L1)CL]CL.2H₂O

A reprodução da metodologia adotada para a indução de tumores subcutâneos de células B16-F10 foi bem sucedida. Os animais C57BL/6 inoculados subcutaneamente com $1,0 \times 10^6$ células B16-F10 desenvolveram lesões com volume médio de $4186,67 \pm 425,12 \text{ mm}^3$ no 18º dia após o inóculo (Figura 11). As lesões iniciaram o aparecimento após três dias do inóculo e a sobrevivência média dos animais foi de 21 dias após a indução da lesão subcutânea.

Para avaliar o efeito antineoplásico do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O no modelo murino de câncer de células B16-F10, um grupo de 24 animais C57BL/6 fêmeas de 4 a 6 semanas foi inoculado subcutaneamente com $1,0 \times 10^6$ células veiculadas em 100,0 µl de PBS. Após sete dias de inóculo, os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento das lesões tumorais e aqueles que desenvolveram lesões aparentes foram separados em 3 grupos de 6 animais cada, sendo um grupo controle tratado com o veículo utilizado para solubilizar o complexo constituído por PBS+DMSO (v/v =16%), um grupo tratado com doxorrubicina na dose de 8,0 mg/Kg e um grupo tratado com 50% da DL₅₀ do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (25,0 mg/Kg/dose).

A evolução do tratamento foi avaliada a cada 3 dias. No 12º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados, fotografados (Figura 12) e as lesões removidas, pesadas e fixadas com formol tamponado a 4% para as análises histológicas. As fotografias dos animais do grupo controle (Figura 12-A) mostram que as lesões eram bem aparentes e de fácil medição. Por outro lado, nas fotografias dos tumores dos animais dos grupos tratados com complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (Figura 12-C) e doxorrubicina (Figura 12-B), nota-se que algumas lesões são de difícil visualização e para alguns animais, foi necessário a remoção da pele para visualizar e medir as lesões.

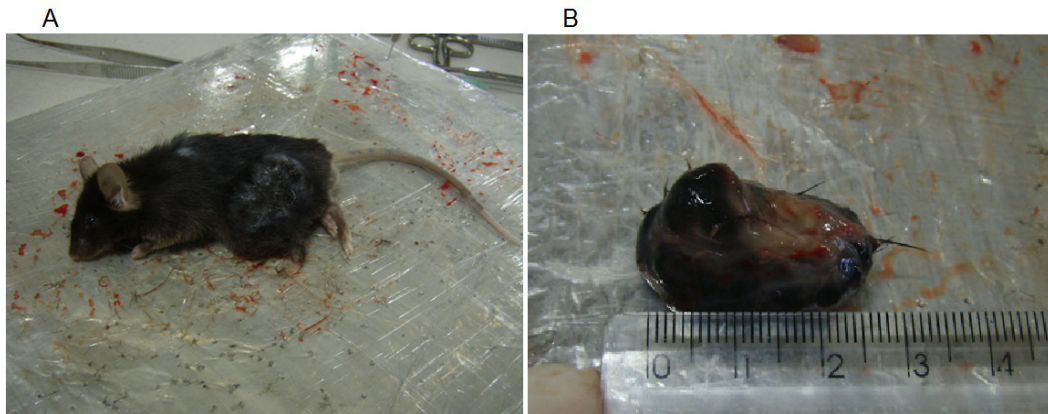


Figura 11. Células B16-F10 promovem lesões subcutâneas em animais C57/BL6. Animais C57BL/6 foram inoculados subcutaneamente com $1,0 \times 10^6$ células B16-F10 e avaliados quanto ao desenvolvimento das lesões tumorais. A- Animal com nódulo tumoral dorsal de 21 dias. B- Nódulo tumoral removido. Colaboração: Msc. Layla Janaína Hissa Borges (UENF).

Os dados obtidos da evolução do volume tumoral médio apontam para uma acentuada atividade antineoplásica do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no tratamento de lesões induzidas no modelo murino de câncer de células B16-F10 (Figura 13). No início do tratamento os grupos controle, doxorrubicina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentavam volumes tumorais médios sem diferenças estatisticamente significativas, com valores de $174,16 \pm 40,58$, $150,89 \pm 33,48$ e $180,89 \pm 55,11 \text{ mm}^3$, respectivamente. Com nove dias de tratamento, as diferenças entre os volumes tumorais médios dos grupos controle ($714,62 \pm 497,36 \text{ mm}^3$) e tratados com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($206,20 \pm 75,84 \text{ mm}^3$) foram estatisticamente significativos.

Com 12 dias de tratamento, o volume tumoral médio dos animais do grupo controle continuaram a aumentar (Figura 13), alcançando o valor de $1866,24 \pm 756,83 \text{ mm}^3$, enquanto que o volume tumoral médio do grupo tratado com a doxorrubicina foi de $376,56 \pm 288,17 \text{ mm}^3$ e do grupo tratado com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se manteve estável em $185,62 \pm 95,28 \text{ mm}^3$. Estes valores indicam que em 12 dias de tratamento, os animais do grupo controle apresentaram um aumento de 10,71 vezes no volume de suas lesões tumorais, enquanto que os animais tratados com doxorrubicina a elevação foi de 2,08 vezes e os animais do grupo tratado com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o volume se manteve praticamente estável, com aumento de apenas 1,23 vezes.

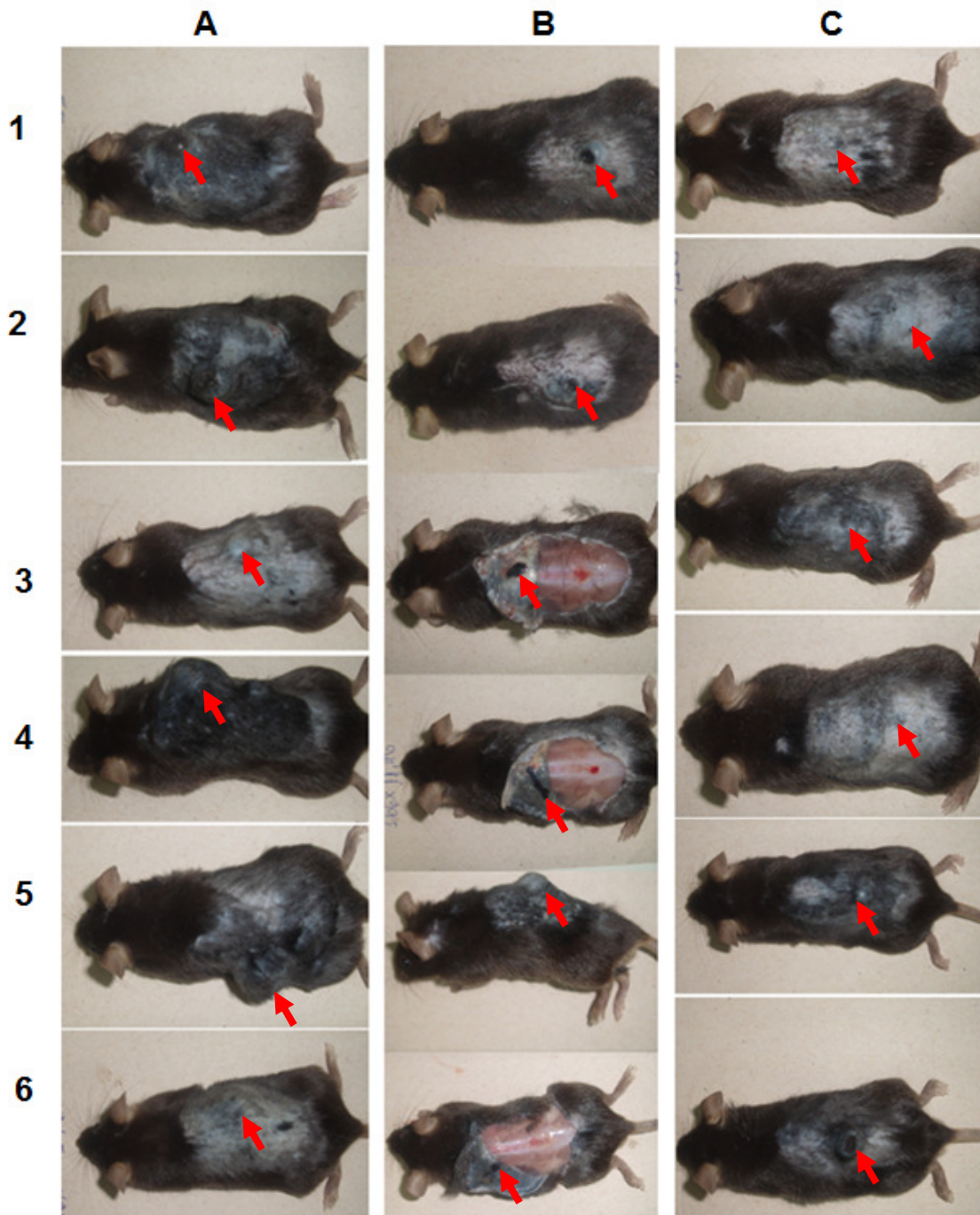


Figura 12. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e doxorubicina inibem o desenvolvimento de lesões tumorais de células B16-F10 em animais C57/BL6. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de $1,0 \times 10^6$ células por animal, em grupos formados por 6 animais C57BL/6 fêmeas com idades entre 4 a 6 semanas. Após sete dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0 mg/kg/dose de doxorubicina, 25mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido após seis dias e os animais fotografados após o 12º dia de início do tratamento. A- Controle, B-Doxorubicina e C-Complexo. As setas apontam os locais das lesões tumorais.

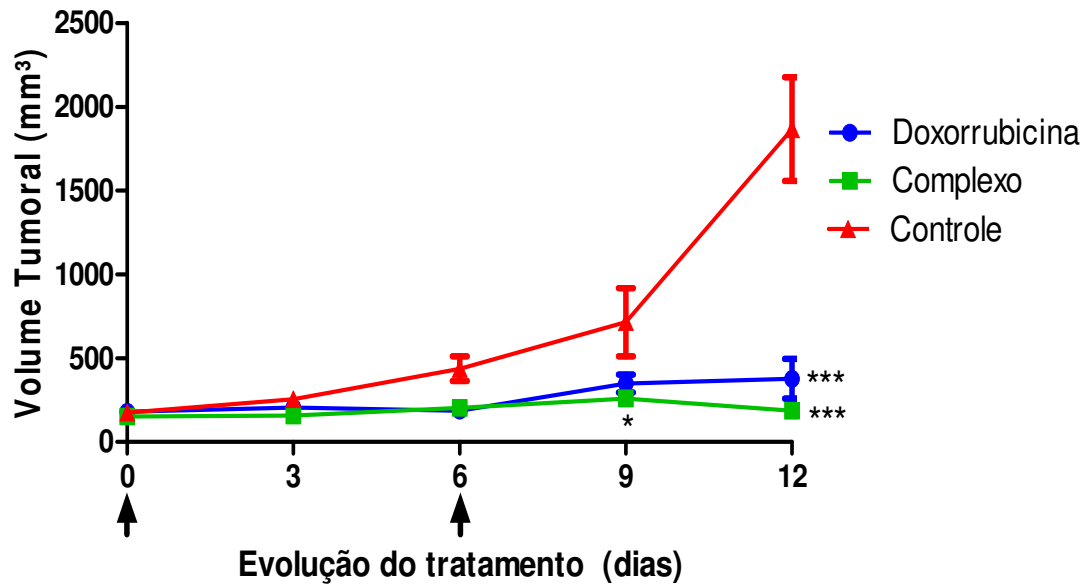


Figura 13. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ inibe o desenvolvimento das lesões de células B16-F10. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de $1,0 \times 10^6$ células por animal, em grupos formados por 6 animais C57BL/6 fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após sete dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0 mg/kg/dose de doxorrubicina, 25mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido após seis dias e os valores representam as médias aritméticas dos volumes tumorais. As setas apontam os dias em que os tratamentos foram administrados. Os dados foram tratados com *software* GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As lesões extraídas no 12º dia após o início do tratamento foram pesadas e os valores estão apresentados na Figura 14. As lesões extraídas dos grupos controle negativo, doxorrubicina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentavam massas médias de 1,225g, 0,293g e 0,183g, respectivamente. Estas diferenças entre as massas dos grupos controle e tratados do doxorrubicina e o complexo foram estatisticamente significativas. A comparação entre os valores das massas tumorais médias permite afirmar que a massa do grupo controle foi 4,28 vezes maior que a do grupo tratado com doxorrubicina e 6,69 vezes maior que a do grupo tratado com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

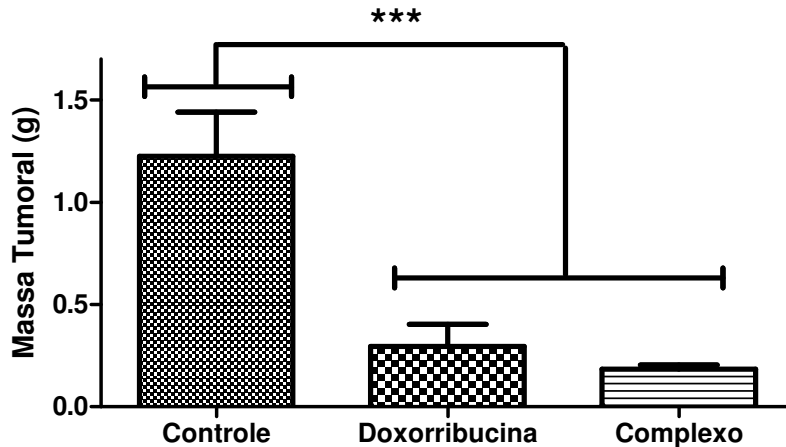


Figura 14. Lesões de células B16-F10 de animais tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam massa menor. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de $1,0 \times 10^6$ células por animal, em grupos formados por 6 animais C57BL/6 fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Cada grupo foi tratado com duas doses de 8,0mg/kg/dose de doxorribucina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v), com intervalos de 6 dias entre as doses. No 12º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados e as lesões removidas e pesadas. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As amostras das lesões tumorais que foram removidas no 12º dia após o tratamento foram processadas para análises histológicas. As amostras dos animais dos grupos tratados com doxorribucina (Figura 15-B) e o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 15-C) apresentam células com grande quantidade de depósitos de melanina, quando comparadas com as lâminas dos tumores sem tratamento (Figura 15-A), onde houve pouca produção de melanina. Esse excesso de produção de melanina inviabilizou a realização de marcações imunohistoquímicas, devido à tonalidade do marcador e da melanina.

4.3.4. INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES SUBCUTÂNEAS INDUZIDAS POR CÉLULAS SK-MEL-5 EM ANIMAIS TRATADOS COM O COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Para o teste da indução das lesões subcutâneas com células de melanoma humano SK-MEL-5, foram inoculadas duas concentrações celulares (5×10^6 e 1×10^7 células). Os animais que receberam 5×10^6 células (Figura 16 – A e B) não apresentaram lesões perceptíveis após 30 dias do inóculo celular. Os animais que foram inoculados com 1×10^7 células (Figura 16 – C e D) apresentaram lesões

aparentes após 15 dias do inóculo e após 30 dias as lesões tinham volumes médios de $395,45 \pm 105,33 \text{mm}^3$.

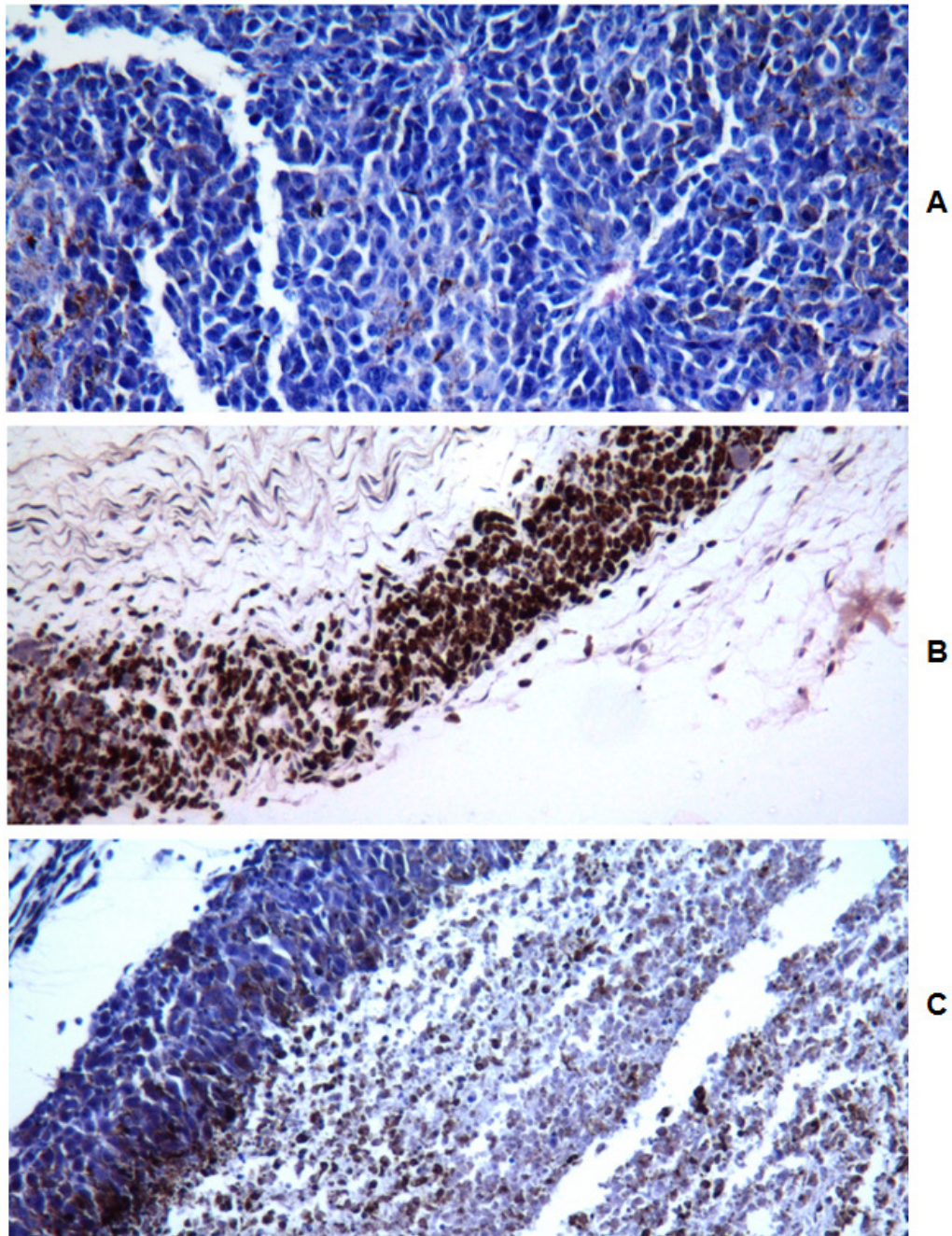


Figura 15. Tratamento de lesões de células B16-F10 com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ induz intensa produção de melanina. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de $1,0 \times 10^6$ células por animal, em grupos formados por 6 animais C57BL/6 fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Cada grupo foi tratado com duas doses de $8,0 \text{mg/kg/dose}$ de doxorribucina, $25,0 \text{mg/Kg/dose}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v), com intervalos de 6 dias entre as doses. No 12º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados, as lesões removidas e preparadas para histologia, com coloração por eosina e hematoxilina. A-Controle, B- Complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, C-Doxorribucina. Os pontos castanhos representam depósitos de melanina.

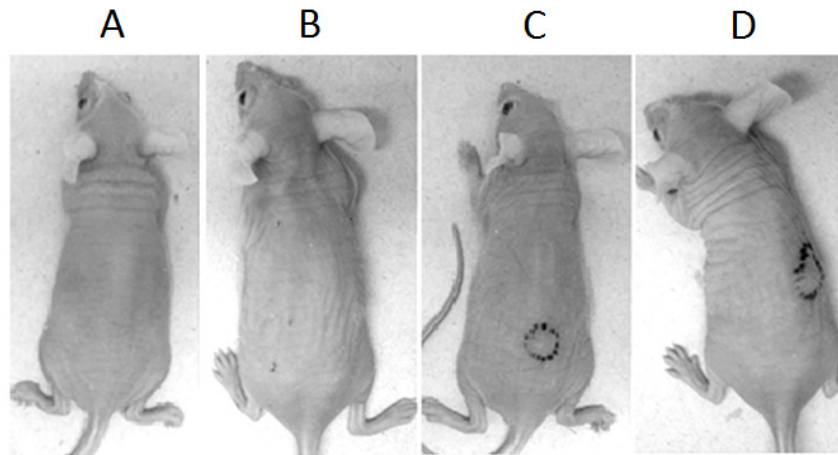


Figura 16. Células SK-MEL-5 induzem lesões subcutâneas em animais balb/C nude. Animais Balb/C nude fêmeas foram inoculadas com as células SK-MEL-5 e avaliados quanto ao desenvolvimento e volume tumoral. No 30º dia após o inóculo, os animais foram fotografados. Os animais 1 e 2 foram inoculados com $5,0 \times 10^6$ e os animais 3 e 4 com 1×10^7 células.

Para avaliar o efeito antineoplásico do complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no modelo murino de melanoma de células SK-MEL-5, um grupo de 24 animais Balb/C nude fêmeas de 4-6 semanas foi inoculado subcutaneamente com 1×10^7 células veiculadas em $100 \mu\text{l}$ de PBS. Após o 30º dia de inóculo, os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento das lesões tumorais, sendo reservados 12 animais com lesões aparentes, que foram distribuídos em três grupos de quatro animais cada, sendo um grupo controle tratado com o veículo utilizado para solubilizar o complexo constituído por PBS+DMSO (16% v/v), um grupo tratado com doxorrubicina na dose de $8,0 \text{ mg/Kg}$ e um grupo tratado com 50% da DL_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($25,0 \text{ mg/Kg/dose}$), sendo administrado em cada tratamento um volume de $300,0 \mu\text{l}$ por via intraperitoneal. A evolução do tratamento foi avaliado a cada 3 dias, e cada animal recebeu 4 doses do tratamento nos dias 0, 6, 12 e 18. No 41º dia após o início do tratamento os animais foram sacrificados, fotografados (Figura 17) e as lesões removidas, pesadas e fixadas em formol tamponado a 4% para as análises imunohistoquímicas.

As fotografias dos animais do grupo controle (Figura 17-A) mostram lesões bem aparentes e com dimensões maiores que as dos demais grupos. Quando as lesões foram removidas e fotografadas, tornou mais fácil comparar as dimensões dos tumores, permitindo observar que os tumores extraídos dos animais tratados com doxorrubicina (Figura 17-B) e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 17-C) eram menores que as lesões dos animais do grupo controle (Figura 17-A).

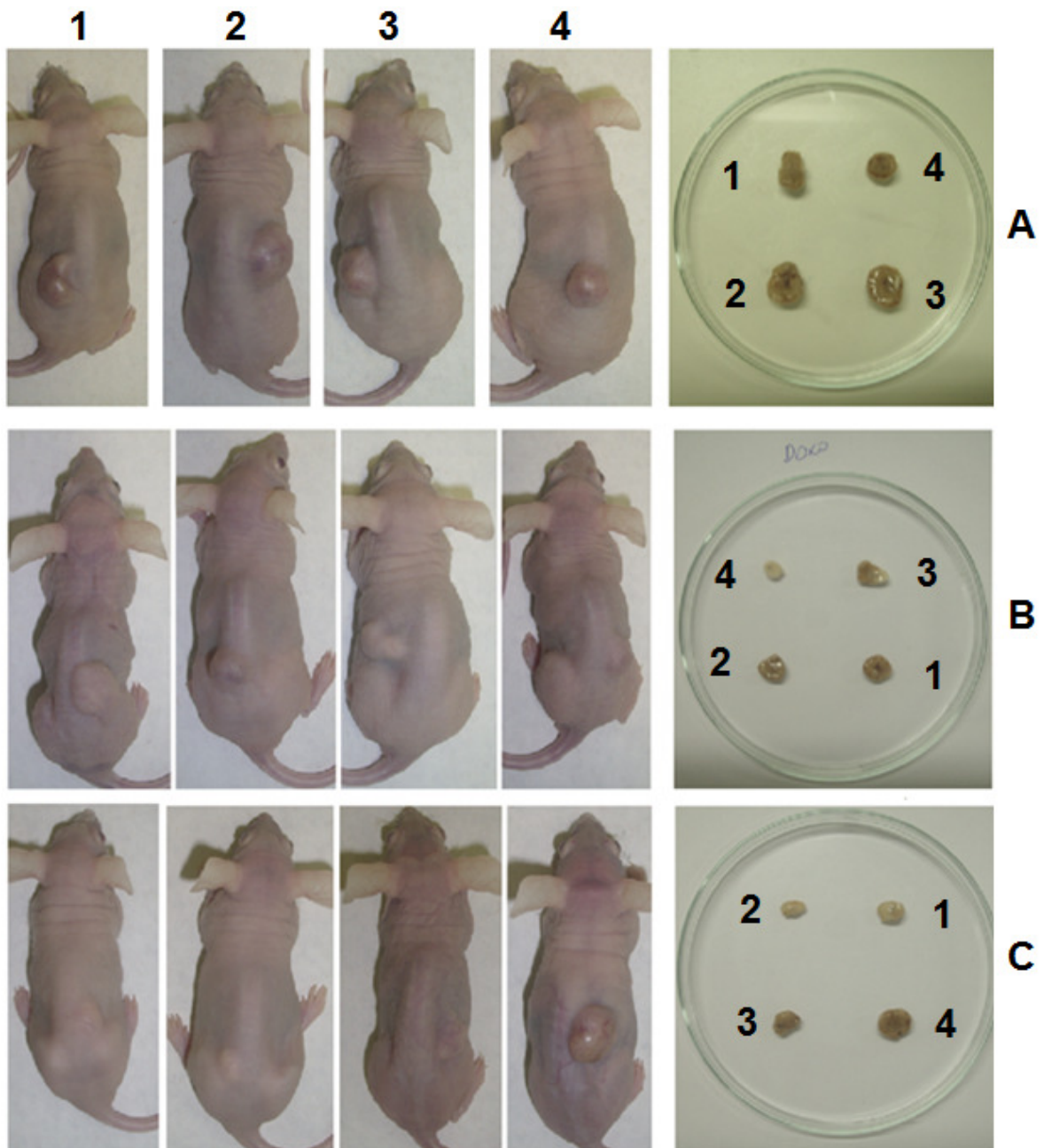


Figura 17. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}.2\text{H}_2\text{O}$ inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células SK-MEL-5 em animais Balb/C nude. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 1×10^7 células por animal, em grupos formados por 4 animais Balb/C nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 30 dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0mg/kg/dose de doxorubicina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}.2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido três vezes em intervalos de seis dias e os animais fotografados no 41º dia após o início do tratamento. A- Controle C1, B-Doxorubicina e C-Complexo.

Os dados obtidos do acompanhamento do volume tumoral médio demonstram que o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}.2\text{H}_2\text{O}$ tem potencial terapêutico para tratamento de

lesões induzidas no modelo murino de câncer de células SK-MEL-5 (Figura 18). No início do tratamento os grupos controle, doxorrubicina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentavam volumes tumorais médios sem diferenças estatisticamente significativas, com valores de $183,3\pm 26,3$, $159,3\pm 30,5$ e $156,2\pm 27,2\text{mm}^3$, respectivamente. Após 33 dias de tratamento, as diferenças entre os volumes tumorais médios dos grupos controle ($718,3\pm 229,15\text{mm}^3$) e tratados com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($283,7\pm 69,8\text{mm}^3$) foram estatisticamente significantes, apontando o efeito antineoplásico do tratamento com esta droga. Este efeito tornou-se mais notável após o dia 36, quando a diferença estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratado com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ obteve valores de $p < 0,001$. A eficácia da doxorrubicina no tratamento de lesões induzidas por células H460 só foi observada 41 dias após o início do tratamento, quando as diferenças entre os volumes tumorais médios dos grupos controle ($1374,8\pm 256,31\text{mm}^3$) e tratados com o doxorrubicina ($934,15\pm 103,85\text{mm}^3$) foram estatisticamente significativas. Os valores obtidos ao término do tratamento apontam volumes tumorais médios de $1374,8\pm 187,31\text{mm}^3$, $934,15\pm 103,85\text{mm}^3$ e $500,1\pm 122,3\text{mm}^3$ para os grupos controle, doxorrubicina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. Estes valores indicam que em 41 dias de tratamento, os animais do grupo controle apresentaram um aumento de 7,5 vezes no volume de suas lesões tumorais, enquanto que os animais tratados com doxorrubicina a elevação foi de 5,98 vezes e os animais do grupo tratado com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o volume teve aumento de 3,13 vezes.

As lesões extraídas no 41º dia após o início do tratamento foram pesadas e os valores estão apresentados na Figura 19. As lesões extraídas para os grupos controle negativo, doxorrubicina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram massas de $0,479\pm 0,087\text{g}$, $0,189\pm 0,021\text{g}$ e $0,155\pm 0,063\text{g}$, respectivamente. Entre os valores encontrados para os grupos tratados com doxorrubicina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o grupo controle, há uma diminuição do crescimento da massa tumoral de forma estatisticamente significativo. A comparação entre os valores das massas tumorais médias permite afirmar que a massa do grupo controle foi 2,53 vezes maior que a do grupo tratado com doxorrubicina e 3,09 vezes maior que a do grupo tratado com o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

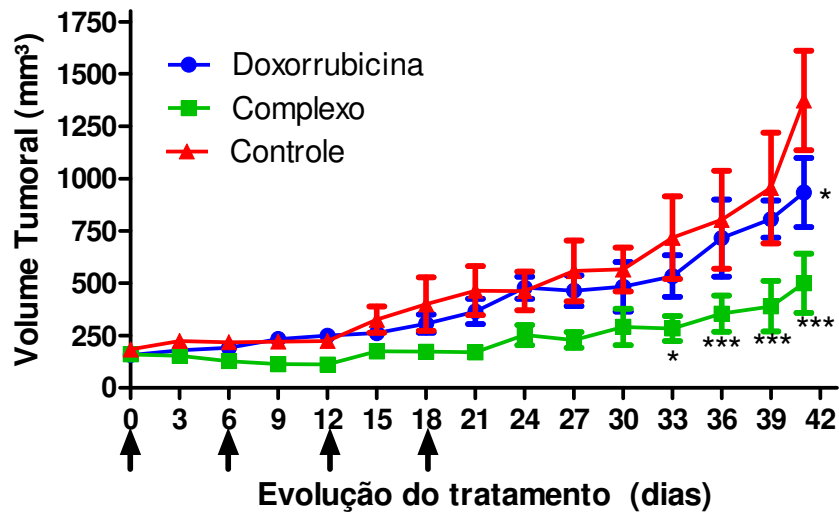


Figura 18. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ inibe o desenvolvimento das lesões de células SK-MEL-5. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 1×10^7 células por animal, em grupos formados por 4 animais Balb/C nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 30 dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0mg/kg/dose de doxorubicina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido três vezes com intervalos de seis dias e os valores representam as médias aritméticas dos volumes tumorais. As setas apontam os dias em que os tratamentos foram administrados. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

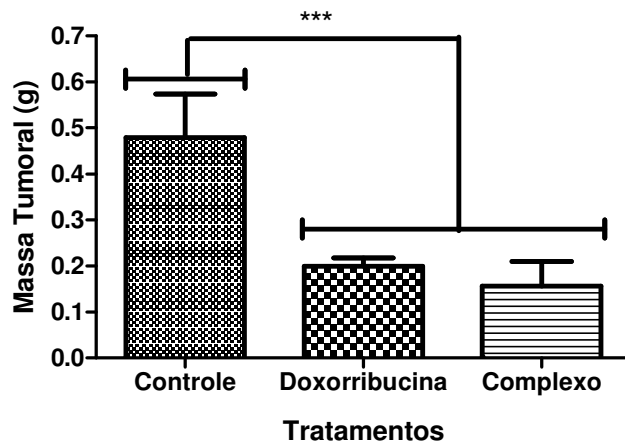


Figura 19. Lesões de células SK-MEL-5 de animais tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam massa menor. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 1×10^7 células por animal, em grupos formados por 4 animais Balb/C fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Cada grupo foi tratado com três doses de 8,0 mg/Kg/dose de doxorubicina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v), com intervalos de 6 dias entre as doses. No 41º dia os animais foram sacrificados e as lesões removidas e pesadas. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para confirmar os efeitos induzidos pelos tratamentos, foram processadas análises imunohistoquímicas das amostras tumorais removidas no 41º dia após o início do tratamento. As amostras foram processadas para o marcador de proliferação celular Ki-67 e para o marcador de morte celular *in situ* através do teste de TUNEL. Os resultados obtidos das análises imunohistoquímicas para o marcador Ki-67 permitem concluir que nas amostras tratadas tanto com doxorrubicina (Figura 20-B) quanto com o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 20-C), há uma proporção menor de núcleos marcados positivamente para Ki-67 (marrons) em relação a núcleos marcados negativamente para proliferação (azul), quando comparados com as amostras das lesões do grupo controle (Figura 20-A). As micrografias foram divididas em quatro quadrantes e as proporções de núcleos marcados positivamente para Ki-67 (marrons) e negativamente (azul) foram determinadas por simples contagem e obtenção das porcentagens finais, expressas na Figura 20-D. Os dados de proporção de proliferação celular, obtidos pelo marcador Ki-67, confirmam o efeito inibidor da proliferação, com redução estatisticamente significativa da proliferação celular nos grupos tratados com doxorrubicina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 20-D). Porém, entre estes dois últimos grupos não foram percebidas diferenças estatisticamente significantes entre os volumes.

Os resultados obtidos da marcação de TUNEL estão apresentados na Figura 21, na qual são observadas raras marcações para morte celular por apoptose nas amostras dos grupos controle (Figura 21-A), tratado com doxorrubicina (Figura 21-B) e tratado com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 21-C).

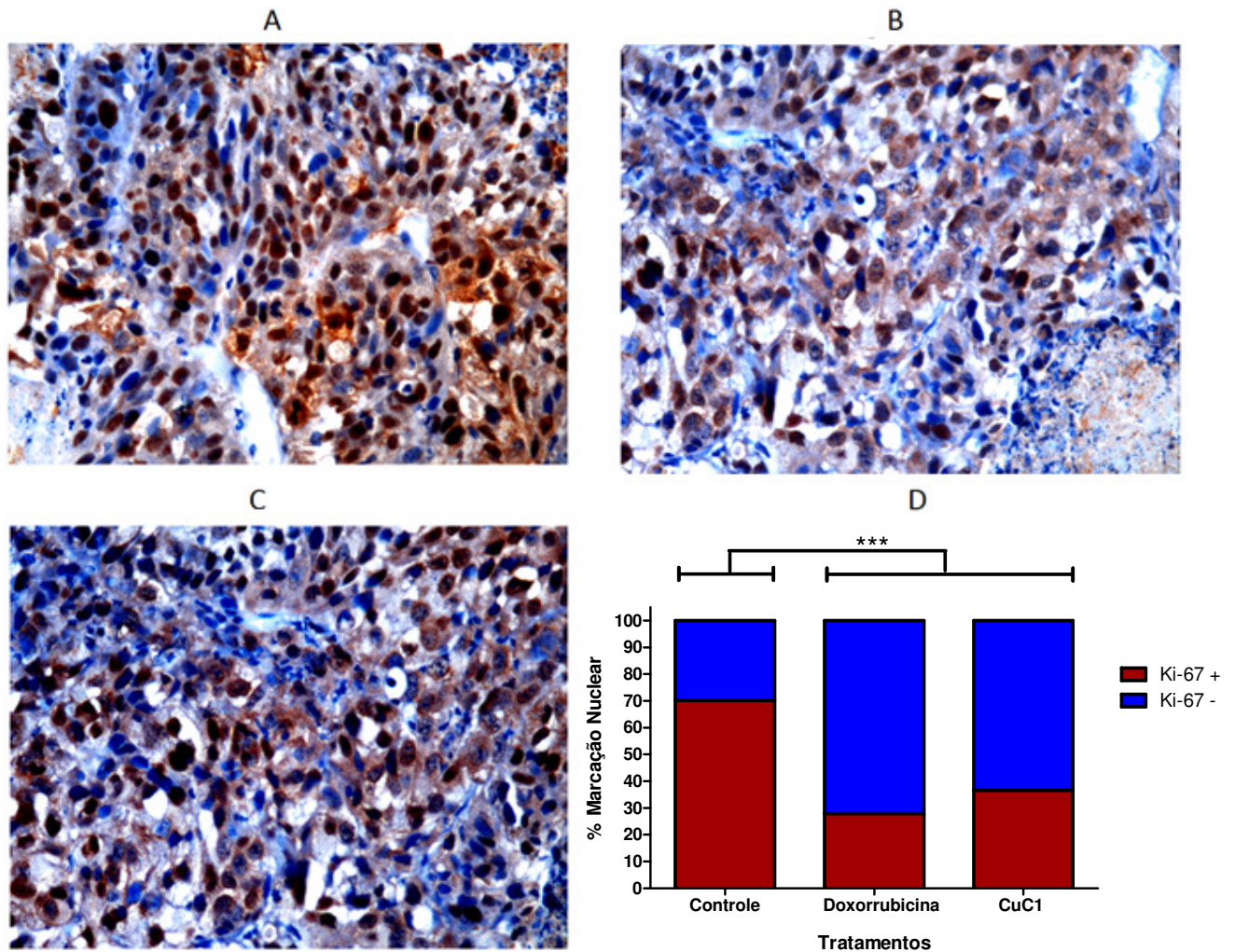


Figura 20. Tratamento de lesões de células SK-MEL-5 com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam redução na marcação com Ki-67. As lesões de tumores de células SK-MEL-5 foram coletadas no 41^o dia após o início do tratamento e processadas para imunohistoquímica, sendo as amostras registradas por micrografias ópticas. A- Micrografia de uma amostra controle, B- Micrografia de uma amostra de animal tratado com doxorubicina, C- Micrografia de uma amostra de um animal tratado com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. D- Porcentagens entre núcleos marcados positivamente ou negativamente para Ki-67. Os valores de porcentagens foram tratados com o software GraphPad Prism V.5.0 e analisados estatisticamente com o teste ANOVA. ** Representa os valores estatisticamente significantes com $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

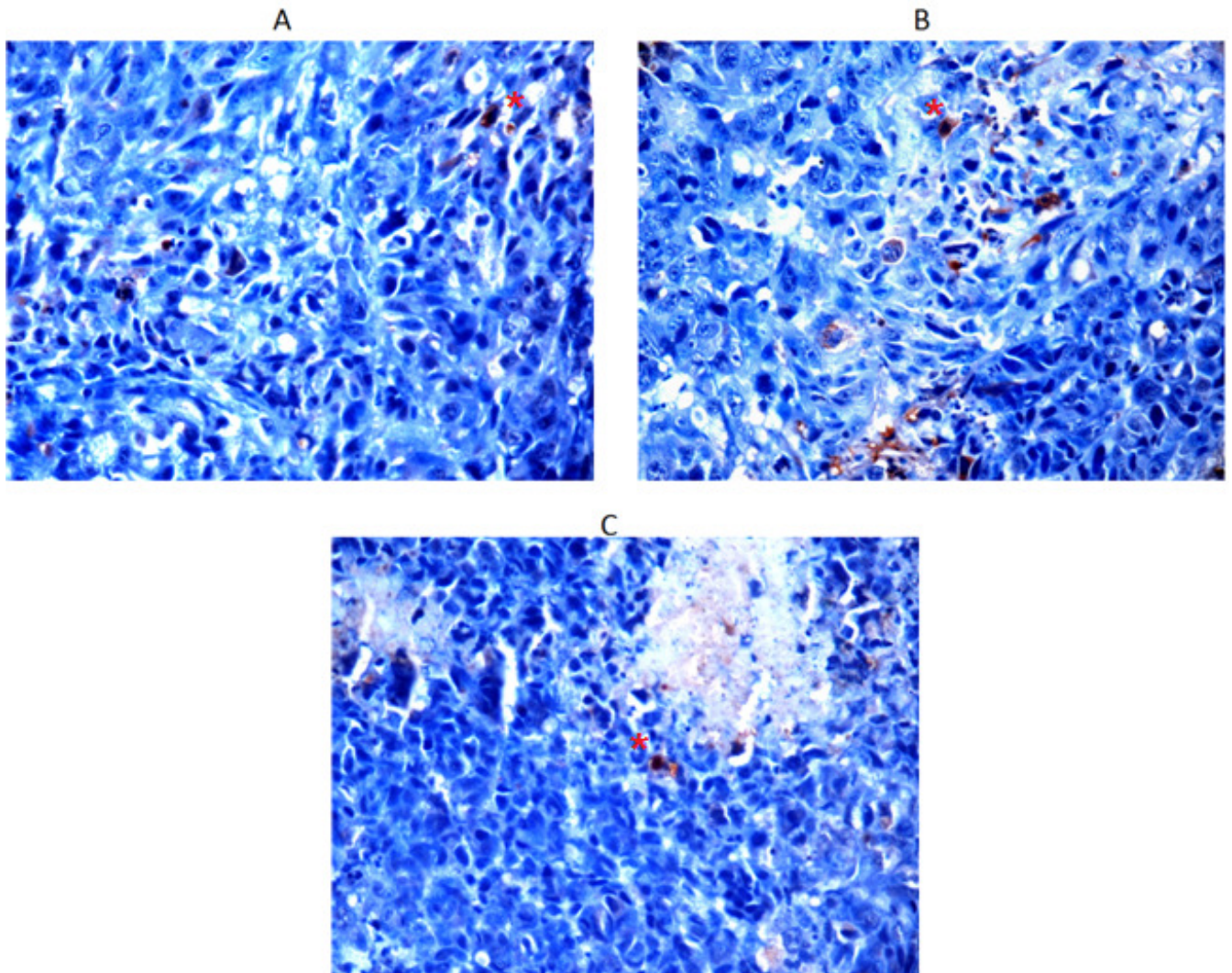


Figura 21. Tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ induz pouca marcação para TUNEL em lesões de células SK-MEL-5. As lesões de tumores de células SK-MEL-5 foram coletadas no 41º dia após o início do tratamento e processadas para imunohistoquímica pelo método de TUNEL, sendo as amostras registradas por micrografias ópticas. A- Micrografia de uma amostra controle, B- Micrografia de uma amostra de animal tratado com doxorubicina, C- Micrografias de amostras de animais tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O símbolo * representa as marcações positivas para TUNEL.

4.3.5. INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES SUBCUTÂNEAS INDUZIDAS POR CÉLULAS H460 EM ANIMAIS TRATADOS COM O COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Os animais Balb/C Nude inoculados com as células H460 de câncer de pulmão humano desenvolveram lesões subcutâneas de acordo com as metodologias adotadas. Na Figura 22 estão apresentadas as fotografias dos animais após 30 dias de inóculo celular. Os animais A e B foram inoculados com $1,0 \times 10^6$ e os animais C e D com $5,0 \times 10^6$ células. Após o 5º dia de inóculo, as lesões já se mostravam aparentes e com 30 dias as lesões obtidas foram bem evidentes e com

diâmetros médios de $829,61 \pm 325,12 \text{ mm}^3$ e $1703,42 \pm 425,38 \text{ mm}^3$, respectivamente, para as concentrações celulares de $1,0 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$.

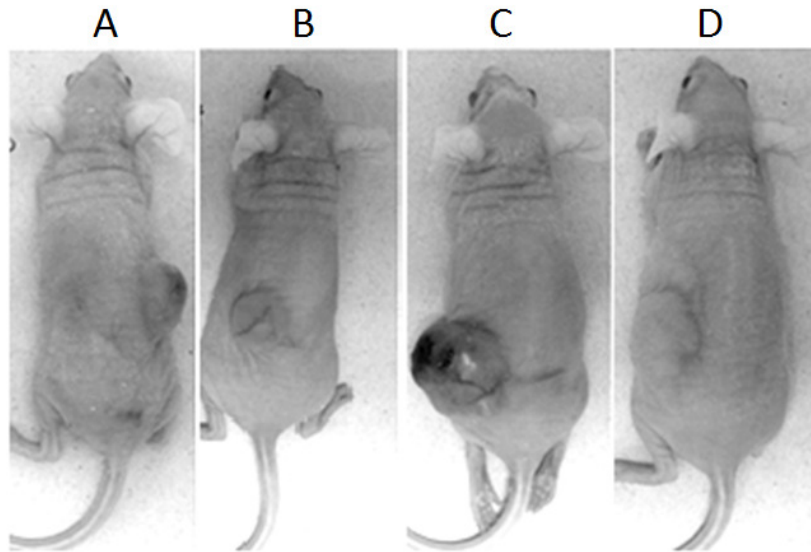


Figura 22. Células H460 induzem lesões subcutâneas em animais Balb/C nude. Animais Balb/C nude fêmeas de 4 semanas foram inoculados com as células H460 e avaliados quanto ao desenvolvimento e diâmetro tumoral. Após 30 dias do inóculo celular, os animais foram sacrificados e fotografados. Os animais A e B foram inoculados com $1,0 \times 10^6$ e os animais C e D com $5,0 \times 10^6$ células.

Para avaliar o efeito antineoplásico do complexo $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no modelo murino de câncer de células H460, um grupo de 24 animais Balb/C nude fêmeas de 4-6 semanas foi inoculado subcutaneamente com 5×10^6 células veiculadas em $100 \mu\text{l}$ de PBS. Após o 5º dia de inóculo, os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento das lesões tumorais, onde foram reservados 18 animais com lesões aparentes que foram distribuídos em 3 grupos de 6 animais cada, sendo um grupo controle tratado com o veículo utilizado para solubilizar o complexo constituído por PBS+DMSO (16% v/v), um grupo tratado com cisplatina na dose de 3,3 mg/Kg e um grupo tratado com 50% da DL50 do complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25,0 mg/Kg/dose), sendo administrado em cada tratamento um volume de $300 \mu\text{l}$ por via intraperitoneal, recebendo os animais um novo tratamento após 7 e 14 dias do início do tratamento. A evolução do tratamento foi avaliado a cada 3-4 dias. No 17º dia após o início do tratamento os animais foram sacrificados, fotografados (Figura 23) e as lesões removidas, pesadas e reservadas em formol tamponado a 4% para as análises histológicas.

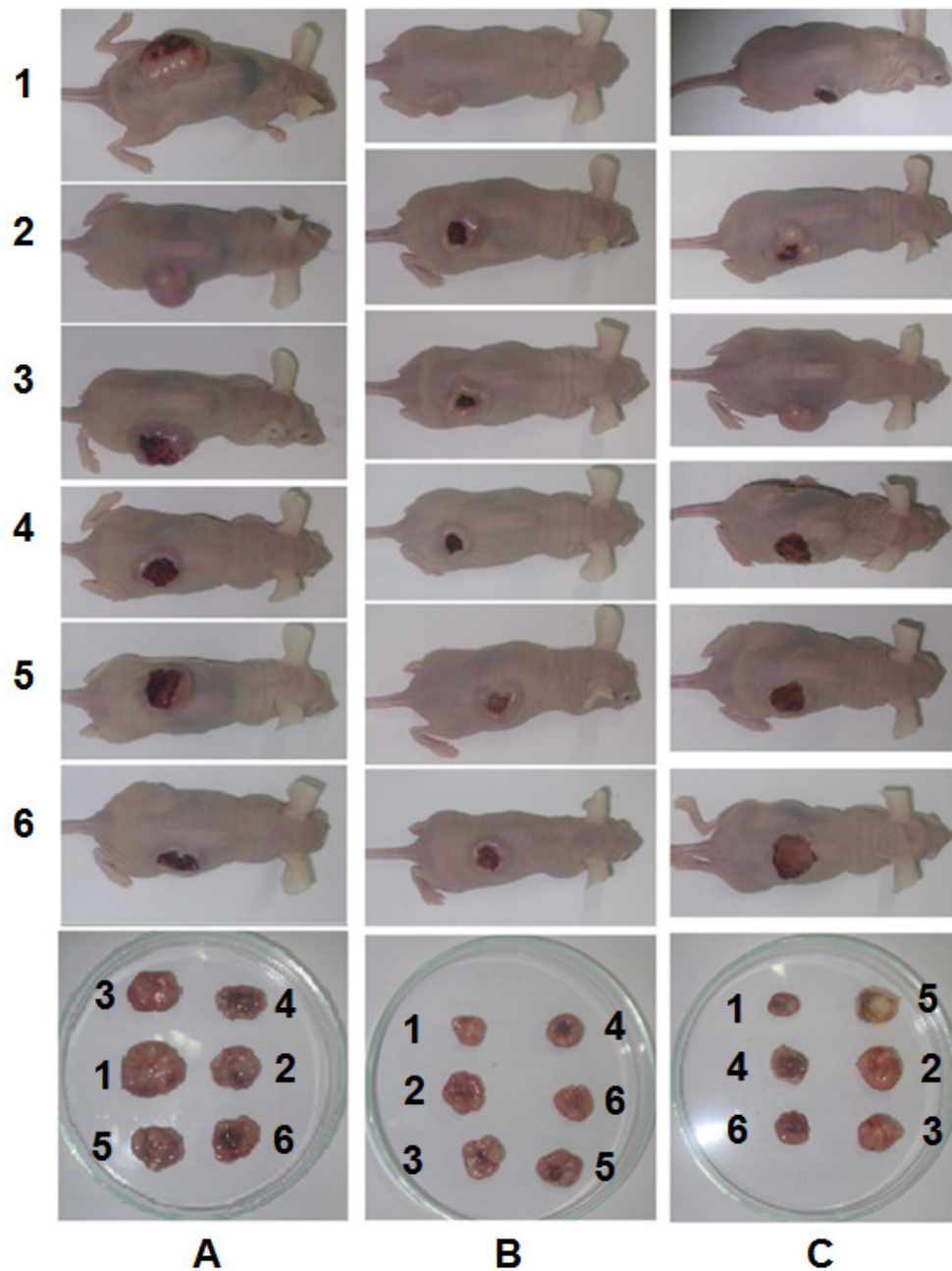


Figura 23. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células H460 em animais Balb/C nude. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de $5,0 \times 10^6$ células por animal, em grupos formados por 6 animais Balb/C nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após cinco dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 3,3 mg/kg/dose de cisplatina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido duas vezes após sete dias e os animais fotografados no 17^o dia após o início do tratamento. A- Controle, B-Cisplatina e C-Complexo.

As fotografias dos animais do grupo controle (Figura 23-A) mostram lesões bem aparentes e com dimensões maiores que as dos demais grupos. Quando as lesões foram removidas e fotografadas, tornou mais fácil comparar as dimensões dos tumores, permitindo observar que os tumores extraídos dos animais tratados

com cisplatina (Figura 23-B) e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 23-C) eram menores que as lesões dos animais do grupo controle (Figura 23-A).

Os dados obtidos do acompanhamento do volume tumoral médio demonstram que o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tem potencial terapêutico para tratamento de lesões induzidas no modelo murino de câncer de células H460 (Figura 24). No início do tratamento os grupos controle, cisplatina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentavam volumes tumorais médios sem diferenças estatisticamente significativas, com valores de $122,89\pm 87,53$, $91,22\pm 17,93$ e $118,11\pm 38,33\text{mm}^3$, respectivamente. Após sete dias de tratamento, as diferenças entre os volumes tumorais médios dos grupos controle ($1155,31\pm 124,90\text{mm}^3$) e tratados com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($505,45\pm 116,56\text{mm}^3$) foram estatisticamente significativas, apontando o efeito antineoplásico do tratamento com esta droga. A eficácia do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no tratamento de lesões induzidas por células H460 começou após o décimo dia de tratamento, quando as diferenças entre os volumes tumorais médios dos grupos controle ($1957,01\pm 331,52\text{mm}^3$) e tratados com o cisplatina ($1209,08\pm 295,66\text{mm}^3$) foram estatisticamente significativas. Os valores obtidos ao término do tratamento apontam volumes tumorais médios de $2729,93\pm 521,65\text{mm}^3$, $1229,69\pm 67,54\text{mm}^3$ e $1084,86\pm 48,26\text{mm}^3$ para os grupos controle, complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e cisplatina, respectivamente. Estes valores indicam que em 17 dias de tratamento, os animais do grupo controle apresentaram um aumento de 21,41 vezes no volume de suas lesões tumorais, enquanto que os animais tratados com cisplatina a elevação foi de 11,49 vezes e os animais do grupo tratado com o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o volume teve aumento de 10,15 vezes.

As lesões extraídas no 17º dia após o início do tratamento foram pesadas e os valores estão apresentados na Figura 25, sendo as massas das lesões extraídas para os grupos controle negativo, cisplatina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de $0,850\pm 0,166\text{g}$, $0,409\pm 0,047\text{g}$ e $0,442\pm 0,122\text{g}$. Entre os valores encontrados para os grupos tratados com cisplatina e o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o grupo controle, há uma diminuição no crescimento da massa tumoral de forma estatisticamente significativa. A comparação entre os valores das massas tumorais médias permite afirmar que a massa do grupo controle foi 2,07 vezes maior que a do grupo tratado com cisplatina e 1,81 vezes maior que a do grupo tratado com o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

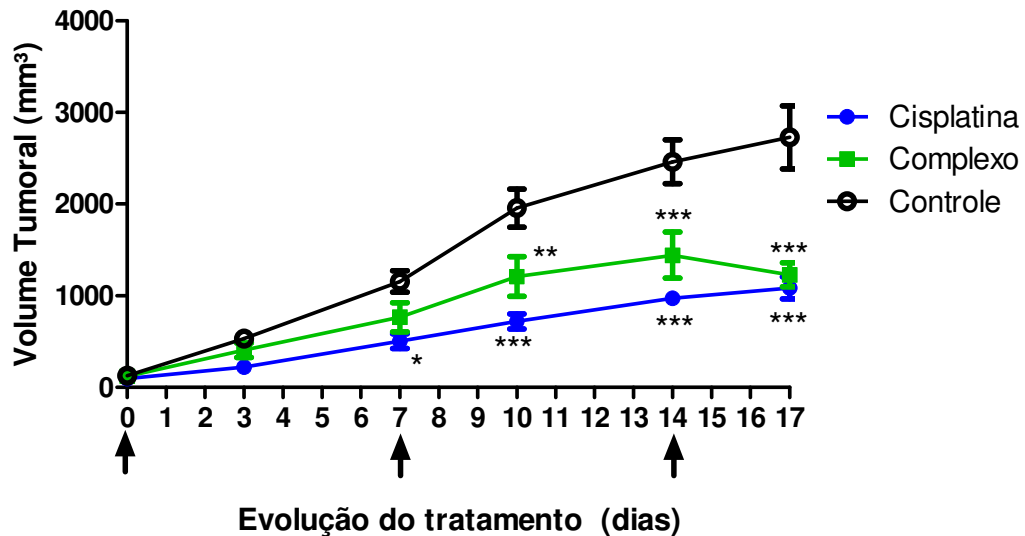


Figura 24. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ inibe o desenvolvimento das lesões de células H460. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 5×10^6 células por animal, em grupos formados por 6 animais Balb/C nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após sete dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 3,3mg/kg/dose de cisplatina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido duas vezes com intervalos de sete dias. As setas apontam os dias em que os tratamentos foram administrados. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

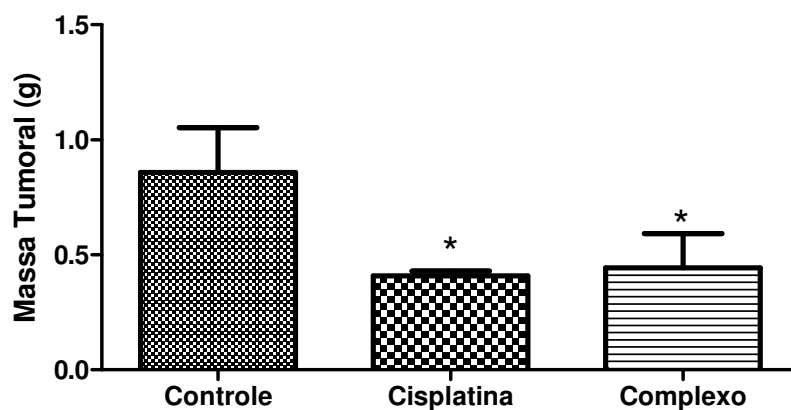


Figura 25. Lesões de células H460 de animais tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam massa menor. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 5×10^6 células por animal, em grupos formados por 6 animais Balb/C fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Cada grupo foi tratado com três doses de 3,3mg/Kg/dose de cisplatina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v), com intervalos de 7 dias entre as doses. No 17º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados e as lesões removidas e pesadas. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para confirmar os efeitos induzidos pelos tratamentos, foram processadas análises imunohistoquímicas das amostras tumorais removidas no 17º dia após o início do tratamento. As amostras foram processadas para o marcador de proliferação celular Ki-67 e para o marcador de morte celular *in situ* através do teste de TUNEL. Os resultados obtidos das análises imunohistoquímicas para o marcador Ki-67 permitem concluir que nas amostras tratadas tanto com cisplatina (Figura 26-B) quanto com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 26-C), há uma proporção menor de núcleos marcados positivamente para Ki-67 (marrons) em relação a núcleos marcados negativamente para proliferação (azul), quando comparados com as amostras das lesões do grupo controle (Figura 26-A). As micrografias foram divididas em quatro quadrantes e as proporções de núcleos marcados positivamente para Ki-67 (castanhos) e negativamente (azul) foram determinadas por simples contagem e obtenção das porcentagens finais, expressas na Figura 26-D. O valor das proporções de proliferação celular, obtidos pelo marcador Ki-67, confirmam o efeito inibidor da proliferação, com redução estatisticamente significativa da proliferação celular nos grupos tratados com cisplatina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 26-D). Entre os grupos tratados com cisplatina e o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto à proliferação celular.

Os resultados obtidos da marcação de TUNEL estão apresentados na Figura 22, na qual não se observa marcações para morte celular por apoptose nas amostras dos grupos controle (Figura 27-A) e tratado com cisplatina (Figura 27-B), sustentando os dados obtidos e justificando o crescimento tumoral progressivo observado nestes grupos ao longo de todo tratamento (Figura 24), apesar do crescimento observado para o grupo tratado com cisplatina ser menor do que o observado para o grupo controle. Surpreendentemente, as amostras tumorais obtidas dos animais tratados com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figuras 27 C e D) apresentam células marcadas para apoptose, demonstrando que este tratamento promove morte das células tumorais no modelo murino de câncer de células H460.

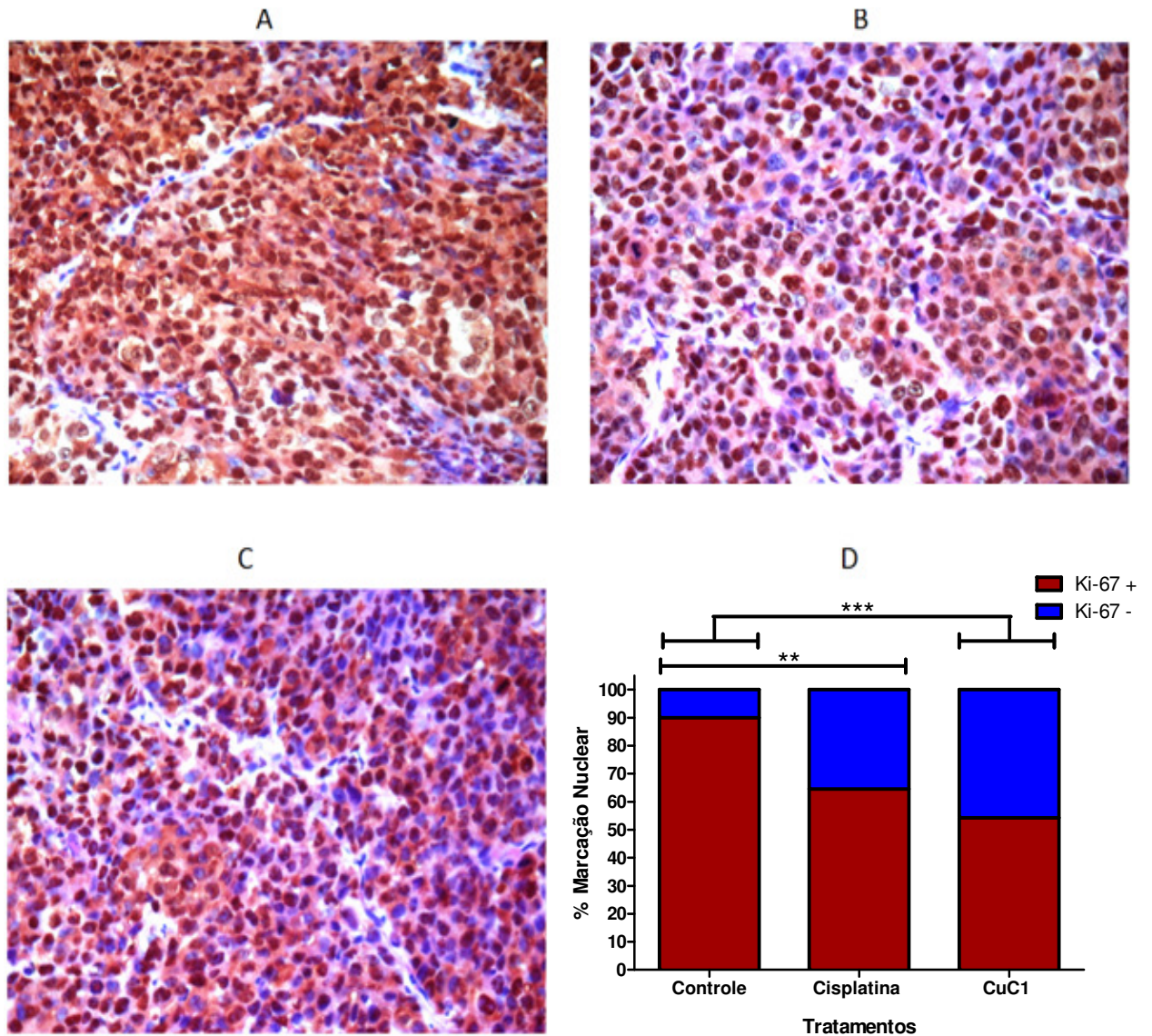


Figura 26. Tratamento de lesões de células H460 com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam redução na marcação com Ki-67. As lesões de tumores de células H460 foram coletadas no 17^o dia após o início do tratamento e processadas para imunohistoquímica, sendo as amostras registradas por micrografias ópticas. A- Micrografia de uma amostra controle, B- Micrografia de uma amostra de animal tratado com cisplatina, C- Micrografia de uma amostra de um animal tratado com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. D- Porcentagens entre núcleos marcados positivamente ou negativamente para Ki-67. Os valores de porcentagens foram tratados com o software GraphPad Prism V.5.0 e analisados estatisticamente com o teste ANOVA. ** Representa os valores estatisticamente significantes com $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

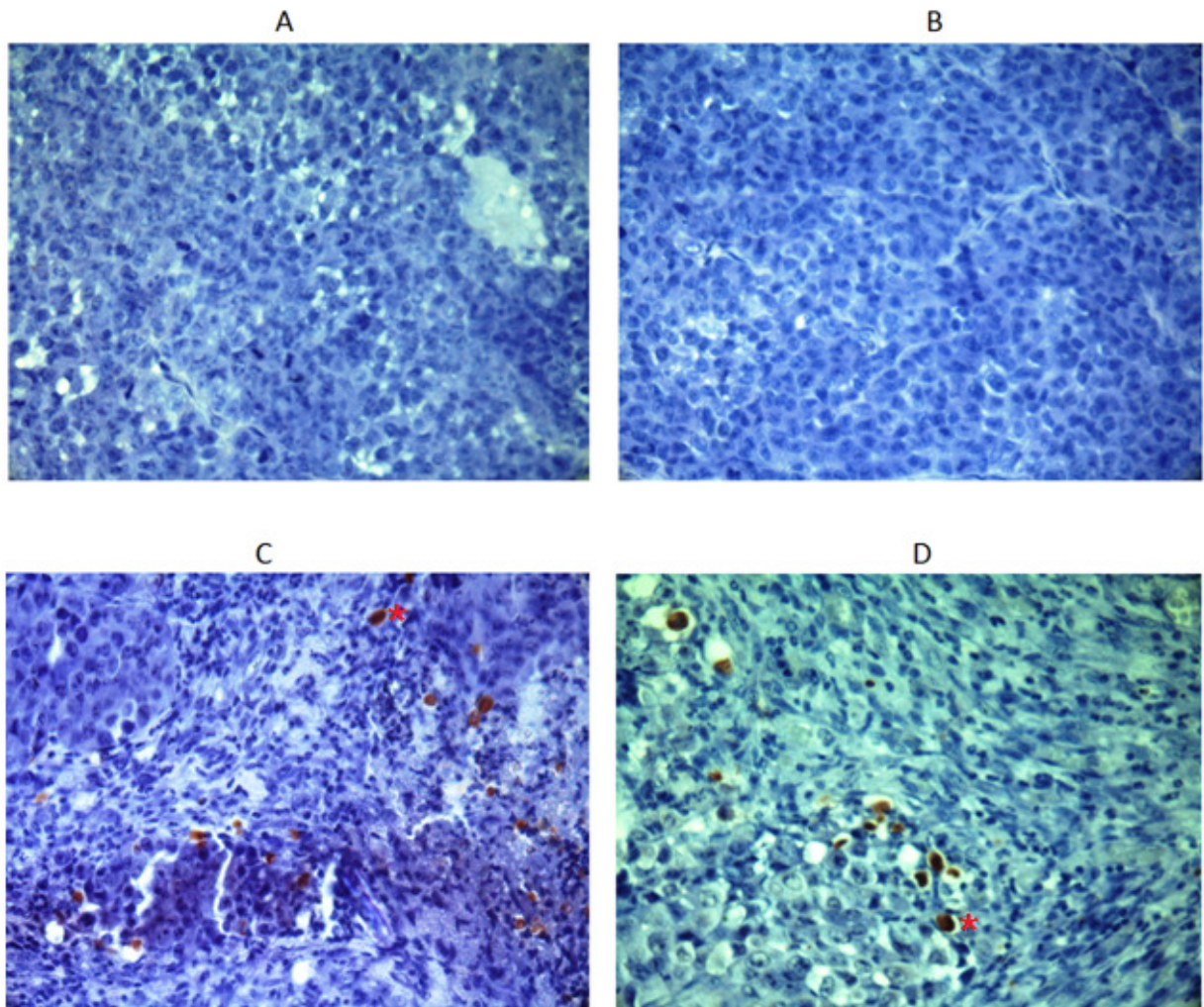


Figura 27. Tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ induz pouca marcação para TUNEL em lesões de células H460. Análises imunohistoquímicas de apoptose *in situ* pelo método de TUNEL. As lesões de tumores de células H460 foram coletadas no 17º dia após o início do tratamento e processadas para imunohistoquímica pelo método de TUNEL, sendo as amostras registradas por micrografias ópticas. A- Micrografia de uma amostra controle, B- Micrografia de uma amostra de animal tratado com cisplatina, C e D - Micrografias de amostras de animais tratados com complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O símbolo * representa as marcações específicas para TUNEL.

4.3.6. O COMPLEXO DE COBRE $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ NÃO EXIBE EFEITO ANTINEOPLÁSICO EM LESÕES SUBCUTÂNEAS INDUZIDAS POR CÉLULAS COLO205

As lesões apresentadas pelo inóculo das células COLO205 por 30 dias estão apresentadas na Figura 28. Os animais inoculados com $5,0 \times 10^6$ células (Figura 28 – A e B) apresentavam lesões com volumes médios de $6859,00 \pm 1452,22 \text{mm}^3$ e os animais inoculados com 1×10^7 células (Figura 28 - C e D) exibiam lesões com volumes médios de $13566,42 \pm 3225,75 \text{mm}^3$. As lesões desenvolvidas pelas células

COLO205 já eram visíveis após 3 dias de inóculo celular, evoluindo rapidamente após o 20º dia.

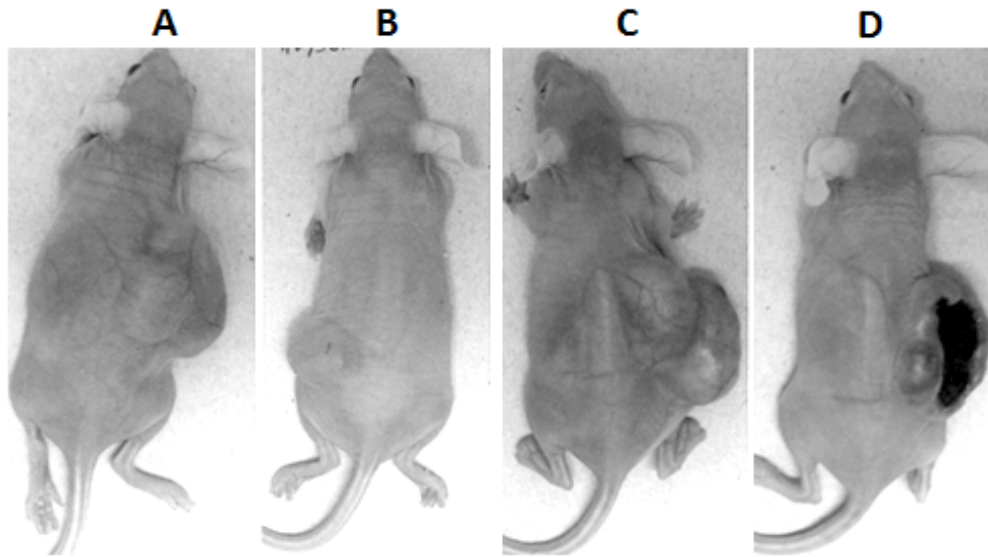


Figura 28. Células COLO205 induzem lesões tumorais em camundongos Blab/C nude. Animais nude foram inoculados com as células COLO205 e avaliados quanto ao desenvolvimento e volume tumoral. No 30º dia após o inóculo, os animais foram fotografados. Os animais A e B foram inoculados com 5×10^6 e os animais C e D com 1×10^7 células.

Para avaliar o efeito antineoplásico do complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no modelo murino de células COLO205, um grupo de 24 animais Balb/C nude fêmeas de 4-6 semanas foi inoculado subcutaneamente com 5×10^6 células veiculadas em 100µl de PBS. Após o 7º dia de inóculo, os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento das lesões tumorais, sendo reservados 15 animais com lesões aparentes, que foram subdivididos em 3 grupos de 5 animais cada, onde o grupo controle foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar o complexo constituído por PBS+DMSO (16% v/v), um grupo foi tratado com doxorrubicina na dose de 8,0 mg/Kg e um grupo tratado com 50% da DL50 do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25,0 mg/Kg/dose). Os tratamentos foram administrados em um volume de 300,0µl por via intraperitoneal. A evolução do tratamento foi avaliada a cada 3 dias, recebendo os animais um novo tratamento após o 6º dia do início do tratamento. No 12º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados, fotografados (Figura 29) e as lesões removidas e pesadas.

As fotografias dos animais dos grupos controle (Figura 29-A) e tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mostraram lesões bem aparentes e com dimensões bem aproximadas. Por outro lado, as lesões dos animais tratados com doxorrubicina

(Figura 29-B) apresentaram-se menores do que as dos demais grupos, demonstrando que o tratamento com doxorrubicina apresentou efeito antineoplásico no modelo murino de células COLO205.

Os resultados obtidos do acompanhamento do volume tumoral médio demonstram que o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não apresentou potencial terapêutico para tratamento de lesões induzidas no modelo murino de câncer de células COLO205 (Figura 30). No início do tratamento os grupos controle, doxorrubicina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentavam volumes tumorais médios sem diferenças estatisticamente significativas, com valores de $155,3\pm 2,92$, $143,1\pm 4,77$ e $174,3\pm 1,51\text{mm}^3$, respectivamente. Durante todo o tratamento, o grupo doxorrubicina apresentou pouca variação no volume tumoral médio, chegando ao final do tratamento com volume tumoral médio de $197,1\pm 21,22\text{mm}^3$, o que demonstra o potencial terapêutico desta droga. Quando comparado ao grupo controle, com 12 dias de tratamento, os animais do grupo doxorrubicina apresentavam volume tumoral médio 2,56 vezes menor que o grupo controle, sendo esta redução de volume estatisticamente significativo. Por outro lado, os animais do grupo complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram volume tumoral médio 1,29 vezes inferiores ao grupo controle, não sendo esta redução estatisticamente significativo. Do início para o final do tratamento, os volumes tumorais médios dos grupos controle, doxorrubicina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aumentaram 3,25, 1,34 e 2,26 vezes, respectivamente.

As lesões extraídas no 12º dia após o início do tratamento foram pesadas e os valores estão apresentados na Figura 31. As lesões extraídas para os grupos controle negativo, doxorrubicina e complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram massas médias de $0,069\pm 0,018\text{g}$, $0,016\pm 0,008\text{g}$ e $0,064\pm 0,025\text{g}$, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas entre as massas tumorais médias foram observadas apenas entre os grupos controle e tratado com doxorrubicina, sendo a massa do último grupo 4,31 vezes menor que a do primeiro.

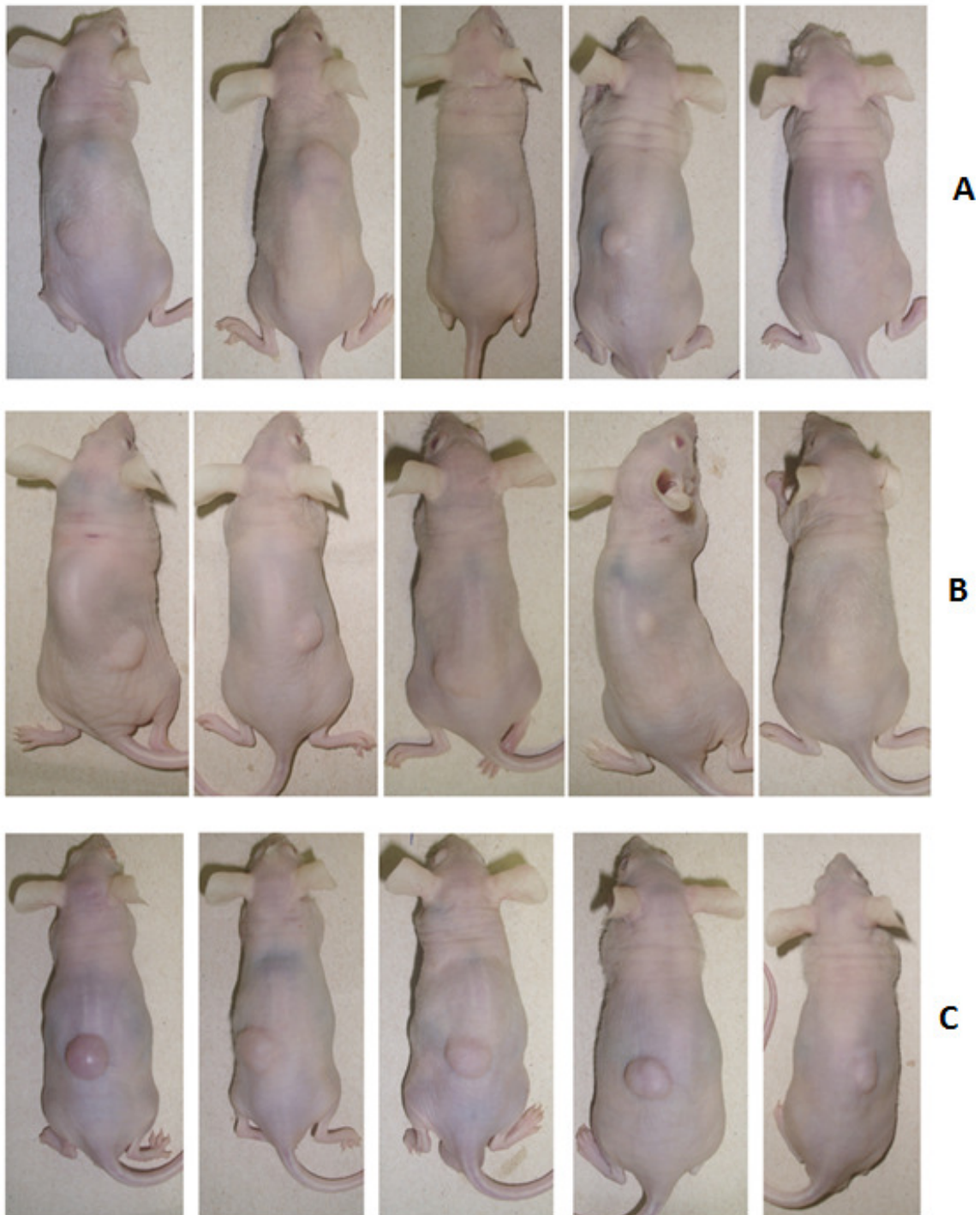


Figura 29. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células COLO205 em animais Balb/C nude. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 5×10^6 células por animal, em grupos formados por 5 animais Balb/C nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 7 dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0mg/kg/dose de doxorrubicina, 25,0mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido uma vez após seis dias do início e os animais fotografados no 12º dia após o início do tratamento. A- Controle, B-Doxorrubicina e C-Complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

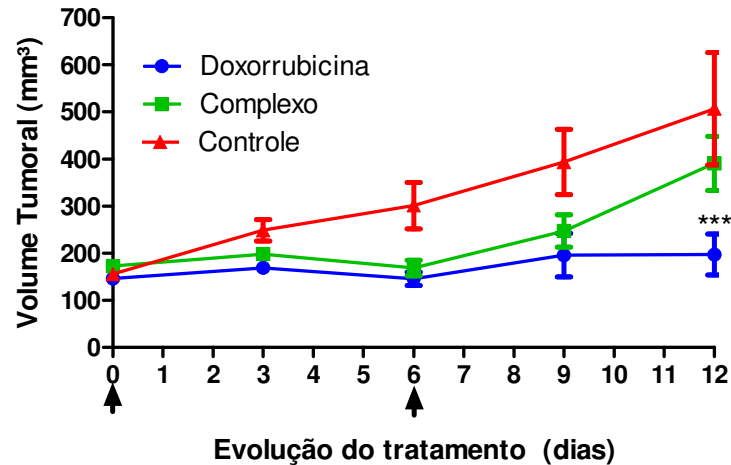


Figura 30. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não inibe o desenvolvimento das lesões de células COLO205. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 5×10^6 células por animal, em grupos formados por 5 animais Balb/C nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 7 dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0 mg/kg/dose de doxorubicina, 25,0 mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido uma vez após seis dias do início e os valores representam as médias aritméticas dos volumes tumorais. As setas apontam os dias em que os tratamentos foram administrados. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

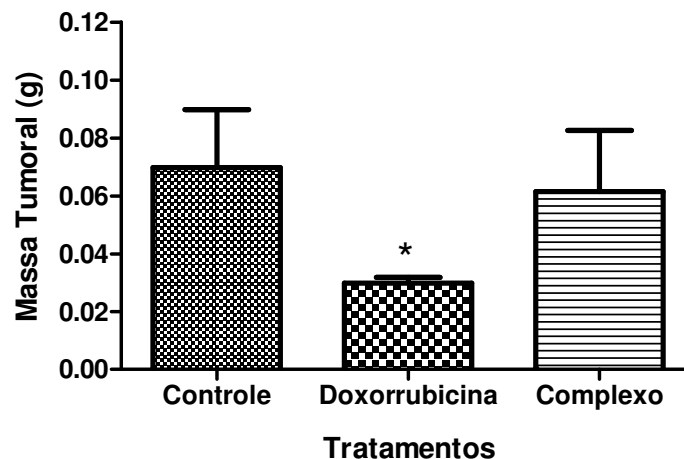


Figura 31. Lesões de células COLO205 de animais tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam massa equivalente aos animais não tratados. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 5×10^6 células por animal, em grupos formados por 5 animais Balb/C fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Cada grupo foi tratado com duas doses de 8,0 mg/Kg/dose de doxorubicina, 25,0 mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v), com intervalos de 6 dias entre as doses. No 12º dia os animais foram sacrificados e as lesões removidas e pesadas. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.3.7. O COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ NÃO EXIBE EFEITO ANTINEOPLÁSICO EM LESÕES SUBCUTÂNEAS INDUZIDAS POR CÉLULAS U937

As lesões apresentadas pelo inóculo das células U937 por 21 dias estão apresentadas na Figura 32. Os animais inoculados com 1×10^7 células (Figura 32 – A e B) apresentavam lesões com volumes médios de $19907,94 \pm 7355,17 \text{mm}^3$ e os animais inoculados com 6×10^6 células (Figura 32 - C e D) exibiam lesões com volumes médios de $3546,58 \pm 1566,21 \text{mm}^3$. As lesões desenvolvidas pelas células U937 já eram visíveis após 5 dias de inóculo celular, período a partir do qual os animais foram tratados.

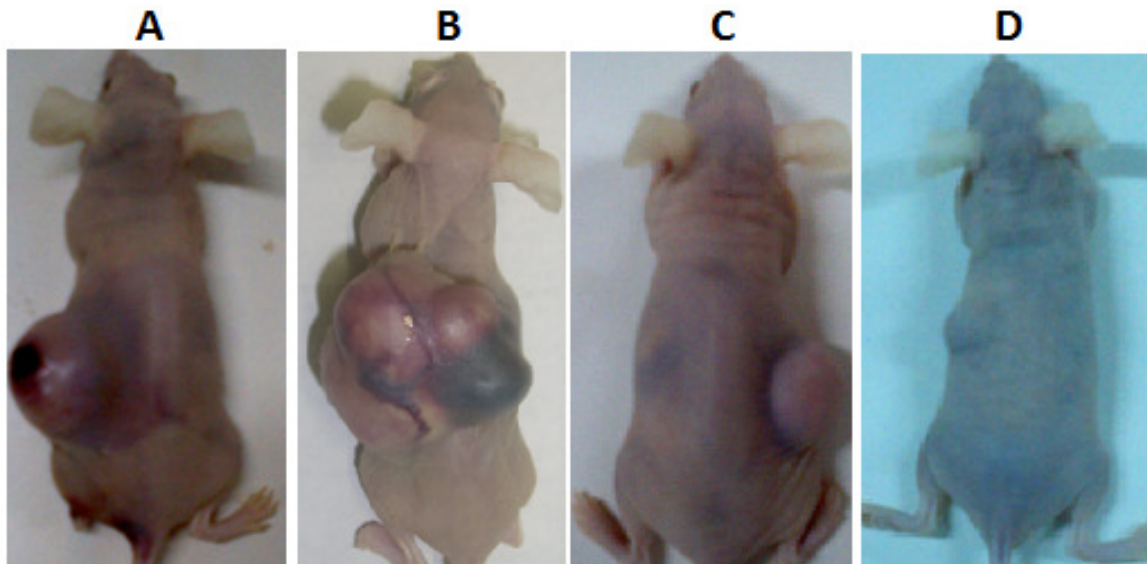


Figura 32. Células U937 induzem lesões tumorais em camundongos Balb/C nude. Animais nude foram inoculados com as células U937 e avaliados quanto ao desenvolvimento e volume tumoral. Os animais foram fotografados no 30º dia após o inóculo celular. Os animais A e B foram inoculados com 1×10^7 e os animais C e D com 6×10^6 células.

Para avaliar o efeito antineoplásico do complexo $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no modelo murino de células U937, um grupo de 24 animais Balb/C nude fêmeas de 4-6 semanas foi inoculado subcutaneamente com 6×10^6 células veiculadas em $100 \mu\text{l}$ de PBS. Após o 5º dia de inóculo, os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento das lesões tumorais, sendo reservados 18 animais com lesões aparentes, que foram subdivididos em 3 grupos de 6 animais cada, onde o grupo controle foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar o complexo constituído por PBS+DMSO (16% v/v), um grupo foi tratado com doxorrubicina na dose de 8,0 mg/Kg e um grupo tratado com 50% da DL_{50} do complexo de cobre

[Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (25,0 mg/Kg/dose). Os tratamentos foram administrados em um volume de 300µl por via intraperitoneal. A evolução do tratamento foi avaliada a cada 3 dias, recebendo os animais um novo tratamento após o 6º dia do início do tratamento. No 12º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados, fotografados (Figura 33) e as lesões removidas e pesadas.

As fotografias dos animais, após o término do tratamento (Figura 33), revelam similaridades em relação ao volume tumoral de todos os grupos testados, com pequenas variações em alguns animais dentro de cada grupo.

Os dados obtidos do acompanhamento do volume tumoral médio sugerem que o complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O não exibe potencial terapêutico para tratamento de lesões induzidas no modelo murino de câncer de células U937 (Figura 34). No início do tratamento os grupos controle, doxorrubicina e complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O apresentavam volumes tumorais médios sem diferenças estatisticamente significativo, com valores de 797,4±51,2, 814,5±74,2 e 672,6±65,7mm³, respectivamente. Durante todo o tratamento, a doxorrubicina não exibiu efeito antineoplásico sobre as lesões, apresentando desenvolvimento semelhante ao grupo controle, atingindo o volume tumoral médio de 2490,4±1125,65mm³ no 12º dia de tratamento, valor não estatisticamente diferente do obtido para o grupo controle negativo, que exibiu volume tumoral médio de 2566,8±321,8mm³.

Apesar do volume tumoral médio do grupo tratado com o complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O apresentar uma tendência de desenvolvimento tumoral menor do que o grupo controle, ao final do tratamento o volume tumoral médio do grupo controle foi de 1920,5±128,15mm³, não sendo este valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Quanto ao desenvolvimento das lesões, o volume tumoral do grupo controle, doxorrubicina e complexo de cobre [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O aumentaram 3,21, 3,06 e 2,84 vezes, respectivamente.

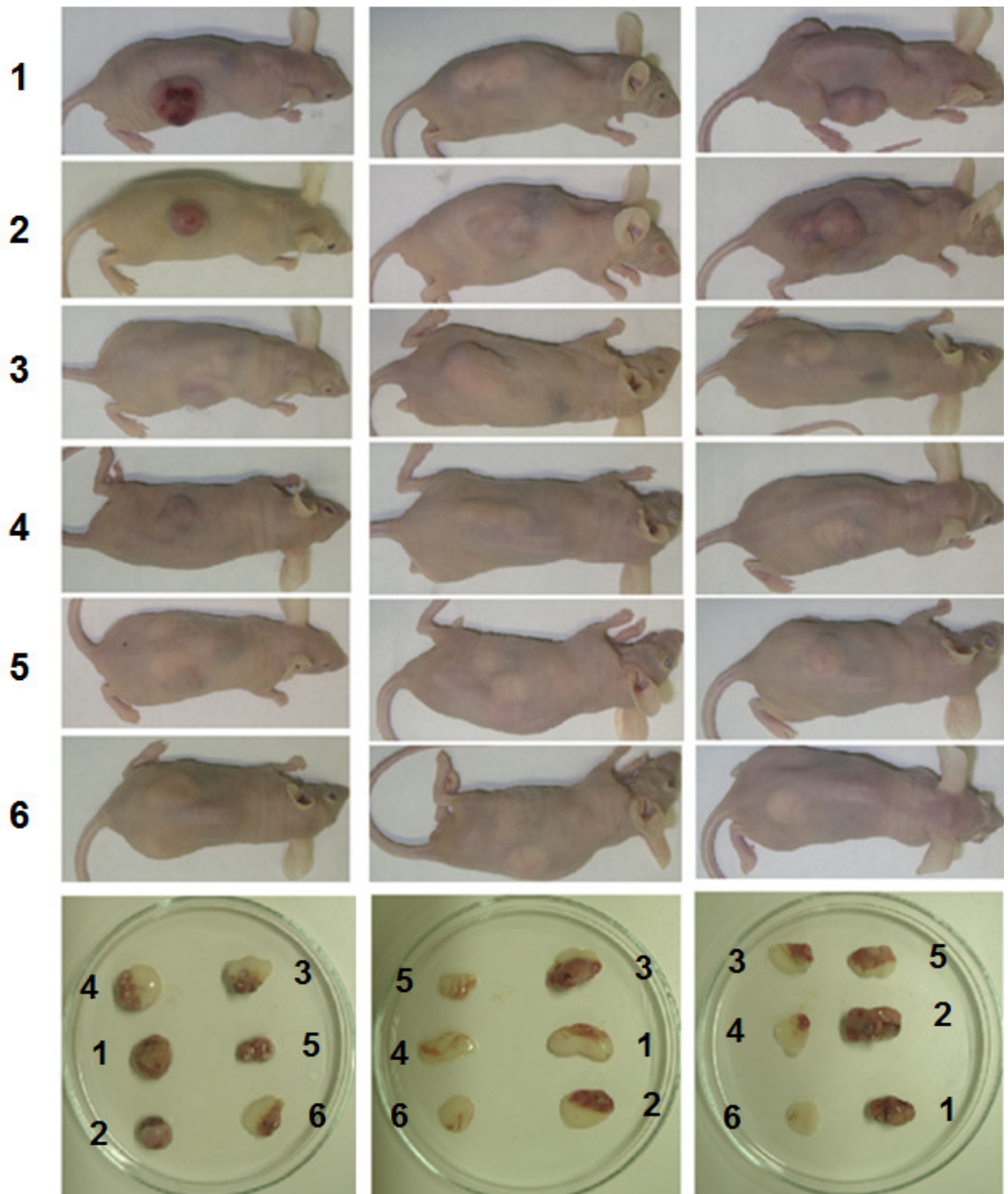


Figura 33. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células U937 em animais Balb/C nude. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 6×10^6 células por animal, em grupos formados por 6 animais Balb/C Nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 5 dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0 mg/kg/dose de doxorrubicina, 25,0 mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido uma vez após seis dias do início e os animais fotografados no 12º dia após o início do tratamento. A- Controle, B-Doxorrubicina e C-Complexo.

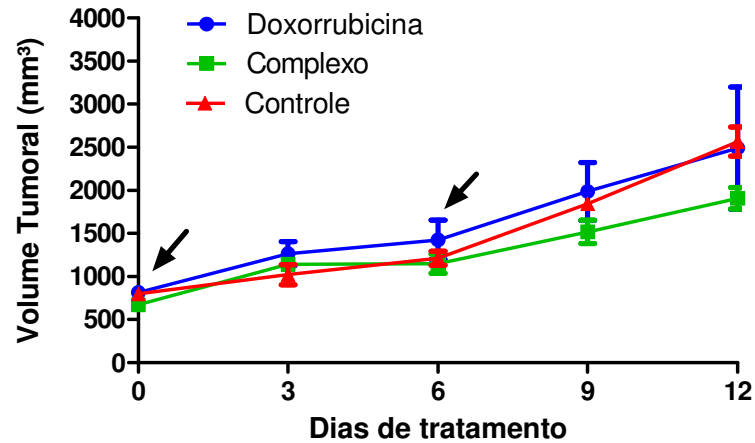


Figura 34. Tratamento com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não inibe o desenvolvimento de lesões tumorais de células U937 em animais Balb/C nude. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 6×10^6 células por animal, em grupos formados por 6 animais Balb/C Nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 5 dias de inóculo, as lesões mostraram-se aparentes e os animais foram tratados com 8,0 mg/kg/dose de doxorubicina, 25,0 mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v). O tratamento foi repetido uma vez após seis dias do início e os valores representam as médias aritméticas dos volumes tumorais. As setas apontam os dias em que os tratamentos foram administrados. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

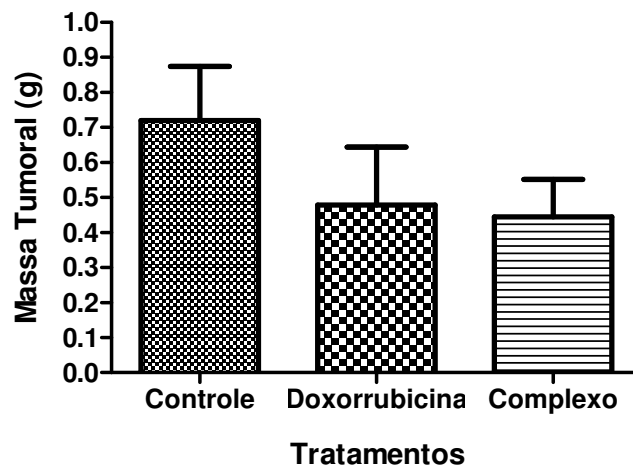


Figura 35. Lesões de células COLO205 de animais tratados com complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentam massa equivalente aos animais não tratados. As lesões tumorais foram induzidas com inóculo de 6×10^6 células por animal, em grupos formados por 6 animais Balb/C Nude fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Cada grupo foi tratado com duas doses de 8,0 mg/Kg/dose de doxorubicina, 25,0 mg/Kg/dose do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou veículo constituído de PBS+DMSO (16% v/v), com intervalos de 6 dias entre as doses. No 12º dia após o início do tratamento, os animais foram sacrificados e as lesões removidas e pesadas. Os dados foram tratados com software GraphPad Prism V.5.0 e aplicado o teste estatístico ANOVA. Os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle estão assinalados com o símbolo * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As lesões extraídas no 12^o dia após o início do tratamento foram pesadas e os valores estão apresentados na Figura 35. As massas tumorais médias obtidas para as lesões dos grupos controle negativo, doxorubicina e complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram de $0,719\pm 0,184\text{g}$, $0,478\pm 0,206\text{g}$ e $0,445\pm 0,137\text{g}$, respectivamente. Estes valores não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, confirmando os dados do acompanhamento do volume tumoral (Figura 34), em que os tratamentos com doxorubicina e o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não apresentam efeitos antineoplásicos para tratar lesões de células U937.

4.4. DISCUSSÃO

Os testes de toxicidade aguda para o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram realizados de acordo com as diretrizes internacionais (BOTHAM, 2004), utilizando-se 6 animais do mesmo sexo por grupo e sendo avaliados além da mortalidade, efeitos tóxicos aparentes nos órgãos e sistemas. O valor obtido de DL_{50} serviu de base para que os demais testes pré-clínicos, nos modelos de câncer, pudessem ser realizados, uma vez que inexitem fármacos em uso clínico com estruturas moleculares semelhantes a este complexo. O valor calculado de DL_{50} foi de $48,98\text{mg/Kg}$ (Figura 9), não sendo observadas mortalidades nas concentrações de 40mg/Kg ou inferiores. Concentrações inferiores a DL_{50} não induziram mortalidade e nem efeitos histopatológicos aparentes, indicando que uma dose de concentrações inferiores a 50mg/Kg não apresenta toxicidade aguda aparente, segundo a metodologia testada. Quando 50% da DL_{50} (25mg/Kg) do complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi administrado em doses consecutivas (Figura 10), foi observado que após a 3^a dose houve redução em 6,25% da massa corporal. No entanto, as análises histopatológicas não revelaram qualquer alteração histopatológica. Estes dados toxicológicos são promissores, e indicam uma tolerância sistêmica ao tratamento com o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A cisplatina, por exemplo, é um complexo de platina comumente utilizado na clínica e apresenta DL_{50} de 50mg/Kg (HYDES e RUSSELL, 1988). No entanto, doses terapêuticas (5mg/Kg) promovem efeitos tóxicos nos sistemas nervoso, auditivo e renal, indicando uma janela terapêutica estreita para este fármaco, uma vez que entre a dose eficaz e os efeitos tóxicos, as concentrações são próximas (MOLLMAN, 1990; SCHWEITZER, 1993; ARANY e SAFIRSTEIN, 2003). Outros agentes

antineoplásicos comumente utilizado, como a doxorubicina (DL_{50} 11,16mg/Kg), também apresentam toxicidade. No caso deste último, é frequente o desenvolvimento de cardiotoxicidade, sendo este efeito o responsável por 50% das mortes em decorrência de reação tóxica a este antineoplásico (CHATTERJEE, *et al.*, 2010).

Dentre os diversos tipos de câncer, o melanoma figura entre os mais agressivos. Trata-se de lesões, que em sua maioria iniciam na pele, com elevada taxa de metástase, com migração principalmente para os pulmões e o cérebro (VOLKOVOVA, *et al.*, 2012). As células deste tipo de câncer são pouco responsivas aos tratamentos usuais, sendo a ressecção cirúrgica a principal forma de tratamento (CASCIATO, 2008; CONSTINE, *et al.*, 2008). Dos medicamentos utilizados no tratamento, a dacarbazina é a que tem apresentado melhores efeitos terapêuticos, atuando citostaticamente e inibindo as metástases. No entanto, trabalhos recentes indicam que o tratamento conjunto de dacarbazina com outros agentes antineoplásicos são promissores para o tratamento do melanoma, principalmente a forma metastática (CASCIATO, 2008; MIDDLETON, *et al.*, 2000; FALKSON, *et al.*, 1998; RUSTHOVEN, *et al.*, 1996). O desenvolvimento de modelos murinos de melanoma tem permitido o teste de novas terapias. O modelo com células B16-F10 é utilizado a mais de 30 anos, na tentativa da descoberta de novas drogas e do entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do melanoma (ARGUELLO, *et al.*, 1988; JANI, *et al.*, 1993; GUO, *et al.*, 2001; HWANG, *et al.*, 2001; BOROSS, *et al.*, 2014). Os testes desenvolvidos com o complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ neste modelo murino de câncer revelaram que este complexo apresentou efeito terapêutico. Seguindo o esquema terapêutico proposto nos testes de toxicidade aguda, duas administrações do complexo de cobre $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ na concentração de 50% da DL_{50} estabilizou as lesões tumorais (Figuras 12-14) de modo semelhante ao observado para o tratamento com a doxorubicina em nossos experimentos e em outros relatados na literatura (ELIAZ, *et al.*, 2004). No entanto, sabe-se que a doxorubicina é cardiotóxica (CHATTERJEE, *et al.*, 2010), enquanto que os testes de toxicidade aqui descritos apontam para uma boa tolerância e baixa toxicidade, suportando doses consecutivas de 50% da DL_{50} do complexo $[Cu(L1)Cl]Cl \cdot 2H_2O$.

A melanina tem sido relacionada com o estresse oxidativo apresentado por melanócitos, atuando como antioxidante e prevenindo os danos que a geração de

ROS poderia promover no DNA (FARMER, *et al.*, 2003; MEYSKENS, *et al.*, 2001). Assim como a maioria dos agentes antineoplásicos, a doxorrubicina promove intensa geração de ROS (GILLIAM, *et al.*, 2012; ROGALSKA *et al.*, 2011; ALEXANDRE, *et al.*, 2006; ALEXANDRE *et al.*, 2007). Este contexto de estresse oxidativo pode explicar a intensa produção de melanina observada nas células das lesões tumorais dos animais tratados com doxorrubicina e complexo de cobre, sugerindo que estes compostos induzem uma intensa produção de ROS e para compensar este estresse oxidativo, as células B16F10 produziram uma grande quantidade de melanina, conforme observado na Figura 15.

No modelo xenográfico de melanoma humano de células SK-MEL-5, o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ manteve a capacidade de inibir o desenvolvimento das lesões tumorais (Figuras 17-19), superando inclusive a doxorrubicina. Neste modelo, a produção de melanina foi discreta (dados não mostrados). Análises imunohistoquímicas confirmaram o efeito antineoplásico do complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e da doxorrubicina. Os dados das imunohistoquímicas indicam uma baixa marcação para Ki-67 nas células das lesões tumorais dos animais tratados (Figuras 21), confirmando uma baixa taxa de proliferação celular, compatível com um volume tumoral menor nestes grupos experimentais, em relação ao grupo controle. O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, ausente nas células quiescentes. Tem sido amplamente utilizado como um marcador de prognóstico para o tratamento de diversos tipos de câncer, sendo um bom prognóstico quando há baixa marcação para Ki-67 nas lesões tumorais (SUCIU, *et al.*, 2014; RAU, *et al.*, 2003).

Além de apresentar atividade nos modelos de melanoma de células B16-F10 e SK-MEL-5, o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ também apresentou efeito antineoplásico no modelo xenográfico de câncer de pulmão humano de células H460. Neste modelo, os animais foram tratados com três doses de 50% da DL_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou 3,3mg/Kg de cisplatina. Três dias após o último tratamento, as lesões dos animais tratados com o veículo constituído de PBS+DMSO (16% de DMSO) apresentavam volume 21,41 vezes maiores que no início do tratamento, enquanto que os animais tratados com cisplatina e o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentavam volumes 11,49 e 10,15 vezes maiores que no início do tratamento, respectivamente (Figura 25). As análises imunohistoquímicas das lesões tumorais confirmaram os efeitos antineoplásicos dos tratamentos com a

cisplatina e o cobre $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sendo possível observar uma redução nas marcações com Ki-67 (Figura 26).

Além do efeito inibidor da proliferação celular, o tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ também induziu morte celular *in situ*, identificada através da marcações para TUNEL (Figura 27). O teste de TUNEL baseia-se na marcação direta do DNA nuclear danificado (LOO, *et al.*, 2011; KYRYLKOVA, *et al.*, 2012), existindo controversia quanto à capacidade do teste em diferenciar os tipos de morte celular (GRASL-KRAUPP, *et al.*, 1995). No entanto, sua capacidade de indicar morte celular, seja ela por qual via, é inquestionável. Neste contexto, a positividade para TUNEL apresentada após o tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é um bom indicativo, sugerindo que este composto é capaz de induzir *in vivo* a morte de células de câncer de pulmão humano da linhagem H460.

Nos modelos murinos de câncer de células U937 e COLO205, o tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não demonstrou efeito antineoplásico (Figuras 28-35). Estes dados sugerem que o complexo de cobre tem efeito antineoplásico seletivo sobre alguns tipos de lesões cancerígenas, atuando principalmente com maior eficácia nos melanomas.

4.5. CONCLUSÕES

Os testes toxicológicos realizados com o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sugerem uma baixa toxicidade, não sendo observadas lesões histopatológicas nos animais tratados com três doses repetidas de 50% da DL_{50} .

Ns modelos murinos de melanoma de células B16-F10 e SK-MEL-5 e de carcinoma pulmonar de células H460, o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi eficaz no tratamento das lesões, sendo o efeito antineoplásico mais proeminente nas linhagens de melanoma.

Os dados das análises imunohistoquímicas indicam que o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ atua *in vivo* inibindo a proliferação celular com baixa marcação para Ki-67.

No modelo murino de carcinoma de células H460, além de inibir a proliferação celular, o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ também induziu morte celular *in situ*, verificada através da marcação positiva pelo teste de TUNEL.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J; KAUFFMAN, M. Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib). *New Drugs*. Vol. 22, N.2, P:304-311, 2004.

AGNER J, FALCK J, LUKAS J, BARTEK J. Differential impact of diverse anticancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway. *Exp Cell Res*. vol.302, p:162–169, 2005.

ALAGILLE, D.R.; BALDWINA, M.; TAMAGNAN, G.D. Total synthesis of the marine cytotoxic caulibugulones A–D. *Tetrahedron Lett*. Vol. 45, p:6179–6181, 2004.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. 5ed. Porto Alegre. Editora Artes Médicas, 2009.

ALEXANDRE J, BATTEUX F, NICCO C, CHÉREAU C, LAURENT A, GUILLEVIN L, WEILL B, GOLDWASSER F. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. vol.119, n.1, p41-48, 2006.

ALEXANDRE J, HU Y, LU W, PELICANO H, HUANG P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res*. vol.67, n.8, p:3512-3517, 2007.

ALMEIDA, V. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ARANY I, SAFIRSTEIN R.L. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol*. Vol.23, n.5, p:460-464, 2003.

ARGUELLO, F, BAGGS, R.B, FRANTZ, C.N. A Murine Model of Experimental Metastasis to Bone and Bone Marrow. *CANCER RESEARCH*, vol. 48, p: 6876-6881, 1988.

BAKHTIAR, R., OCHIAI, E. Pharmacological applications of inorganic complexes. *General Pharmacology*, v. 32, p. 535–548, 1999.

BENITES, J.; VALDERRAMA, J. A.; RIVERA, F.; ROJO, L.; CAMPOS, N.; PEDRO, M.; JOSÉ N.; MARÍA S. Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. vol.16, p:862-868, 2008.

BERKE G: The CTL's kiss of death. *Cell* vol.81, p:9–12, 1995.

BILD, A.H; YAO, G; CHANG, J.T; WANG, Q; POTTI, A; CHASSE, D; JOSHI, M.B; HARPOLE, D; LANCASTER, J.M; BERCHUCK, A; OLSON, J.A.JR; MARKS, J.R; DRESSMAN, H.K; WEST, M; NEVINS, J.R. Oncogenic pathway signatures in human cancers as guide to targeted therapie. *Nature* vol.19, n.439, p: 353-357, 2006

BLATTMAN, J.N; GREENBERG, P.D. Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science*. Vol. 305, n.5681, p: 200-205, 2004.

BLOMBERG, I; HOFFMANN, I. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. vol.19, p:6183–6194, 1999.

BLOOM, J. ; CROSS, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 8, p:149-160, 2007

BOGENRIEDER, T; HERLYN, M. molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*. vol. 22, p:6524–6536, 2003.

BOROSS P, JANSEN J.H, VAN TETERING G, NEDEREND M, BRANDSMA A, MEYER S, TORFS E, VAN DEN HAM H.J, MEULENBROEK L, DE HAIJ S, LEUSEN J.H. Anti-tumor activity of human IgG1 anti-gp75 TA99 mAb against B16F10 melanoma in human FcγRI transgenic mice. *Immunol Lett*. S0165-2478, 2014.

BRASILEIRO-FILHO, G. BOGLIOLO. *Patologia*. 7ed. Rio de Janeiro/RJ, GUANABARA KOOGAN, 2006.

BRISSON, M; FOSTER, C; WIPF, P; JOO, B; TOMKO, R.J.JR; NGUYEN, T; LAZO, J.S. Independent Mechanistic Inhibition of Cdc25 Phosphatases by a Natural Product Caulibugulone. *Mol Pharmacol*. 2007 vol.71, n.1, p:184-192, 2007.

BROWN S, BROWN EA, WALKER I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol*. vol.5, p:497-508, 2004.

BRUCE W. R., LIN, H. An Empirical Cellular Approach to the Improvement of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*. v.29, p.2308-2310, 1969.

BRUIJNINCX, P. C. A., SADLER, O. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*. vol. 12, p.197-206, 2008.

BRUIN, E.C; MEDEMA, J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev*. Vol. 34, n. 8, p:737-749, 2008.

BULL, E. S. Síntese, Caracterização e Avaliação das Atividades de Nuclease e Antitumoral de Compostos de Coordenação de Cobre. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

CASCIATO, D. A. *Manual de oncologia clínica*. 1ed. São Paulo, Novo Conceito, 2008.

CHATTERJEE, K. ZHANG, J, HONBO, N, KARLINER, J.S. Doxorubicin *Cardiomyopathy Cardiology*. Vol. 115, n. 2, p: 155–162, 2010.

CHEEVER M.A, HIGANO C.S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res.* vol.17, n.11, p:3520-3526, 2011.

CHEN, M; GUERRERO, A.D; HUANG, L; SHABIER, Z; PAN, M; TAN, T-H; WANG, J. Caspase-9-induced Mitochondrial Disruption through Cleavage of Anti-apoptotic BCL-2 Family Members. *J Biol Chem.* vol.16, n. 46, p:33888-33895, 2007.

CHENG S, GAO N, ZHANG Z, CHEN G, BUDHRAJA A, KE Z, SON Y.O, WANG X, LUO J, SHI X. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax. *Clin Cancer Res.* vol.16, n. 23, p:5679-5691, 2010.

CHIAL, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education.* Vol.1, n.1, p:1-33, 2008.

CHIU T.L., SU C.C. Tanshinone IIA induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through the induction of reactive oxygen species and decreasing the mitochondrial membrane potential. *Int J Mol Med.* Vol.25, n.2, p:231-236, 2010.

CHOI, Y.-H., PARK, A., SCHMITZ, F.J., & VAN ALTENA, I. Perfragilins A and B, cytotoxic isoquinolinequinones from the bryozoan *Membranipora perfragilis*. *Journal of natural products*, vol.56, p:1431-1433, 1993.

CHOUHAN J.D, ZAMARRIPA D.E, LAI P.H, ORAMASIONWU C.U, GRABINSKI J.L. Sunitinib (Sutent): a novel agent for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Oncol Pharm Pract.* Vol.13, n.1, p:5-15, 2007.

CIARDIELLO F, CAPUTO R, BIANCO R, DAMIANO V, POMATICO G, DE PLACIDO S, BIANCO AR, TORTORA G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res.* vol.6, n.5, p:2053-63, 2000.

COHEN S.J, ZALUPSKI M.M, MODIANO M.R, CONKLING P, PATT Y.Z, DAVIS P, DORR R.T, BOYTIM M.L, HERSH E.M. A phase I study of imexon plus gemcitabine as first-line therapy for advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* Vol.66, n.2, p: 287-294, 2010.

COINDRE, J. M. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med.* v.130, n.10, p.1448-1453, 2006.

CONLY L. R. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Research.* vol.19, p: 291-306, 2011.

CONSTINE, L.S; MILANO, M.T; FRIEDMAN, D. *Late Effects of Cancer treatment on Normal Tissues. Principles and Practice of Radiation Oncology*, 5th ed. Philadelphia, Pa, Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

COSETTA, B; JAN, M. S; ROBERTUS, A. M. B. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. vol.14,p:518–528, 2013.

CULY, C.R.; JARVIS, B. Quinapril: a further update of its pharmacology and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs*. vol.62, p:339-85, 2002.

D'AUTREAUX B, TOLEDANO MB. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol.8, p:813-824, 2007.

DEACON K, MISTRY P, CHERNOFF J, BLANK JL, PATEL R. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol Biol Cell*. vol.14, p: 2071-2087, 2003.

DEAN, M; FOJO, T; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* vol.5, p:275-284, 2005.

DOMINGO, S. T; BAGÁN, J. V; JIMÉNEZ, Y; POVEDA, R; MURILLO, J; DÍAZ, J. M; SANCHIS, J. M; GAVALDÁ, C; CARBONELL, E. Benign tumors of the oral mucosa: A study of 300 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. vol.13, n.1, p.161-166, 2008.

DONEPUDI M, MAC S.A, BRIAND C, GRUTTER M.G. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell*. vol.11, p:543–549, 2003.

DRUKER, B.J. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med*. vol.8(4 Suppl):S14-8, 2002.

EDRADA,R.A.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; CHRIST, R.; WITTE, L.; VAN SOEST, R. W. M. Bioactive Isoquinoline Quinone from an Undescribed Philippine Marine Sponge of the Genus *Xestospongia*. *J. Nat. Prod*. vol.59, p:973-976, 1996.

Eliaz, E.R; Nir, S; Marty, C;Szoka Jr, F.C. Determination and Modeling of Kinetics of Cancer Cell Killing by Doxorubicin and Doxorubicin Encapsulated in Targeted Liposomes. *Cancer Res*, n.64, p.711-718, 2004.

EICHLER, A.F; CHUNG, E; KODACK, D.P; LOEFFLER, J.S; FUKUMURA, D; JAIN, R.K. The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. vol.8, n.6, p:344-356, 2011

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. vol.35, n.4, p.495-516, 2007.

ENSLÉN H, BRANCHO D.M, DAVIS R.J. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO*. Vol.19, p:1301-1311, 2000.

ETHIRAJAN, M; CHEN, Y; JOSHI, P; PANDEY, R.K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev*. vol.40, p:340-362, 2011.

FABBRI M; ILIOPOULOS D; TRAPASSO F; AQEILAN RI; CIMMINO A; ZANESI N; YENDAMURI S; HAN S.I; AMADORI D; HUEBNER K; CROCE C.M. WWOX gene restoration prevents lung cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *PNAS*, vol.102, n.43, p.15611–15616, 2005.

FACINA, T. Estimativa de câncer para o Brasil no ano de 2014. *Revista Brasileira de Cancerologia*. vol.60, n.1, p:1-63, 2014.

FADEEL, B; ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.266, n. 3, p: 699-717, 1999.

FALKSON C.I, IBRAHIM J, KIRKWOOD J.M, COATES A.S, ATKINS M.B, BLUM R.H. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. vol.16, p:1743-1751, 1998.

FARMER P.J, GIDANIAN S, SHAHANDEH B, DI BILIO A.J, TOHIDIAN N, MEYSKENS FL JR. Melanin as a target for melanoma chemotherapy: pro-oxidant effect of oxygen and metals on melanoma viability. *Pigment Cell Res*. vol.16, n. 3, p:273-279, 2003.

FAUZI A.N, NORAZMI M.N, YAACOB N.S. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food Chem Toxicol*. Vol.49, n.4, p:871-878, 2011.

FEARON, E.R; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. vol. 61, n.5, p:759-767, 1990.

FERNANDES-ALNEMRI, T; WU, J; YU, J.W; DATTA, P; MILLER, B; JANKOWSKI, W; ROSENBERG, S; ZHANG, J; ALNEMRI, E.S. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*. n.14, vol.9, p:1590–604, 2007.

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

FINK, S; COOKSON, B. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. vol.73, p:1907-1916, 2005.

FONTANA, A. CAVALIERE, P. WAHIDULLAH, S. NAIK, C.G. CIMINO, G. A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris*" *Tetraedron*, vol.56, n.37, p:7305-7308, 2000.

FROM, L; MARRET, L; ROSEN, C; ZWAAL, C; JOHNSTON, M; BAK, K; SIBBALD, G; FRONG, J; MAI, V. Screening for Skin Cancer: A Systematic Review. *A Quality Initiative of the Program in Evidence-based Care (PEBC), Cancer Care Ontario (CCO). Evidence-based series.* vol.15, n.1, p.1-34, 2007.

FRUEHAUF J.P, MEYSKENS F.L JR. Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin Cancer Res.* vol.13, p:789-794, 2007.

FUCHS, F. D., WANNMACHER, L. *Farmacologia clínica – Fundamentos da terapêutica racional.* 4ed. Rio de Janeiro/RJ. GUANABARA KOOGAN, 2010.

GARNER-HAMRICK, P.A; FISHER, C. Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate *cdc25B* causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int J Cancer.* vol.76, p:720–728, 1998.

GHOBRIAL I.M, WITZIG T.E, ADJEI A.A: Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, vol.55, p:178-194, 2005.

GIANCOTTI, F.G. Mechanisms Governing Metastatic Dormancy and Reactivation. *Cell.* vol.155, n.4, p:750–764, 2013.

GILLIAM L.A, MOYLAN J.S, PATTERSON E.W, SMITH J.D, WILSON A.S, RABBANI Z, REID M.B. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol.* Vol.320, n.1, p:c195-202, 2012.

GOLIAS C.H; CHARALABOPOULOS, A; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract.* n.58, vol.12, p:1134-1141, 2004.

GRASL-KRAUPP B, RUTTKAY-NEDECKY B, KOUDELKA H, BUKOWSKA K, BURSCH W, SCHULTE-HERMANN R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* Vol.21, n.5, p:1465-8, 1995.

GUO T.L, MCCAY J.A, ZHANG L.X, BROWN R.D, YOU L, KARROW N.A, GERMOLEC D.R, WHITE K.L JR. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr.* Vol.131, n.12, p:3251-3258, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem Journal*, v. 219, p. 1–14, 1984.

HAN, J; LEE, J.D; BIBBS, L; ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* vol. 265, p: 808-11, 1994.

HAWAS U.W.; SHAABAN, M.; SHAABAN, K. A.; SPEITLING, M.; MAIER A.; KELTER G.; FIEBIG, H. H.; MEINERS, M.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Mansouramycins A-D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine streptomycete. *J Nat Prod.* vol.72, p:2120-2124, 2009.

HAYASHI, M.T; CESARE, A.J; FITZPATRICK, J.A; LAZZERINI-DENCHI, E; KARLSEDER, J. A telomere-dependent DNA damage checkpoint induced by prolonged mitotic arrest. *Nat Struct Mol Biol.* vol. 19, p: 387-394, 2012.

HITOMI, J; KATAYAMA, T; EGUCHI, Y; KUDO, T; TANIGUCHI, M; KOYAMA, Y; MANABE, T; YAMAGISHI, S; BANDO, Y; IMAIZUMI, K; TSUJIMOTO, Y; TOHYAMA, M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *JCB.* vol. 165 n.3. p: 347-356, 2004.

HOFFMANN, I; DRAETTA, G; KARSENTI, E. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *Eur Mol Biol Organ.* vol.13, p:4302–4310, 1994.

HOLMES W.F, SOPRANO D.R, SOPRANO K.J. Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: activation of the p38 MAP kinase signal pathway. *Oncogene.* vol.22, p: 6377-86, 2003.

HONG M.Y, TURNER N.D, CARROLL R.J, CHAPKIN R.S, LUPTON J.R. Differential response to DNA damage may explain different cancer susceptibility between small and large intestine. *Exp Biol Med.* Vol.230, p:464-471, 2005.

HOPPER C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* vol.1, p:212-219, 2000.

HUNTER, K.W; CRAWFORD, N.P.S; ALSARRAJ, J. Mechanism of metastasis. *Breast Cancer Res.* vol.10, (Suppl 1): S2, 2008.

HUSSAIN, H., KROHN, K., AHMAD, V. U., MIANA, G. A., GREEND I. R. Lapachol: an overview. *Arkivoc.* v.1, n.2, p.145-171, 2007.

HWANG P.H, YI H.K, KIM D.S, NAM S.Y, KIM J.S, LEE D.Y. Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett.* Vol.22, n.1, p:83-91, 2001.

HYDES, P.C; RUSSELL, M.J. Advances in platinum cancer chemotherapy. Advances in the design of cisplatin analogues. *Cancer Metastasis.* Rev. Vol.7, 67-89, 1988.

ISHIKAWA K, TAKENAGA K, AKIMOTO M. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science.* vol.320, p:661-664, 2008.

IVANOV V.N, RONAI Z. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene.* vol.19, p: 3003-3012, 2000.

JANI J.P, SPECHT S, STEMMLER N, BLANOCK K, SINGH S.V, GUPTA V, KATOH A. Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion & Metastasis.* Vol.13, n.6, p:314-324, 1993.

GRUTTERS J.P, KESSELS A.G, PIJLS-JOHANNESMA M, DE RUYSSCHER D, JOORE MA, LAMBIN P. Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Radiotherapy e Oncology*. v.95, n.1, p.32-40, 2010.

JONES, C., THORNBACK, J. Medicinal Applications of Coordination Chemistry. *Cambridge: The Royal Society of Chemistry*, p. 353, 2007.

JONES, G. W. Review: radiotherapy reduces death from and recurrence of breast cancer but increases death from other causes. *Evidence-Based Medicine*. v.6, n.2, p.53-66, 2001.

KANDUC, D., MITTELMAN, A., SERPICO, R., SINIGAGLIA, E., SINHA, A. A., NATALE, C., SANTACROCE, R., DI CORCIA, M. G., LUCCHESI, A., DINI, L., PANI, P., SANTACROCE, S., SIMONE, S., BUCCI, R., FARBER, E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*. vol.21, p.165-170, 2002.

KAWADA, K; MAKOTO, M. T. Significance and Mechanism of Lymph Node Metastasis in Cancer Progression. *Cancer Res*. vol.71, p:1214-1218, 2011.

KIEBACK, A.G.; FELIX, S.B.; REFFELMANN, T. Quinaprilat: a review of its pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicological data and clinical application. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. vol.5, p:1337-47, 2009.

KIM K.Y, YU S.N, LEE S.Y, CHUN S.S, CHOI Y.L, PARK Y.M, SONG C.S, CHATTERJEE B, AHN S.C. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.413, n.1, p:80-86, 2011.

KIM, B., NEVITT, T., THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol*, v. 4, p. 176-185, 2008.

KIM, M-K, SUH, D.H, KIM, B, SONG, S.S. Cellular stress responses and cancer: new mechanistic insights on anticancer effect by phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*. Vol.13, n.1, p: 207-221, 2014.

KISCHKEL F.C, HELLBARDT S, BEHRMANN I. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, vol.14, p:5579–5588, 1995.

KOSTOVA I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Delivery*, v.1, n.1, p.1–22, 2006.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7.ed. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2005.

KYRYLKOVA K, KYRYACHENKO S, LEID M, KIOUSSI C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. vol.887, p:41-7, 2012.

LACERDA, C. C. Sarcoma, um tumor raro. *Onco News*. v.1, n.1, p.18-20, 2007.

LAI K.C; KUO C.L; HO H.C; YANG J.S; MA C.Y; LU H.F; HUANG H.Y; CHUEH F.S; YU C.C; CHUNG J.G. Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colo205 human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*, vol.19; n.7, p:625–630, 2012.

LEE M.W, PARK S.C, YANG Y.G, YIM S.O, CHAE H.S, BACH J.H. The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett*. vol.512, p: 313-8, 2002.

LEE, J.C; LAYDON, J.T; MCDONNELL, P.C; GALLAGHER, T; KUMAR, S; GREEN, D. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. vol, 372, p.739-746, 1994.

LEEN, W. A. C., LOCKHRAT, R. B., KIN, M. L. Cancer Pharmacogenomics: Powerful Tools in Cancer Chemotherapy and Drug Development. *The Oncologist*. v.10, n.1, p.104-111, 2005.

LEITE M, QUINTA-COSTA M, LEITE P.S, GUIMARÃES J.E. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Anal Cell Pathol*. vol.19, n.3-4, p.139-51.

LOO D.T. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol*. vol.682, p:3-13, 2011.

LOSA J.H, PARADA COBO C, VINIEGRA J.G, SANCHEZ- AREVALO LOBO V.J, RAMON Y CAJAL S, SANCHEZ-PRIETO R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatinbased therapy. *Oncogene*.vol.22, p: 3998-4006, 2003.

LOWE S. W., LIN A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. vol.21, n.3, p.485-495, 2000.

LU, J.J.; BAO, J.L.; WU G.S.; XU, W.S.; HUANG, M.Q.; CHEN, X.P.; WANG, Y.T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem*. vol.13, p:456-63, 2013.

LUNDIN, J. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with b-cell chronic lymphocytic leukemia (b-CLL). *Blood*. vol.100, p:768–773, 2002.

LYON, M.A; DUCRUET, A.P; WIPF, P; LAZO, J.S. Dual-specificity phosphatases as targets for antineoplastic agents. *Nat Rev Drug Discov*. vol.1, p:961–976, 2002.

MANSOUR, M.; POHAJDAK, B.; KAST, W. M.; FUENTES-ORTEGA, A.; KOREST-SMITH, E.; WEIR, M.G.; BROWN, G. R.; DAFTARIAN, P. Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax. *Journal of Translational Medicine*. v.5, n.20, p1:8.

MARSIK, P. L., KOKOSKA, P., LANDA, A., NEPOVIM, P., SOUDEK, T. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med.* vol.71, n.8, p.739-742, 2005

MARULLO R, WERNER E, DEGTYAREVA N, MOORE B, ALTAVILLA G, RAMALINGAM S.S, DOETSCH P.W. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One.* Vol.8, n.11, p: e81162, 2013.

MAYER, B., OBERBAUER, R.. Mitochondrial Regulation of Apoptosis. *News in Physiological Sciences.* v.18, n.3, p.89-94, 2003.

MEYSKENS F.L, FARMER P.J, FRUEHAUF J. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* vol.14, p: 148 – 154, 2001.

MIDDLETON M.R, GROB J.J, AARONSON N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol,* vol.8, p:158-166, 2000.

MIGNOTTE, B., VAYSSIERE, J. Review: Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemistry.* vol.252, p.1-15, 2001.

MILANOWSKI D.J.; GUSTAFSON K.R.; KELLEY J.A.; MCMAHON J.B. Caulibugulones A-F, novel cytotoxic isoquinoline quinones and iminoquinones from the marine bryozoan *Caulibugula intermis*. *J Nat Prod.* vol.67, p:70–73, 2004.

MITCHELL, R.S; KUMAR, V; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. *Robbins Basic Pathology.* 8ed. Philadelphia. Elsevier, 2007.

MOLLMAN, J.E. Cisplatin neurotoxicity. *The New England Journal of Medicine,* Vol.322, n.2, p:26-127, 1990.

NACIUUK, F. F.; MILAN, J. C.; ANDREAIO, A.; MIRANDA, P. C. M. L. Exploitation of a Tuned Oxidation with N-Haloimides in the Synthesis of Caulibugulones A–D. *The Journal of Organic Chemistry.* vol.78, p:5026-5030, 2013.

NAGATA S. Apoptosis by death factor. *Cell* vol.88, p:355–365, 1997.

NAKAGAWA, T; ZHU, H; MORISHIMA, N; LI, E; XU, J; YANKNER, B.A; YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* vol.403, p:98-103, 2000.

NEMOTO S, XIANG J, HUANG S, LIN A. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* vol.273, p:16415-16420, 1998.

NEWLAND A.M, LI J.X, WASCO L.E, AZIZ M.T, LOWE D.K. Brentuximab vedotin: a CD30-directed antibody-cytotoxic drug conjugate. *Pharmacotherapy.* Vol.33, n. 1, p:93-104, 2013.

NIEDERHUBER, J.E. Surgical Interventions in Cancer. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4ed. Philadelphia, Pa. Elsevier Churchill Livingstone; 2008.

ORTEL B, SHEA C.R, CALZAVARA-PINTON P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Frontiers in Bioscience*. Vol.14, p:4157-4172, 2009.

PANDEYA, S. N.; TYAGI, A. Synthetic approaches for quinones and isoquinoline. *Int Pharm Pharm Sci*. vol.3, p:53-61, 2011.

PAUL, K.M.D; LESLIE, H; SOBIN, M.D. World Health Organization classification of tumors. vol.88, n.12, p: 2887, 2000.

PERRY, S.W, NORMAN, J.P, BARBIERI, J, BROWN, E.B, GELBARD, H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. Vol.50, n.2, p:98-115, 2011.

PETTIT G.R.; COLLINS J.C.; HERALD D.L.; DOUBEK D.L.; BOYD M.R.; SCHMIDT J.M.; HOOPER J.N.A.; TACKETT L.P. Isolation and structure of cribrostatins 1 and 2 from the blue marine sponge *Cribrorchalina* sp. *Canadian Journal Of Chemistry*. Vol.70, n.4, p: 1170-1175, 1992.

RAE T.D., SCHMIDT, P.J., PUFAHL, R. A., CULOTTA, V. C., O'HALLORAN, T. V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, v. 284, p. 805-808, 1999.

RAU, B, STURM, I, LAGE, H, BERGER, S, SCHNEIDER, U, HAUPTMANN, S, WUST, P, RIESS, H, SCHLAG, P.M, DÖRKEN, B, DANIEL, P.T. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol*. vol.21, n. 18, p:3391-401, 2003.

REYA, T; MORRISON, S. J; CLARKE, M.F; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*. vol.414, p:105-111, 2001.

ROGALSKA A, GAJEK A, SZWED M, JÓŹWIAK Z, MARCZAK A. The role of reactive oxygen species in WP 631-induced death of human ovarian cancer cells: a comparison with the effect of doxorubicin. *Toxicol In Vitro*. Vol.25, n.8, p: 1712-1720, 2011.

ROMAN, E; SMITH, A.G. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*. vol.50, n.1, p:4-14, 2011.

ROSENBERG, S.A; YANG, J.C; RESTIFO, N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. Vol.10, n.9, p: 909–915, 2004.

ROSS G. M. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer*. V.6, n.1, p.41-44, 1999.

ROUSE J, COHEN P, TRIGON S, MORANGE M, ALONSO-LLAMAZARES A, ZAMANILLO D. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock

that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. vol.78, p:1027-1037, 1994

RUSTHOVEN J.J, QUIRT I.C, ISCOE N.A. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial comparing the response rates of carmustine, dacarbazine, and cisplatin with and without tamoxifen in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. vol.14, p:2083-2090, 1996.

SAID G. C. F., BRAGA, R. M. C., SANTANA, D. P. Lapachol . chemistry, pharmacology and assay methods. *Rev. Bras. Farm.* v.84, n.1, p.9-16, 2003.

SAMRAJ A.K, SOHN D, SCHULZE-OSTHOFF K, SCHMITZ I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell*. vol.18, n.1, p:84-93, 2007.

SANDOVAL I.T, DAVIS R.A, BUGNI T.S, CONCEPCION G.P, HARPER M.K and IRELAND C.M. Cytotoxic Isoquinoline Quinones from Sponges of the Genus *Petrosia*. *Natural Product Research* vol.18, p: 89-93, 2004.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. *Nature*. vol.432, p:294-297, 2004.

SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, n.35, vol.6, p:461-78, 1998.

SCHWEITZER V.G. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope*. Vol.103, p:1-52, 1993.

SCLAFANI, R. A; HOLZEN T. M. Cell Cycle Regulation of DNA Replication. *Annual Review of Genetics*. vol. 41, p:237-280, 2011.

SEAN, D. R; ERIC, M. C. B; LAUREN, M. Z; KRISTEN, W; ANJON, A; AVTAR, R; BETH, A. W. Up-regulation of the mitotic checkpoint component Mad1 causes chromosomal instability and resistance to microtubule poisons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol.14, p: 2205-2214, 2012.

SEDIC, M., POZNIC, M., GEHRIG, P., SCOTT, M., SCHLAPBACH, R., HRANJEC, M., KARMINSKI-ZAMOLA, G., PAVELIC, K. S., PAVELIC, K. Therapeutics, Targets, and Development Differential antiproliferative mechanisms of novel derivative of benzimidazo[1,2-*b*]quinoline in colon cancer cells depending on their p53 status. *Molecular Cancer Therapeutics* vol.7, p.2121-2132, 2008.

SHANG Y, ZHANG L, JIANG Y, LI Y, LU P. Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: the role of reactive oxygen species. *Chemosphere*. Vol.100, p:42-49, 2014.

SHUKLA S, ROBEY R.W, BATES S.E, AMBUDKAR S.V. Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab Dispos*. Vol.37, n.2, p:359-365, 2009.

SIEGEL D, YAN C, ROSS D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol*. Vol.83, n.8, p:1033-1040, 2012.

SIEGEL, R; MA, J; ZOU, Z; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. vol.64, p:9–29, 2014.

SINGH S; DAVIS R; ALAMANDA V; PIREDDU R; PERNAZZA D; SEBTI S; LAWRENCE N; CHELLAPPAN S. Rb-Raf-1 interaction disruptor RRD-251 induces apoptosis in metastatic melanoma cells and synergizes with dacarbazine. *Mol Cancer Ther*. N.9, v.12, p3330-3341, 2010.

SINHA K, DAS J, PAL P.B, SIL P.C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*. Vol.87, n.7, p:1157-1180, 2013.

STEGMEIER, F; WARMUTH, M; SELLERS, W.R; DORSCH, M. Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib. *Clin Pharmacol Ther*. vol.87, n.5, p:543-552, 2010.

STEWART, B. W; WILD, C. P. World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2014.

STORR, T. THOMPSON, K. H., ORVIG, C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews*. vol. 35, p. 534-544, 2006.

SUCIU,C, MURESAN, A, CORNEA, R, SUCIU, O, DEMA, A, RAICA,M. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast *Oncol Lett*. vol.7, n.1, p: 107–114, 2014.

SUN X, AI M, WANG Y, SHEN S, GU Y, JIN Y, ZHOU Z, LONG Y, YU Q. Selective induction of tumor cell apoptosis by a novel P450-mediated reactive oxygen species (ROS) inducer methyl 3-(4-nitrophenyl) propiolate. *J Biol Chem*. Vol.288, n.13, p:8826-8837, 2013.

TAN Y, YU R, PEZZUTO J.M. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res*. vol.9, p: 2866-2875, 2003.

TAO, C; PETER, A. S; FIONA, K. M; NICOLA, J. C. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discovery Today*. vol.17, p:194-202, 2012.

THATCHER, N; CHANG, A; PARIKH, P; RODRIGUES, P. J; CIULEANU, T; PAWEL, J; THONGPRASERT, S; TAN, E.H; PEMBERTON, K; ARCHER, V; CARROLL, K. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*. vol.4, n.366, p:1527-1537, 2005.

TRAYNOR A.M, LEE J.W, BAYER G.K, TATE J.M, THOMAS S.P, MAZURCZAK M, GRAHAM D.L, KOLESAR J.M, SCHILLER J.H. A phase II trial of triapine (NSC# 663249) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503. *Invest New Drugs*. Vol.28, n.1, p:91-97, 2010.

TUROWSKI, P; FRANCKHAUSER, C; MORRIS, M.C; VAGLIO, P; FERNANDEZ, A; LAMB, N.J.C. Functional Cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells. *Mol Biol Cell*. vol.14, p:2984–2998, 2003.

UPADHYAYA K. R., RADHA K. S., MADHYASTHA H. K. Cell Cycle Regulation and Induction of Apoptosis beta-carotene in U937 and HL-60 Leukemia Cells. *J Biochem Mol Biol*. Vol.40, n.6, p.1009-1015, 2007.

VAN ENGELAND, L.J.W. NIELAND, F.C.S. RAMAEKERS, B. S., CHRIS P.M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure Manon. *Cytometry*, vol.31, n.1, p:1-9, 1998.

VERWEIJ, J; OOSTEROM, A.V; BLAY, J.Y; JUDSON, I; RODENHUIS, S; GRAAF, W.V; RADFORD, J; CESNE, A.L; HOGENDOORN, P.C; PAOLA, E.D; BROWN, M; NIELSEN, O.S. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer*. vol.39, n.14, p:2006-2011, 2003.

VIJAYARAMAN K.P, SHUNMUGIAH K.P, KASI P.D. Silymarin attenuates benzo(a)pyrene induced toxicity by mitigating ROS production, DNA damage and calcium mediated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Ecotoxicol Environ*. Vol.86, p:79-85, 2012.

VOGEL C.L, COBLEIGH M.A, TRIPATHY D, GUTHEIL J.C, HARRIS L.N, FEHRENBACHER L, SLAMON DJ, MURPHY M, NOVOTNY WF, BURCHMORE M, SHAK S, STEWART SJ, PRESS M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. vol.1, n.20, p: 719-726, 2002.

VOLKOVOVA, K, BILANICOVA, D, BARTONOVA, A, LETAŠIOVÁ, S, DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. *Environ Health*. Vol.11, (Suppl 1): S12, 2012.

VU, T; FRANCOIS, X. Claret Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Front Oncol*. vol. 2, p: 62, 2012.

WANG K.K, LUTZKE L, BORKENHAGEN L. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus: does light still have a role? *Endoscopy*. vol.40, n. 12, p:1021-1025, 2012.

WANG R.F, ROSENBERG S.A. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev*. Vol.170, p:85-100, 1999.

WANG, X. Review: The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* vol.15, n.22, p.2922-2933, 2001.

WEINER, L.M, SURANA, R; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, vol.10, p:317-327, 2010.

WIPF P.; BEOMJUN J.; NGUYEN T.; LAZO J.S. Synthesis and biological evaluation of caulibugulones AE. *Org Biomol Chem.* vol.2, p:2173-2174, 2004.

WITZIG, T.E; GORDON, L.I; CABANILLAS, F; CZUCZMAN, M.S; EMMANOUILIDES, C; JOYCE, R; POHLMAN, B.L; BARTLETT, N.L; WISEMAN, G.A; PADRE, N; GRILLO-LO'PEZ, A.J; MULTANI, P; WHITE, C.A. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* vol.20, p:2453–2463, 2002.

WONG, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol.30, p:1-14, 2010.

WU L.L, CHIOU C.C, CHANG PY, WU J.T. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* Vol.339, p:1-9, 2004.

ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research.* vol15, p:11-18, 2005.

ZHIVOTOVSKY, B; ORRENIUS, S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol. 331, n. 3, p859-867, 2005.

6. ANEXOS



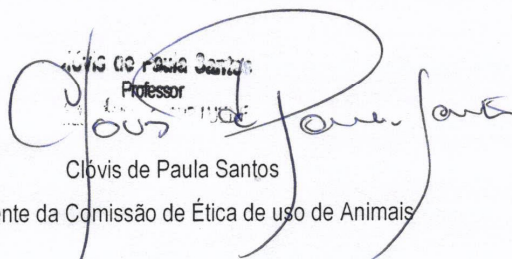
Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 192, intitulado "COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTINEOPLASICA: SELEÇÃO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* E ESTUDOS PRÉ CLÍNICOS" sob a responsabilidade do Dr. Milton M. Kanashiro, Centro de Biociências e Biotecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 18/12/2012. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 18/12/2016.

Campos dos Goytacazes, 18 de dezembro de 2012.

Clóvis de Paula Santos
Professor



Clóvis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais