

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE COMPLEXOS DE COBRE II COM LIGANTES N,O-DOADORES

MARINA BARRETO SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

MAIO DE 2020

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE COMPLEXOS DE COBRE II COM LIGANTES N,O-DOADORES

MARINA BARRETO SILVA

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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”

Orientador: Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
MAIO DE 2020

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE COMPLEXOS DE COBRE II COM LIGANTES N,O-DOADORES

MARINA BARRETO SILVA

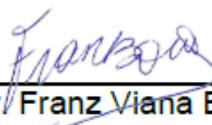
“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”

Aprovada em 29 de maio de 2020

Comissão Examinadora:



Drª Brunna Xavier Martins (UENF)



Prof. Dr. Franz Viana Borges (IFF)



Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra (UEZO)



Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (UENF)
ORIENTADOR

Oferta!

Ao Deus que enviou seu Filho unigênito, para que todo aquele que Nele crê não pereça, mas tenha vida eterna!

Homenagem póstuma!

Desejo homenagear de forma especial aos meus pais, Sebastião e Cremilda, que partiram antes de vivenciar esse momento da minha vida!

Dedicatória!

*Dedico esta Vitória a Deus
Por ter me oferecido a capacidade de sonhar e realizar;
Ter renovado as minhas forças todas as vezes que me senti desencorajada e impossibilitada diante dos obstáculos encontrados;
Ter me dado uma família maravilhosa que me apoiou incondicionalmente em todos os momentos e;
Ter me oferecido a oportunidade de conviver e aprender com Pessoas que se tornaram vidas da minha vida...*

AGRADECIMENTOS

Rendo nominalmente meus sinceros agradecimentos a instituições e pessoas que apoiaram a realização desse trabalho:

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, reconhecendo que Ele é o autor e consumidor de todas as coisas;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelo acolhimento e pela oportunidade de realizar uma pós-graduação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro em concessão de bolsa de estudo;

Ao prof. Dr Milton pela orientação e paciência dispensadas durante essa trajetória, contribuindo de forma decisiva para minha formação;

Ao prof. Dr Wagner da Silva Terra por gentilmente ceder os complexos para a realização desse trabalho;

Aos profs Drs Adolfo Horn e Cristiane Fernandes pela colaboração;

Ao prof. Dr João Almeida e a Dr Laura Maciel pela ajuda nas microscopias;

À Dr^a Brunna Xavier pela revisão da tese e contribuições valiosas para esse trabalho;

À Dr^a Letícia Oliveira pela solicitude e ajuda na microscopia de varredura;

Aos técnicos Núbia, Verônica, Rita, Juliana, Maurício e Fernando, pela ajuda imprescindível para o desenvolvimento dos experimentos;

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em analisar esse trabalho e trazer contribuições preciosas para a sua finalização;

Aos colegas do LBR, pelo companheirismo e amizade demonstrados durante a nossa convivência;

Aos meus pais, Sebastião e Cremilda (*in memoriam*) pela dedicação, ensinamentos e todo amor a mim dispensados;

Ao meu esposo Nilton pelo amor, paciência, compreensão e ajuda em todos os momentos;

Aos meus filhos Renato, Aline, Julia e Lilian e aos meus netos Lúvia, Letícia, Matheus e Miguel que continuarão a escrever a história da minha família;

A todos os meus familiares, que formam a minha identidade;

Enfim, sou grata a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para meu crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

TÍTULO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. CÂNCER.....	18
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.1.2. CANCEROLOGIA.....	19
1.1.3. MECANISMOS DE MORTE CELULAR E CÂNCER.....	22
1.1.4. TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS.....	27
1.1.5. METALOFÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.....	30
1.1.6. COMPLEXOS DE COBRE.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVO GERAL.....	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 DILUIÇÕES DOS COMPOSTOS AVALIADOS.....	37
4.2. LINHAGENS CELULARES E CULTIVO.....	37
4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	38
4.4. AVALIAÇÃO DE APOPTOSE POR ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	39
4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	40
4.6. ENSAIO DE ATIVIDADE DE CASPASES.....	40

4.7. AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E SUA INIBIÇÃO POR NAC.....	41
4.7.1. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO CONSTITUTIVA DE ROS POR CÉLULAS BXPC-3.....	41
4.7.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS EM CÉLULAS BXPC-3 TRATADAS COM COMPLEXO 1.....	41
4.8. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	42
4.9. EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO.....	42
4.9.1. ANIMAIS.....	42
4.9.2. DESENVOLVIMENTO DE LESÕES TUMORAIS EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE.....	43
4.9.3. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO 1.....	43
4.9.4. AVALIAÇÃO DO COMPLEXO 1 PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER PANCREÁTICO EM MODELO MURINO.....	43
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR COMPLEXOS DE COBRE (II).....	45
5.2. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR (SUB-G1).....	47
5.3. ESTUDO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$).....	49
5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CASPASES.....	51
5.5. AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELO COMPLEXO 1.....	52
5.5.1. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS POR CÉLULAS BXPC-3.....	52
5.5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS EM CÉLULAS BXPC-3 TRATADAS COM COMPLEXO 1.....	54
5.5.3. A CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO 1 É POTENCIALIZADA POR PRÉ-TRATAMENTO COM NAC.....	56

5.5.4. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR PROMOVIDAS PELA ASSOCIAÇÃO ENTRE O COMPLEXO 1 E O NAC.....	58
5.6. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS PELO COMPLEXO 1 NAS CÉLULAS BXPC-3.....	60
5.7. ESTUDOS COM O COMPLEXO 1 SOBRE O CÂNCER PANCREÁTICO <i>IN VIVO</i>	64
5.7.1. DESENVOLVIMENTO DE LESÕES TUMORAIS EM CAMUNDONGOS BALB/C <i>NUDE</i>	64
5.7.2 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO 1.....	64
5.7.3. ANÁLISE DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE LESÕES DE CÂNCER PANCREÁTICO HUMANO EM MODELO MURINO.....	65
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÃO.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*. Fonte: INCA, 2020.....19
- Figura 2.** Representação esquemática das características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose (Modificado de Tan, *et al.*, 2014).....27
- Figura 3.** Estrutura química dos complexos de cobre (II). (A) $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$, (B) $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e (C) $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$37
- Figura 4.** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células BxPC-3 tratadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cisplatina ($22 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (C) células tratadas com complexo 1 ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (D) células tratadas com complexo 1 ($7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).....48
- Figura 5.** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células BxPC-3 tratadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cisplatina ($22 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (C) células tratadas com complexo 2 ($4,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (D) células tratadas com complexo 2 ($9,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).....49
- Figura 6.** Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. Células BxPC-3 tratadas por 48 h e coradas com JC-1. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cisplatina ($22 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (C) células tratadas com complexo 1 ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (D) e células tratadas com complexo 1 ($7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).....50
- Figura 7.** Avaliação da ativação de caspases. Células BxPC-3 não tratadas, tratadas com o complexo 1 ($7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e cisplatina ($22 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (A) e (B) tratamentos por 12 e 24 h, respectivamente. As barras representam médias \pm DP de dois experimentos independentes realizados em duplicata. ***, $P < 0.001$ versus células não tratadas.....51

Figura 8. Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. Linhagem de câncer pancreático (BxPC-3) incubada por 3 h e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com 1,25; (C) 2,5 e (D) 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC.....53

Figura 9. Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. Linhagem de câncer pancreático (BxPC-3) incubada por 48 h e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com 1,25; (C) 2,5 e (D) 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC.....54

Figura 10. Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. Linhagem de câncer pancreático (BxPC-3) incubada por 48 h e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B e C) tratamento com 3,5 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (D e E) tratamento com 7,0 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (F e G) tratamento com 22,0 µmol.L⁻¹ de cisplatina; (C, E e G) amostras pré-tratadas por 2 h com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC antes da adição dos complexos.....56

Figura 11. Viabilidade das células BxPC-3 após exposição ao complexo 1 isoladamente e em associação aos tratamentos de 1.3, 2.5 e 5.0 mmol.L⁻¹ de NAC, por 48 horas. As curvas de dose-resposta foram obtidas no ensaio com MTT. Cada ponto de dados representa a média ± DP. (n = 3). ns, não significativo; ***, P < 0. 001.....57

Figura 12. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células BxPC-3 tratadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) tratamento com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC; (C) tratamento com 1,25 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (D) tratamentos com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC e 0,25 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (E) tratamento com 2,5 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (F) tratamentos com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC e 0,5 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (G) tratamento com 5,0 µmol.L⁻¹ de complexo 1; (H) tratamentos com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC e 1,0 µmol.L⁻¹ de complexo 1.....59

Figura 13. Fotomicrografias representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura da linhagem celular BxPC-3. (A e B) células não tratadas. (C e E) células tratadas com o complexo 1 (3,5 µmol.L⁻¹); e (D e F) células tratadas com

cisplatina ($11,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$), por 12 e 24 h, respectivamente. Símbolos: ponta de seta, comunicação intercelular; seta, filopódios; asterisco, lamelipódios; estrela, formação de corpos apoptóticos.....62

Figura 14. Morfologia ultraestrutural de células BxPC-3 analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fotomicrografias representativas: (A e B) células não tratadas. (C e E) células tratadas com o complexo 1 ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$); e (D e F) células tratadas com cisplatina ($11,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$), por 12 e 24 h, respectivamente. Símbolos: estrela, vesículas; asterisco, comunicação intercelular vesicular; ponta de seta, mitocôndrias.....63

Figura 15. Camundongos Balb/c *nude* com lesões tumorais de células de câncer pancreático BxPC-3, após 30 dias de inóculo ($n= 2$). Animais inoculados com 5×10^5 células (A); 1×10^6 células (B) e 5×10^6 células(C).....66

Figura 16. Eficácia do complexo 1 no crescimento de modelo de tumor pancreático humano a partir de células BxPC-3 em camundongos Balb/c *nude*. (A) curva de sobrevivência (Kaplan Meier); (B) Curvas de crescimento de lesões tumorais (volume médio do tumor em função do tempo); (C) peso total médio dos tumores dissecados no final do estudo; e (D) curvas de perda de peso corporal em função do tempo. $N = 6$; os dados foram analisados por ANOVA/Bonferroni e expressos como a média \pm DP; *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ vs. controle.....67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração inibitória (IC_{50}) dos complexos 1, 2, 3 e da cisplatina contra linhagens celulares neoplásicas em 48 h de tratamento.....46
- Tabela 2.** Comparação entre as concentrações inibitórias (IC_{50}) dos complexos 1, 2 e 3 frente a quatro linhagens celulares neoplásicas e PBMCs.....46
- Tabela 3.** Índice de Seletividade (IS) dos complexos 1, 2 e 3 frente às linhagens celulares neoplásicas.....47
- Tabela 4.** Concentração inibitória (IC_{50}) do tratamento só com complexo 1 e do tratamento conjunto de NAC com o complexo 1 contra a linhagem BxPC-3 em 48 h de incubação.....57
- Tabela 5.** Lesões tumorais promovidas por inoculação de células BxPC-3 em camundongos Balb/c *nude*.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

A549: Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano

ANOVA: Análise de Variância Entre Grupos

APAF-1: Protease de ativação apoptótica de fator 1 (do inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*)

AsPC-1: Linhagem celular de adenocarcinoma pancreático humano

ATCC: Coleção de Cultura de Tipo Americano (do inglês, *American Type Culture Collection*)

ATP: Adenosina tri-fosfato

Balb/c nude: Linhagem de camundongo atímico

B16-F10: Linhagem celular murina estabelecida de melanoma

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

BxPC-3: Linhagem celular de adenocarcinoma pancreático humano

CAD: DNase ativada por caspase (do inglês, *caspase-activated DNase*)

Capan-1: Linhagem celular de adenocarcinoma pancreático humano

COLO 205: Linhagem celular humana estabelecida de adenocarcinoma colorretal

DCFH-DA: 2,7-Diclorofluoresceína diacetato

DD: Domínio de morte

DISC: Complexo de sinalização de indução de morte (do inglês, *Death inducing signaling complex*)

DL₅₀: Dose letal para 50 % da amostra

DMEM-F12: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco: mistura de nutriente F-12 (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNase: Enzima desoxirribonuclease

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EUA: Estados Unidos da América

FADD: Fas associado ao domínio de morte (do inglês, *Fas-Associated Death Domain*)

Fas: Receptor de morte celular

Fas L: Ligante de receptor Fas

HPV: Papilomavírus Humano (do inglês, *Human Papiloma Virus*)

HEK 293: Linhagem celular embrionária renal não transformada

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

IC₅₀: Índice de citotoxicidade de 50%

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IP: Iodeto de Propídio

IS: Índice de Seletividade

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

LT- α : Linfotoxina- α

MCF-7: Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana

MDA-MB231: Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Molt-4: Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda humana

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

NAC: *N*-acetil-L-cisteína

NCI-H460: Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano

PANC-1: Linhagem celular de adenocarcinoma pancreático humano

PBMC: células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: Tampão Salino Fosfato (pH 7,2) (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*)

p NA: *p*-Nitroanilina

PMSF: Fluoreto de Fenilmetanosulfonila (do inglês, *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

PC3: Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humana

RNAase: Ribonuclease

ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

RPMI: Meio do Instituto parque Roswell (do inglês, Roswell Park Memorial Institute medium)

SFB: Soro Fetal Bovino

SkMel-5: Linhagem celular de melanoma humano

THP-1: Linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana

TNF: Fator de necrose tumoral

TNFr: Superfamília de receptores de fator de necrose tumoral

TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF

U937: Linhagem celular de linfoma histiocítico humano

$\Delta\Psi_m$: Variação do potencial de membrana mitocondrial

WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

RESUMO

O câncer é uma doença crônico-degenerativa que se apresenta como um desafio para a saúde pública mundial. Embora avanços terapêuticos tenham sido alcançados, alguns tipos de câncer ainda apresentam altas taxas de mortalidade. Esses fatores impulsionam a pesquisa por novos fármacos antineoplásicos. Este trabalho investigou a citotoxicidade *in vitro* de três novos complexos de cobre (II) $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$, contra várias linhagens de células cancerígenas. Os dois primeiros complexos foram avaliados quanto a indução de apoptose na linhagem de câncer pancreático BxPC-3. O complexo 1 foi testado por técnicas quantitativas e qualitativas adicionais quanto à indução de apoptose *in vitro*, além do potencial antineoplásico *in vivo* frente à células BxPC-3. Os resultados indicam que esses complexos, principalmente o (1) e o (2), apresentam atividade citotóxica proeminente contra as células cancerígenas testadas, sendo que o complexo 1 foi marcadamente mais eficaz do que a cisplatina sobre 12 linhagens cancerígenas. Os três complexos atuam seletivamente sobre a maioria das linhagens neoplásicas testadas. O mecanismo de ação promovido pelos complexos 1 e 2 sugerem a indução de apoptose, devido ao padrão de fragmentação do DNA celular detectado em citometria de fluxo. O complexo 1 promoveu também a perda do potencial de membrana mitocondrial, a ativação de caspases e alterações morfológicas e ultraestruturais típicas de apoptose. Além disso, o pré-tratamento de células BxPC-3 com o antioxidante NAC potencializa a atividade citotóxica e a capacidade de induzir apoptose do complexo 1. Em ensaio com camundongos Balb/c *nude in vivo*, o complexo 1 mostrou um excelente perfil de segurança, sendo quase dez vezes menos tóxico do que a cisplatina. Este complexo demonstrou, ainda, uma notável supressão do crescimento tumoral em lesões heterotópicas de células BxPC-3 em camundongos Balb/c *nude*, tanto em comparação com tratamento com a cisplatina, quanto com animais não tratados. Tais resultados ressaltam que os complexos 1 e 2 têm potenciais como agentes antineoplásicos, especialmente, o complexo 1 que emerge como um quimioterápico promissor.

Palavras-chave: Complexos de cobre (II). Citotoxicidade. Apoptose. Câncer pancreático.

ABSTRACT

Cancer is a chronic-degenerative disease that presents itself as a challenge for public health worldwide. Although therapeutic advances have been achieved, some types of cancer still have high mortality rates. These factors drive the search for new antineoplastic drugs. This work investigated the cytotoxicity *in vitro* of three new copper (II) complexes [Cu₂(Salandi α)Cl₂], [Cu₂(Salandi β)Cl₂] \cdot 2H₂O and [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂, against several cancer cell lines. The first two complexes were evaluated for the induction of apoptosis in the pancreatic cancer line BxPC-3. Complex 1 was tested by additional quantitative and qualitative techniques for inducing apoptosis *in vitro*, in addition to the antineoplastic potential *in vivo* against BxPC-3 cells. The results indicate that these complexes, mainly (1) and (2), show prominent cytotoxic activity against the cancer cells tested, with complex 1 being markedly more effective than cisplatin on 12 cancer lines. The three complexes act selectively on most of the tested neoplastic lines. The mechanism of action promoted by complexes 1 and 2 suggests the induction of apoptosis, due to the fragmentation pattern of cellular DNA detected in flow cytometry. Complex 1 also promoted loss of mitochondrial membrane potential, activation of caspases and morphological and ultrastructural changes typical of apoptosis in BxPC-3 cells. In addition, the pretreatment of BxPC-3 cells with the antioxidant NAC enhanced the cytotoxic activity and the ability to induce apoptosis of the complex 1. In a trial with Balb/c *nude* mice *in vivo*, complex 1 showed an excellent safety profile, being almost ten times less toxic than cisplatin. This complex also demonstrated a remarkable suppression of tumor growth in heterotopic lesions of BxPC-3 cells in Balb/c *nude* mice, both in comparison with treatment with cisplatin and with untreated animals. Such results emphasize that complexes 1 and 2 have potential as antineoplastic agents, especially complex 1 that emerges as a promising chemotherapeutic agent.

Keywords: Copper (II) complexes. Cytotoxicity. Apoptosis. Pancreatic cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

A morbimortalidade do câncer tem um impacto relevante na saúde pública mundial (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2019). Estimativas gerais indicaram que houve uma incidência de 18,1 milhões de casos de câncer em todo o mundo em 2018, com a ocorrência de 9,6 milhões de mortes devido a esta doença (FERLAY, *et al.*, 2019).

Embora avanços significativos na terapia contra o câncer tenham sido alcançados ao longo dos anos, alguns tipos de câncer (pulmão, colorretal, estômago, fígado, mama e pâncreas) ainda apresentam altas taxas de mortalidade, devido às restrições dos tratamentos utilizados rotineiramente, como os efeitos colaterais severos, a toxicidade e a resistência inerente e adquirida aos tratamentos (WHO, 2018; MARTINS, *et al.*, 2019).

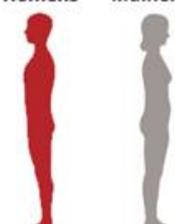
Estimativas apontam a ocorrência de 23,6 milhões de novos diagnósticos de câncer em todo o mundo a cada ano até 2030, com milhões de mortes ocasionadas pela doença. Esse estudo está baseado em aspectos socioeconômicos, demográficos e biológicos da população. Os países em desenvolvimento e subdesenvolvidos serão os mais afetados e com maior percentual de óbitos (BRAY, *et al.*, 2012; BARBOSA, *et al.*, 2015).

A divulgação de relatórios coordenados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) alertam que, se as tendências atuais continuarem, haverá um aumento mundial de 60% nos casos de câncer nas duas próximas décadas. Segundo esses relatórios, os países de baixa e média renda terão o maior ônus com 81% de novos casos estimados da doença, pois os seus serviços de saúde não estão equipados para prevenir, diagnosticar e tratar cânceres (WHO, 2020).

Segundo a OMS, uma ampla gama de intervenções comprovadas para prevenir novos casos de câncer deve ser destacada. Como, por exemplo, o controle do uso de tabaco (responsável por 25% das mortes por câncer) a vacinação contra a hepatite B para prevenir o câncer de fígado, a eliminação do

câncer do colo do útero pela vacinação contra o HPV e a triagem e o tratamento de cânceres de alta incidência. O gerenciamento dessas intervenções poderia desonerar o sistema público de saúde e garantir o acesso a cuidados básicos para a população (WHO, 2020).

No Brasil, uma estimativa feita pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva indica que ocorrerão 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença serão a obesidade, o sedentarismo, o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas e uma dieta pobre em vegetais. Os tipos de câncer estimados para serem os mais frequentes na população brasileira estão apresentados na Figura 1 (INCA, 2020).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.220	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*. Fonte: INCA, 2020.

A OMS afirma que nos últimos 50 anos, houve enormes avanços nas pesquisas sobre prevenção e tratamento do câncer. No entanto, os países devem enfrentar o desafio de selecionar tratamentos que considerem o custo, a viabilidade e a eficácia. Assim, todos os governos têm a tarefa de escolher as terapias inovadoras, eficazes e acessíveis, que possam proporcionar benefícios no combate ao câncer sem causar dificuldades financeiras (WHO, 2020).

1.1.2. CANCEROLOGIA

Câncer é um termo genérico usado para denominar neoplasias malignas. Essa patologia engloba um conjunto heterogêneo de mais de 200 doenças

caracterizadas, principalmente, por uma proliferação desordenada e descontrolada de células anormais que crescem além de seus limites usuais. As células que compõem a massa tumoral possuem variados níveis de diferenciação, sendo pouco semelhantes ao tecido de origem. Essas células são anaplásicas, pleomórficas, com núcleo hipercromático, e apresentam uma proliferação atípica com potencial invasivo e metastático. Embora já se tenha muito conhecimento sobre a fisiologia da célula cancerígena, as causas biológicas desse fenótipo ainda estão sendo elucidadas (LÓPEZ-LÁZARO, 2018; SINHA, 2018).

As neoplasias podem ser classificadas com base na origem embrionária dos tecidos dos quais derivam as células neoplásicas ou pelo tipo histológico presente na massa tumoral. As neoplasias benignas são denominadas de acordo com a origem celular adicionada do sufixo OMA. Por exemplo, os tumores originados no tecido ósseo, adiposo e muscular, recebem a nomenclatura de osteoma, lipoma e leiomioma, respectivamente. No entanto, existem neoplasias malignas denominadas com esse mesmo sufixo, como é o caso dos linfomas (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2018).

Por outro lado, a classificação das neoplasias malignas é dividida em seis categorias principais: carcinoma, sarcoma, mieloma, linfoma, leucemia e tipos mistos. Os tumores denominados carcinomas são originados de células epiteliais de revestimento externo e interno, contudo, quando o epitélio de origem é glandular, esses passam a ser chamados adenocarcinomas. Os sarcomas são tumores originários dos tecidos conjuntivos como ossos, tendões, cartilagem, músculo e gordura. Mieloma é a nomenclatura dada ao câncer originado nos plasmócitos da medula óssea. Os cânceres derivados de células dos tecidos linfáticos denominam-se linfomas. São chamadas leucemias, os cânceres que se desenvolvem no tecido hematopoiético medular, e por fim, a denominação de tipos mistos se refere aos cânceres que apresentam categorias histológicas distintas (ALBERTS, *et al.*, 2010; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2018).

A desordem genética que origina o câncer envolve alguns genes cruciais nos processos de regulação do ciclo celular e do processo de morte celular programada. Os principais grupos de genes responsáveis pelo processo de cancerogênese são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (VOGELSTEIN, KINZLER, 2004; CIVETTA, CIVETTA, 2011).

Os proto-oncogenes são responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e morte celular. Quando esses genes são acometidos por mutações que promovem alterações estruturais que comprometem o seu funcionamento normal, passam a ser denominados oncogenes. Ao assumir esta conformação passam a ser constitutivamente ativos e seus produtos protéicos passam a ser denominados de oncoproteínas. Essas proteínas anormais atuam de forma descontrolada, o que contribui para o desenvolvimento de neoplasias (CROCE, 2008).

Os genes supressores de tumor estão associados às vias de supressão do ciclo celular e metástase, reparo do DNA e ao processo de morte celular programada. As mutações, por inserção, deleção, mutação pontual ou silenciamento, nesses genes podem alterar a sua estrutura causando a perda da funcionalidade dos seus produtos gênicos. Assim, o controle dos processos de divisão e morte celular fica comprometido, favorecendo a proliferação de células anormais, o que contribui para o desenvolvimento do câncer (GUDISEVA, *et al.*, 2017).

As neoplasias constituídas por células que proliferam lentamente e são bem diferenciadas são originadas pela atividade de oncogenes com mutações que não comprometeram sua função na diferenciação celular. Essas massas tumorais são benignas e podem ser removidas por excisão cirúrgica, geralmente, sem acarretar riscos graves à saúde do paciente. Além disso, a ausência de potencial invasivo dessas neoplasias faz com que não haja recorrência de tumores (SINHA, 2018).

As neoplasias malignas compreendem as massas de células cancerígenas que possuem alto grau de instabilidade genética, ou seja, são muito suscetíveis a sofrer e acumular mutações que resultam em habilidades, tais como: insensibilidade a inibidores de crescimento; auto-suficiência em fatores de crescimento; evasão da apoptose; capacidade de divisão indefinida; angiogênese sustentada; perfusão tecidual e potencial metastático (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

O processo metastático, que consiste na disseminação sistêmica de células cancerígenas através da invasão da matriz extracelular e da membrana basal de vasos sanguíneos e linfáticos, dificulta a erradicação do câncer. Isso acontece porque a localização e a extensão das lesões metastáticas podem ser

incompatíveis com ressecções cirúrgicas e radioterapia. Por isso, os tumores resultantes das metástases são responsáveis por cerca de 90% dos óbitos causados por câncer (CHEN, HANN, WU, 2011; KAWADA, MAKOTO, 2011).

Embora a gênese do câncer possa estar relacionada a uma predisposição genética, apenas cerca de 10 % dos casos são hereditários. A doença também pode ser decorrente da exposição repetida a fatores indutores denominados carcinógenos. Estes podem ser: agentes químicos e físicos, infecções por microrganismos, condições imunes e/ou hormonais e mutações que podem ocorrer durante o metabolismo. Esses fatores promovem o início da carcinogênese atuando juntos ou em sequência (SIEBER, HEINIMANN, TOMLINSON, 2003; TOMASETTI, LI, VOGELSTEIN, 2017).

Entretanto, um estudo realizado por Tomasetti e Vogelstein (2015) atribui a ocorrência do câncer a constantes divisões das células normais para a renovação e manutenção da homeostase tecidual. Isto sugere que apenas um terço dos casos de câncer pode ser atribuído aos fatores ambientais e/ou hereditários, enquanto mutações genéticas aleatórias, originadas pelo processo de replicação do DNA em células tronco normais, seriam responsáveis pelo surgimento da maioria dos casos da doença (TOMASETTI, VOGELSTEIN, 2015).

O conhecimento acerca dos fatores que influenciam a gênese do câncer ainda não está completamente elucidado, mas as hipóteses concordam que as alterações genéticas e epigenéticas caracterizam o fenótipo das células cancerígenas. Algumas dessas alterações estão correlacionadas com falhas na execução dos mecanismos de morte celular (TOMASETTI, VOGELSTEIN, 2015; LÓPEZ-LÁZARO, 2018).

1.1.3. MECANISMOS DE MORTE CELULAR E CÂNCER

A homeostase celular, em algumas circunstâncias, entra em desequilíbrio e o processo de morte celular é desencadeado. Essa resposta é fundamental, em muitas situações, ao longo da vida de um organismo. Vários estímulos, fisiológicos e patológicos, podem deflagrar a morte celular. Além disso, a regulação do processo de morte celular desempenha um papel crucial sobre o metabolismo, em resposta a danos no DNA, no desenvolvimento de células de defesa e na eliminação de células potencialmente nocivas, sendo o desequilíbrio

deste processo correlacionado a várias patologias, incluindo o câncer (OKADA, MAK, 2004; PEIXOTO, GALVÃO, MEDEIROS, 2017).

Recentemente Tang, *et al.*, (2019) publicaram uma revisão que compilou uma grande quantidade de informações existentes acerca do conhecimento sobre mecanismos de morte celular. Os autores relataram que, além dos processos de morte celular que já são bem definidos, um número crescente de novas formas de morte celular regulada não-apoptótica foram identificadas e estão cada vez mais implicadas em várias patologias humanas. Esses tipos não-apoptóticos de morte celular regulada incluem a necroptose, a piroptose, a ferroptose, a morte celular entótica, a morte celular netótica, o partanatos, a morte celular dependente de lisossomo, a morte celular dependente de autofagia, a alcaliptose e a oxeiptose. Entretanto, os mecanismos de morte celular mais conhecidos são, a necrose, a autofagia e a apoptose (TANG, *et al.*, 2019).

A necrose é um tipo de morte celular associada com reações inflamatórias locais e/ou sistêmicas dependendo da severidade da injúria e da extensão tecidual afetada por danos físicos ou químicos. Portanto, a necrose pode ser considerada como um tipo de morte celular não fisiológica, causada por fatores externos. Por outro lado, ela também é considerada uma resposta celular a insultos graves associados à inflamação, infecção ou isquemia, que geralmente provocam alterações do potencial de membrana, depleção de energia celular e privação de nutrientes (GOLSTEIN, KROEMER, 2007). É considerada uma resposta passiva à injúria celular, sendo referida como morte celular patológica ou "acidental" sem controle genético (ALBERTS, *et al.*, 2010). Entretanto, estudos sugerem que a necrose pode ter algum nível de regulação genética, sem gasto energético (ZONG, THOMPSON, 2006).

As células necróticas exibem características morfológicas como: aumento do volume celular e vacuolização citoplasmática, agregação da cromatina, degeneração de organelas e perda da integridade da membrana plasmática com consequente ruptura celular. Após o extravasamento da membrana, o conteúdo intracelular liberado induz resposta inflamatória atraindo células imunitárias citolíticas que causam dano às células circunvizinhas (PORTUGAL, BATALLER, MANSILLA, 2009; TAN, *et al.*, 2014).

Alguns tratamentos contra o câncer podem induzir morte celular por necrose, como por exemplo, a administração de alguns fármacos antineoplásicos,

em determinadas concentrações, e radioterapia que promovam catástrofe mitótica e conseqüente morte celular necrótica (RICCI, ZONG, 2006). A resposta inflamatória induzida por esse tipo de morte pode aumentar a eficácia da quimioterapia através do recrutamento de células do sistema imune para o microambiente tumoral. Por outro lado, esta reação inflamatória, se exacerbada, pode causar injúrias severas em tecidos normais adjacentes à massa tumoral, além de induzir a produção de mitógenos e citocinas de pró-sobrevivência, ativar vias de sinalização de promoção de proliferação celular, e ainda, favorecer a ocorrência de metástases (PORTUGAL, BATALLER, MANSILLA, 2009; PEIXOTO, GALVÃO, MEDEIROS, 2017).

A morte celular autofágica é uma consequência de taxas elevadas e persistentes de autofagia, mecanismo no qual células sofrem autodigestão parcial. Este tipo de morte tem sido referido como “suicídio celular” por mecanismo não-apoptótico (LOCKSHIN, ZAKERI, 2004). A autofagia consiste num evento proteolítico intracelular, conservado evolutivamente, que possui importante função de degradação e reciclagem de componentes celulares desnecessários ou não funcionais (SHINTANI, KLIONSKY, 2004; LEVINE, KROEMER, 2008).

A morte celular autofágica é um mecanismo geneticamente controlado, classificado como morte celular programada tipo II, responsável pelo controle do equilíbrio entre anabolismo e catabolismo favorecendo o desenvolvimento normal das células (YANG, 2010). Em certas condições patológicas, a persistência da autofagia pode induzir morte celular (LEVINE, KROEMER, 2008).

A autofagia é um processo dinâmico que ocorre normal e continuamente mesmo na ausência de qualquer estresse externo, particular ou promovido (TSUJIMOTO, SHIMIZU, 2005). No entanto, este processo é acentuadamente estimulado por condições de hipóxia, temperaturas elevadas, e pelas privações nutricionais e hormonais. Nestas condições de estresse, a autofagia atua no sentido de reciclar e recuperar constituintes básicos para obtenção de energia até que as reservas sejam exauridas e a célula entre em falência nutricional e estrutural, deflagrando um processo de morte silencioso, sem ativar resposta inflamatória (LEMASTERS, 2005; CHEN, *et al.*, 2014).

A apoptose, morte celular programada do tipo I, é um processo altamente seletivo e importante, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Esta

modalidade de morte celular ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, no remodelamento tecidual, na atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células danificadas por agentes genotóxicos (THOMPSON, 1995; ELMORE, 2007; WONG, 2011).

A morte celular por apoptose pode ser deflagrada por um programa interno (controle genético) ou por agentes extracelulares. Existem diversos fatores indutores de apoptose, tais como: mudança de osmolaridade, danos genéticos irreparáveis, condições de hipóxia, agentes quimioterápicos, radiações ionizantes e ultravioleta, choque térmico, privação de fatores de crescimento e níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; TANG, *et al.*, 2019).

As células apoptóticas apresentam alterações morfológicas e bioquímicas marcantes. Dentre as características morfológicas que permitem diagnosticar esse fenótipo, estão: a contração celular e condensação citoplasmática (picnose), a retração de pseudópodes, a condensação perinuclear da cromatina, a fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos. As alterações bioquímicas são: a externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, a fragmentação específica do DNA e a ativação de um grupo de proteases cisteínicas, denominadas caspases (MCCARTHY, EVAN, 1998; XU, *et al.*, 2019).

A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias distintas, a via extrínseca, mediada por receptores de morte e a via intrínseca mediada pela mitocôndria. No entanto, ambas as vias podem se interligar em um dado momento, convergindo na fase executora da apoptose (HONG, *et al.*, 2015).

A via extrínseca é ativada por estímulos externos, ou seja, pela via dos ligantes de morte, tais como: Fas L, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), linfotóxina- α (LT- α) e os ligantes indutores de apoptose relacionados com TNF (TRAIL) que reconhecem e se ligam aos seus receptores específicos na membrana. Estes receptores de morte pertencem a superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNFr) e são caracterizados pela presença de uma sequência de aminoácidos rica em cisteína na porção extracelular, denominados domínio de morte (DD), responsáveis pelo reconhecimento dos seus ligantes (ELMORE, 2007; HONG, *et al.*, 2015).

A apoptose pela via extrínseca é iniciada quando ocorre a interação entre ligantes e receptores de morte com a promoção de uma trimerização dos DDs e consequente recrutamento de moléculas adaptadoras (FADD) e da procaspase 8 formando um complexo indutor de sinal de apoptose (DISC). Após a formação do DISC, ocorre a autoclivagem da procaspase 8 que ao ser ativada prossegue a via apoptótica com a ativação da pro-caspase 3. Esta, por sua vez, é uma caspase efetora que cliva substratos celulares imprescindíveis para a homeostasia celular além de ativar a endonuclease CAD (caspase-activated DNase) que transloca-se para o núcleo da célula e cliva o DNA em fragmentos oligonucleossomais determinando a morte celular (ASHKENAZI, DIXIT, 1998; GARCÍA, *et al.*, 2012).

Por outro lado, a via apoptótica mitocondrial, ou via intrínseca, é ativada por estímulos internos, tais como: hipóxia, concentrações elevadas de Ca^{2+} citosólico, radiação, cinases e inibidores de fosfatases, drogas quimioterapêuticas, dano genético irreparável e espécies reativas de oxigênio (ROS) que são alguns fatores causadores de estresse celular (ELMORE, 2007). Nessas condições, ocorre um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), promovendo uma alteração dos níveis de Ca^{2+} na matriz, com aumento do volume mitocondrial por osmose, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e por fim, a liberação do citocromo c do espaço intermembranar. Este pode, então, se complexar com as proteínas citosólicas Apaf-1 e a pro-caspase 9 para formar o apoptossoma. Este complexo formado promove a ativação da caspase 9 que, por sua vez, cliva as pro-caspases 3, 6 e 7 ativando-as. Uma vez ativas, estas proteases iniciam a fase efetora da apoptose através da clivagem de proteínas funcionais e estruturais da célula e ativação de endonucleases, levando a célula à morte (FISCHER, SCHULZE-OSTHOFF, 2005; PEIXOTO, GALVÃO, MEDEIROS, 2017).

A apoptose é finamente regulada em todas as suas etapas, incluindo os estágios de iniciação, cascata de sinalização e execução. Assim, mutações que alterem a expressão de genes que codificam proteínas indispensáveis para o funcionamento normal da maquinaria enzimática do evento apoptótico, podem fornecer às células neoplásicas uma vantagem intrínseca de sobrevivência e uma inerente resistência aos fármacos quimioterápicos (TAN, *et al.*, 2009). Deste modo, fármacos ou estratégias de tratamento que possam restaurar essas vias de sinalização possuem potencial para eliminar neoplasias (TAN, *et al.*, 2014).

Geralmente, células neoplásicas apresentam mutações que afetaram alguns níveis da cascata apoptótica. Alguns mecanismos utilizados para evasão da apoptose são: desequilíbrio entre os níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas, diminuição da função de caspases e alterações nas vias de sinalização de receptores de morte (WONG, 2011).

A execução fisiologicamente anormal da apoptose está associada a processos patológicos, como doenças infecciosas, neurodegenerativas, autoimunes e neoplásicas. Desse modo, o mecanismo apoptótico constitui-se uma importante estratégia terapêutica na prática clínica em várias condições patológicas. Por conseguinte, a compreensão dos mecanismos moleculares que regem as vias da morte celular apoptótica é condição indispensável no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças, incluindo o câncer (WONG, 2011; TANG, *et al.*, 2019).

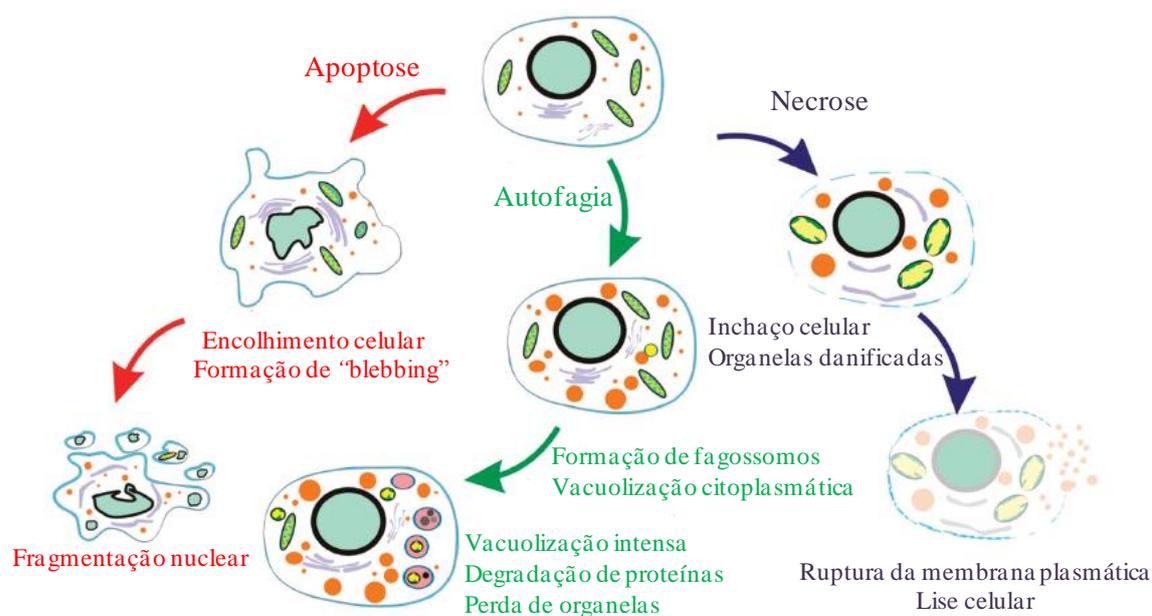


Figura 2. Representação esquemática das características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose (Modificado de Tan, *et al.*, 2014).

1.1.4. TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS

Os principais tratamentos antineoplásicos usados rotineiramente incluem: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. No entanto, existem outras modalidades

mais específicas de tratamentos como a imunoterapia, as terapias fotodinâmica e hormonal, os transplantes de medula óssea entre outros (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2016).

O procedimento cirúrgico consiste na ressecção do tumor, quando a localização do mesmo é anatomicamente favorável. No entanto, em muitos tipos de cânceres, nos quais as células cancerosas estão disseminadas, apenas esse procedimento não é suficiente para erradicar a doença. Nestes casos há a necessidade de uma associação de terapias como, por exemplo, cirurgia e radioterapia que são eficazes como tratamentos locais de cânceres primários que ainda não se disseminaram sistemicamente. Entretanto, o desenvolvimento precoce de metástases é uma característica muito frequente na cancerogênese, assim, geralmente é necessária uma abordagem sistêmica para a contenção da doença (MURAD, KATZ, 2000; ALBERTS, *et al.*, 2010).

A radioterapia é utilizada para tumores localizados que não podem ser totalmente removidos ou aqueles que costumam recidivar localmente após a cirurgia. Essa terapia consiste na incidência de um feixe de radiação ionizante direcionado ao tecido tumoral. O objetivo desse procedimento é lesionar extensamente o DNA das células neoplásicas, inviabilizando sua divisão e sobrevivência (JANNEKE, *et al.*, 2010).

O tratamento quimioterápico consiste na administração de uma combinação de medicamentos que têm ação citotóxica capaz de matar células ou inibir sua proliferação. Tais compostos podem ser categorizados em diferentes classes, de acordo com o seu mecanismo de ação. Entre estas classes encontram-se: os alquilantes, os antimetabólicos, os antibióticos antineoplásicos, os inibidores mitóticos e outros (ESPINOSA, RAPOSO, 2010; FUCHS, WANNMACHER, 2010).

A propriedade alquilante consiste na capacidade de substituir um átomo de hidrogênio por um radical alquil em outra molécula. Compostos dessa natureza se ligam ao DNA e impedem a separação dos filamentos na dupla hélice e, conseqüentemente, a replicação do material genético. Este processo promove lesões no DNA e inviabiliza a proliferação celular. A cisplatina é um fármaco alquilante amplamente utilizado na clínica oncológica (KOSTOVA, 2006).

Os agentes antineoplásicos classificados como antimetabólicos atuam na fase de síntese do ciclo celular. Essa atuação consiste na inibição da biossíntese

de componentes essenciais para a duplicação do material genético, impedindo o metabolismo normal da célula e, por consequência, a proliferação celular. Como exemplos, o 5-fluorouracil e o metotrexato (GUICHARD, *et al.*, 2017).

Os antibióticos antineoplásicos têm como mecanismo de ação a produção de radicais livres reativos, pela incorporação de excesso de elétrons em seus anéis insaturados, que interagem com o DNA inibindo sua síntese. Alguns antibióticos possuem outros grupos funcionais que lhes conferem outras propriedades como a alquilação, a inibição enzimática e a intercalação ao DNA, a exemplos, a mitomicina C, a mitramicina e a epirrubicina, respectivamente (ALMEIDA, *et al.*, 2005; FUCHS, WANNMACHER, 2010).

Os inibidores mitóticos atuam especificamente na fase de divisão celular. Esses paralisam a mitose atuando sobre a tubulina, proteína formadora de microtúbulos que constituem o fuso espiralar, através do qual ocorre a migração dos cromossomos. Por conseguinte, a fase de metáfase é interrompida, uma vez que, a migração dos cromossomos fica impedida, culminando na interrupção da divisão celular. Os alcalóides da vinca rósea (vincristina e seus análogos) e os derivados da podofilotoxina (etoposídeo e teniposídeo) fazem parte dessa classe de quimioterápicos (FUCHS, WANNMACHER, 2010; GUICHARD, *et al.*, 2017).

Alguns quimioterápicos não se enquadram em nenhuma classe de ação farmacológica. Entre esses, a dacarbazina, a procarbazina e a L-asparaginase podem ser destacadas por serem indicadas no tratamento de alguns cânceres (FUCHS, WANNMACHER, 2010).

Embora a quimioterapia seja um pilar importante da medicina oncológica, essa forma de tratamento apresenta limitações farmacológicas relacionadas aos efeitos adversos causados. Esses efeitos, geralmente, se referem à ação inespecífica que leva à morte não só as células cancerosas, mas também linhagens de células saudáveis que também apresentem elevadas taxas proliferativas, tais como as células hematopoiéticas, epiteliais e queratinócitos da matriz capilar. A morte indiscriminada dessas células leva o paciente a ter uma maior susceptibilidade às infecções, a degeneração das mucosas e a queda acentuada de cabelos (ALMEIDA, *et al.*, 2005; GUICHARD, *et al.*, 2017).

A resistência intrínseca de alguns tumores a determinadas drogas e a resistência a múltiplas drogas, adquirida durante o tratamento, também têm sido apontados como uma das principais causas de insucesso terapêutico e óbitos.

Esses fatos desafiam a comunidade científica a buscar novos recursos para sanar ou amenizar as deficiências dos tratamentos disponíveis atualmente (FLOREA, BÜSSELBERG, 2011; DILRUBA, KALAYDA, 2016).

1.1.5. METALOFÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Embora o uso de compostos inorgânicos para o tratamento de enfermidades seja muito antigo, até a descoberta da atividade antitumoral do complexo denominado cisplatina, por Rosenberg e colaboradores na década de 1960, quando estudavam os efeitos do campo elétrico em culturas da bactéria *Escherichia coli*, não havia grande interesse em sintetizar ou entender as bases moleculares responsáveis pelo mecanismo de ação de compostos metálicos (ROSENBERG, VAN CAMP, KRIGAS, 1965; DILDA, HOGG, 2007).

Os metalofármacos são compostos de coordenação que contêm íons metálicos ligados a moléculas orgânicas (ligantes). Estas moléculas apresentam importante função de potencializar as propriedades terapêuticas do complexo e, podem ainda, limitar os efeitos tóxicos do metal (STORR, THOMPSON, ORVIG, 2006; BRUIJNINCX, SADLER, 2008;).

O grande avanço da quimioterapia moderna aconteceu durante a década de 70, com a introdução da cisplatina, que tem sido reconhecida como um potente agente antitumoral desde então. Este fármaco [*cis*-diaminodicloroplatina(II)] é constituído por moléculas compostas por um átomo central de platina coordenado a dois átomos de cloro e duas aminas e tem propriedade alquilante (KOSTOVA, 2006).

A cisplatina possui atividade descrita contra câncer de ovário, bexiga, cabeça e pescoço, esôfago, coluna cervical, endométrio e tem se apresentado eficaz na cura da maioria dos pacientes com câncer de testículo (RAJESWARAN, TROJAN, BURNAND, 2008). Entretanto, sua administração provoca vários efeitos colaterais, dentre os quais, pode-se destacar: a nefrotoxicidade, a neurotoxicidade e a ototoxicidade. Outro problema ainda apresentado é a quimiorresistência adquirida por alguns tumores a esse medicamento (PERES, CUNHA, 2013; DILRUBA, KALAYDA, 2016).

O êxito clínico da cisplatina impulsionou a busca por novos compostos de coordenação de platina. Essa busca resultou na produção de cerca de treze

análogos, os quais já foram avaliados em ensaios clínicos (MJOS, ORVIG, 2014). Contudo, os metalofármacos derivados de platina mais comumente utilizados na clínica oncológica são a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina (MARKOWSKA, *et al.*, 2015).

A produção de metalofármacos tem se valido de variadas estruturas de ligantes e diferentes centros metálicos com intuito de obter complexos com perfis farmacológicos superiores. Dentre as características desejáveis aos candidatos a quimioterápicos estão à capacidade de transpassar membranas biológicas, elevada, ampla e específica atividade citotóxica, reduzidos efeitos colaterais e desencadeamento de morte celular por apoptose (TAN, *et al.*, 2014; FERNANDES, *et al.*, 2015).

Nesse contexto, novos compostos têm sido estudados com diferentes objetivos, como, por exemplo, simular a ação de nucleases naturais, as quais possuem íons metálicos como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} e são capazes de neutralizar a carga do DNA e formar ligações com o mesmo. Esta propriedade pode ser explorada para promover um aumento da atividade citotóxica contra células neoplásicas e a redução dos efeitos colaterais apresentados pelos fármacos já em uso na quimioterapia. Dentre os centros metálicos, diferentes de platina, mais discutidos e trabalhados podem-se destacar os seguintes elementos: Rutênio, Gálio, Ferro, Paládio, Ouro, zinco, titânio e Cobre. Os complexos formados têm apresentado potencial atividade antineoplásica, muitas vezes mais acentuada do que a cisplatina (HORN, *et al.*, 2013; FERNANDES, *et al.*, 2015; BORGES, *et al.*, 2016; MORCELLI, *et al.*, 2016; YANG, *et al.*, 2018; GU, *et al.*, 2019).

1.1.6. COMPLEXOS DE COBRE

O cobre é considerado um elemento traço essencial, sendo componente de diversas metaloenzimas imprescindíveis para a homeostase do organismo. Este elemento químico possui uma distribuição tecidual ampla, sendo encontrado na forma de complexos orgânicos. O cobre é importante para o funcionamento de várias enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo, participando da detoxificação de radicais livres, da respiração mitocondrial, do auxílio ao metabolismo do ferro e outros processos fisiológicos críticos para a manutenção

da homeostasia. Assim, ele pode ser considerado um potencial agente farmacológico com o pressuposto de apresentar menor toxicidade que os metais pesados não endógenos (BHATTACHARJEE, CHAKRABORTY, SHUKLA, 2017; GU, *et al.*, 2019; LU, *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, várias famílias de complexos de cobre têm sido estudadas e mostram potenciais propriedades terapêuticas como: ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e anticancerígena (BOULSOURANI, *et al.*, 2017; SHOBHA DEVI, *et al.*, 2018).

Vários complexos de cobre (II) têm sido sintetizados e propostos como potenciais agentes anticâncer, com base em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Numerosos estudos mostram que muitos desses derivados exibem atividade citotóxica proeminente, geralmente relacionada à capacidade de ligar e clivar DNA (por exemplo, a ação de intermediários ativos de oxigênio que podem atuar como uma espécie ativa para a cisão do DNA) e regular a apoptose (LI, *et al.*, 2014; BORGES, *et al.*, 2016; YANG, *et al.*, 2018). O potencial anticâncer do cobre (II) é evidenciado pelo crescente número de investigações descritas na literatura (SANTINI, *et al.*, 2014; MEDICI, *et al.*, 2015; SHOBHA DEVI, *et al.*, 2018).

Em 2017, Serment-guerrero e colaboradores relataram que dentre os complexos de cobre projetados para serem usados como agentes antineoplásicos um grupo, genericamente, denominado de Casiopeínas se destacou. Os autores argumentaram que alguns desses compostos mostraram resultados promissores e, que um deles chamado Casiopeína III-ia, identificado pelo código (Cas III-ia Aqua(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonato) copper (II) nitrate), já tinha os testes pré-clínicos concluídos e estava pronto para iniciar a fase clínica I de testes (SERMENT-GUERRERO, *et al.*, 2017).

Seguindo essa vertente, nosso grupo de pesquisa tem relatado resultados promissores de trabalhos que consistem na síntese, caracterização e investigação da atividade biológica de alguns compostos de coordenação com centros de ferro (III) (HORN, *et al.*, 2013), cobre (II) (FERNANDES, *et al.*, 2015; BORGES, *et al.*, 2016), cobalto (II) (MORCELLI, *et al.*, 2016) e platina (II) (MOREIRA, *et al.*, 2019).

Considerando-se isso, novos complexos de cobre (II) com ligantes *N,O*-doadores derivados do H₂Salan, binucleares ([Cu₂(Salandi α)Cl₂]) (1) e ([Cu₂(Salandi β)Cl₂] \cdot 2H₂O) (2) e mononuclear [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ (3) com ligante

contendo amida foram sintetizados e caracterizados como descrito (TERRA, 2016).

Os três complexos inéditos foram avaliados *in vitro*, quanto à atividade citotóxica, sobre algumas linhagens de células neoplásicas. O mecanismo de ação desses complexos foi estudado por análise do ciclo celular para verificação de indução de morte celular por apoptose. O complexo 1 foi adicionalmente testado, *in vitro*, quanto aos seguintes parâmetros: variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), atividade enzimática de caspases, promoção de mudanças morfológicas e ultraestruturais e indução de geração de espécies reativas de oxigênio. A eficácia *in vivo* do complexo 1 foi examinada em um modelo xenográfico murino de câncer pancreático humano.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença crônico-degenerativa que se apresenta atualmente como um dos principais desafios da saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) alertam que, se as tendências atuais continuarem, haverá um aumento mundial de 60% nos casos de câncer nas duas próximas décadas. Segundo esse relatório, os países de baixa e média renda terão o maior ônus, com 81% de novos casos estimados da doença, pois os seus serviços de saúde não estão equipados para prevenir, diagnosticar e tratar cânceres. Com isso, a mortalidade aumenta a cada ano e, as estimativas apontam que o câncer se tornará a principal causa de mortes até o ano de 2030 (WHO, 2020).

Embora haja avanços nos métodos de tratamento para minimizar os impactos acarretados pelo câncer, ainda não existem fármacos com eficácia para garantir a sobrevivência de uma parte significativa dos pacientes. Além disso, tais tratamentos demandam recursos financeiros altos que nem sempre estão disponíveis a todos os pacientes, principalmente em países subdesenvolvidos (INCA, 2020).

A maioria dos pacientes com câncer necessita de tratamento quimioterápico para a contenção da doença. Porém, os fármacos antineoplásicos utilizados na clínica médica, em geral, não possuem a capacidade de combater as células doentes sem afetar os tecidos normais. Isso ocasiona uma série de efeitos colaterais que debilitam enormemente o organismo. Tal debilidade torna-o vulnerável a doenças oportunistas podendo levar o paciente ao óbito. Além disso, muitos tipos de tumor apresentam resistência aos tratamentos disponíveis atualmente, sendo este um dos maiores entraves na terapia antineoplásica (FLOREA, BÜSSELBERG, 2011).

A descoberta da propriedade anticancerígena do metalofármaco cisplatina tem estimulado vários estudos em torno do desenvolvimento de novos compostos de coordenação com potencial antineoplásico. Tais estudos têm utilizado, além da platina, outros metais visando obter novos compostos com um amplo espectro de atuação. O uso de metais essenciais na síntese desses compostos tem como objetivo obter moléculas que causem menor toxicidade aos tecidos não afetados pelo câncer (SANTINI *et al.*, 2014).

Nesse sentido, o grupo de pesquisa em Química Bioinorgânica em parceria com o Laboratório de Biologia do Reconhecer, ambos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, vem produzindo e avaliando a atividade biológica de complexos metálicos com o intuito de desenvolver moléculas com atividade antineoplásica. Esses esforços têm sido frutíferos, uma vez que, vários complexos apresentaram resultados promissores, dentre os quais, alguns já possuem depósitos de patentes.

Seguindo essa linha de pesquisa, três complexos de cobre (II), inéditos na literatura, foram sintetizados e estudados, *in vitro*, quanto ao seu potencial antitumoral. Os resultados obtidos foram promissores (TERRA, 2016). Por esse motivo, fez-se pertinente um aprofundamento dessa investigação por meio de testes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a fim de se determinar o potencial farmacológico de tais complexos e a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* de três complexos de cobre (II) e ampliar a investigação, *in vitro* e *in vivo*, com o complexo que se mostrar mais promissor

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Averiguar a viabilidade celular (IC_{50}) de linhagens de células neoplásicas e de células normais após tratamento com os três complexos.
- Verificar o índice de seletividade dos complexos.
- Selecionar o complexo mais promissor e a linhagem celular mais sensível para a ampliação das investigações sobre o mecanismo de ação.
- Investigar a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo complexo 1.
- Verificar a toxicidade do complexo selecionado, *in vivo*, em camundongos Balb/c *nude*.
- Avaliar o potencial antineoplásico do complexo, *in vivo*, em modelo murino de câncer xenográfico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DILUIÇÕES DOS COMPOSTOS AVALIADOS

Os complexos de cobre (II) $[\text{Cu}_2(\text{Saland}\alpha)\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Cu}_2(\text{Saland}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**3**) (Figura 1, A, B e C) e os ligantes correspondentes: $\text{H}_2\text{Saland}\alpha = N,N'$ -bis(2-hidroxibenzil)- N,N' -bis[3-(1-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina, $\text{H}_2\text{Saland}\beta = N,N'$ -bis(2-hidroxibenzil)- N,N' -bis[3-(2-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina e $\text{BPAH} = 1,4$ -bis(propanamida)homopiperazina, o sal utilizado ($\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e a sonda fluorescente DCFH-DA (Sigma-Aldrich) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) ou água ultra pura na concentração de $2 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A cisplatina e o NAC (N -acetil-L-cisteína) (Sigma-Aldrich) foram solubilizados em água ultra pura nas concentrações de 5×10^{-3} e $2 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Todas as soluções foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

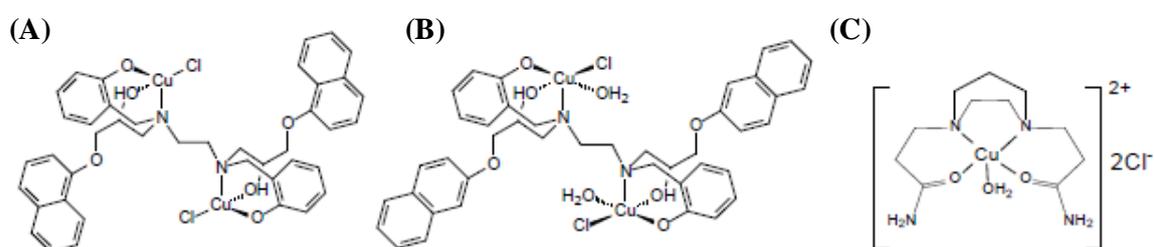


Figura 3. Estrutura química dos complexos de cobre (II). (A) $[\text{Cu}_2(\text{Saland}\alpha)\text{Cl}_2]$, (B) $[\text{Cu}_2(\text{Saland}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e (C) $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

4.2. LINHAGENS CELULARES E CULTIVO

O seguinte painel de linhagens celulares de câncer humano foi utilizado neste estudo: MCF-7 e MDA-MB231 (adenocarcinomas de mama); NCI-H460 e A549 (carcinomas de pulmão) THP-1 (leucemia monocítica aguda), U937 (linfoma histiocítico) e Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda); Colo 205 (adenocarcinoma de cólon humano); SkMel-5 (linhagem celular de melanoma); PC3 (carcinoma de próstata); BxPC-3 (adenocarcinoma pancreático); além de B16F10 (linhagem de melanoma murino). As linhagens MDA-MB231, A549, PC3 e BxPC-3 são

procedentes do Banco de Células do Rio de Janeiro/Brasil (BCRJ). As outras linhagens foram adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC) EUA. As PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) foram isoladas do sangue venoso de voluntários saudáveis. As linhagens celulares de câncer foram mantidas em DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) e as PBMCs em meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco, BRL). Ambos os meios de cultura foram suplementados com soro fetal bovino a 10% (FBS) e gentamicina (Gibco, BRL) (20 mg.mL^{-1}). Todas as culturas celulares foram incubadas em estufa (Forma, Thermo Scientific, Inc, Modelo 3159S/N 33808-427; USA) a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 . Ao atingir 80% de confluência, as células aderentes foram coletadas por dissociação enzimática (tripsina 0,025% e EDTA a 37°C) e semeadas em placas com contagem variável, de acordo com a necessidade de cada experimento. As PBMCs, usadas como controle de células normais, foram processadas por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-paque (GE Healthcare Life Science), conforme descrito na literatura (SCHLENKE, *et al.*, 1998).

4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Os efeitos citotóxicos dos complexos de cobre (II) (1, 2 e 3), dos ligantes e do sal de cobre, na viabilidade celular foram avaliados por meio do ensaio de MTT como descrito (MOSMANN, 1983). A cisplatina foi usada como controle positivo. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços em quantidade de 2×10^4 células/poço em meio de crescimento ($100 \mu\text{L}$). Apenas para o ensaio com as células PBMC foram utilizadas 1×10^5 células/poço. Após 4 a 6 h de incubação, para recuperação e adesão celular, as células foram expostas a diferentes concentrações ($0\text{--}50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dos complexos 1 e 2 e da cisplatina. Para o complexo 3, ligantes e sal de cobre foram utilizadas concentrações ($0\text{--}200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em meio de cultura DMEM-F12, seguido de incubação por 48 h a 37°C . Em seguida, $20 \mu\text{L}$ de solução salina com MTT (5 mg.mL^{-1}) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h a 37°C . Depois disso, os cristais de formazan, produzidos por células viáveis, foram dissolvidos em $100 \mu\text{L}$ de uma solução de isopropanol com 0,04% de HCl concentrado e sua absorbância foi determinada no comprimento de onda de 570 nm, usando um leitor de microplacas (EPOCH™,

BioTax® Instruments, Inc.). Os valores de IC₅₀ (concentração de composto necessária para reduzir a absorvância das células tratadas em 50% em relação às células não tratadas) foram obtidos a partir de curvas de dose-resposta utilizando o *Software* GraphPad Prism versão 5.01. O Índice de Seletividade (IS) dos complexos foi determinado pela razão entre o valor da IC₅₀ do complexo testado em células saudáveis e o valor da IC₅₀ do complexo testado em células de origem neoplásica.

A metodologia de MTT também foi utilizada em ensaios de verificação de interferência da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na viabilidade celular, com a adição de pré-tratamento das células por 2 h com o antioxidante NAC (1,25; 2,5 e 5,0 mmol.L⁻¹) antes da adição do complexo 1.

4.4. AVALIAÇÃO DE APOPTOSE POR ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Os efeitos dos complexos 1, 2 e cisplatina no ciclo celular das células BxPC-3 (linhagem mais sensível entre as aderentes) foram analisados por citometria de fluxo. As células (5×10^5 cels.mL⁻¹) foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas por 6 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados os tratamentos com 1 e 2x a IC₅₀ do complexo 1 (3,5 e 7,0 µmol.L⁻¹), e do complexo 2 (4,5 e 9,0 µmol.L⁻¹) e 2x a IC₅₀ da cisplatina (22 µmol.L⁻¹) em meio de cultura, e a incubação foi mantida por 48 h. Após o tempo de incubação, as células foram colhidas e centrifugadas a 800 g e os *pellets* resultantes foram lavados duas vezes com PBS. Os *pellets* foram fixados em etanol 70% gelado por 1 h. Após o período de fixação, o etanol foi removido por centrifugação e as células, lavadas 2x em PBS, foram ressuspensas em 500 µL de solução corante (50 µg.mL⁻¹ PI, 1 mg.mL⁻¹ RNase A e Triton X-100 a 0,2%) e protegidas da luz por 30 min.

A fluorescência do conteúdo de DNA celular foi quantificada em citômetro de fluxo (FACS Calibur™, BD Sciences) e a sua distribuição nas fases do ciclo celular foi analisada pelo software WinMDI versão 2.9. As proporções de células nas fases G0/G1, S e G2/M foram apresentadas como histogramas. As células apoptóticas, com conteúdo de DNA hipodiplóide fluorescente, foram quantificadas no pico sub-G1 dos histogramas. Os dados experimentais foram determinados pelo registro de 10.000 eventos por amostra. O mesmo procedimento experimental foi realizado para a citometria de verificação de geração de espécies

reativas de oxigênio (ROS). Porém, nesse experimento algumas amostras foram tratadas só com o complexo 1 em concentrações de 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, enquanto outras amostras receberam pré-tratamento, por 2 h, com o antioxidante NAC (5 mmol.L^{-1}) antes da adição do complexo 1 em concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

A variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) foi avaliada por citometria de fluxo usando o corante fluorescente catiônico lipofílico JC-1 (5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodeto). As células BxPC-3 foram semeadas e tratadas com complexo 1 e cisplatina, conforme descrito no item anterior (4.4). Em seguida, as células foram colhidas e centrifugadas (400 g, por 7 min). Então, as células foram ressuspensas em solução corante com JC-1 (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubadas em estufa a 37°C com 5% CO_2 por 15 min. As células foram lavadas duas vezes com meio DMEM-F12 e a fluorescência quantificada imediatamente por citometria de fluxo (FACS Calibur™, BD Sciences). Os dados experimentais foram determinados pelo registro de 10.000 eventos por amostra.

4.6. ENSAIO DE ATIVIDADE DE CASPASES

A atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 foi avaliada usando os substratos: Ac-DEVD-pNA, VEID-pNA, IETD-pNA e LEHD-pNA (Sigma-Aldrich), específicos para as respectivas caspases. As células BxPC-3 ($3-5 \times 10^6 \text{.mL}^{-1}$) foram colhidas após os tratamentos com o complexo 1 (7,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e com a cisplatina (22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 12 e 24 h, lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de lise (1% de Triton x-100, 0,32 M de sacarose, 5 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 2 mM de ditioneitol, 1 mM de PMSF, 1 g.mL^{-1} de aprotinina, 1 mg.mL^{-1} de leupeptina), mantidas no gelo por 30 minutos e depois centrifugadas (10.000 g, 1 min a 4°C). Os extratos protéicos (sobrenadantes) foram coletados e as concentrações de proteínas foram determinadas (1–4 mg.mL^{-1}). Alíquotas (50 μL) dos sobrenadantes foram colocadas em placa de 96 poços contendo tampão de reação (Invitrogen™). Então, foram adicionados 5 μL (4 mM) de cada substrato

nos respectivos poços e a placa foi incubada a 37°C por 1 h. A liberação colorimétrica de *p*-nitroanilina, a partir da clivagem dos substratos, foi medida em espectrofotômetro (EPOCH™, BioTek® Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 405 nm. As absorbâncias das amostras tratadas foram comparadas com uma amostra controle não tratada para a determinação do aumento da atividade enzimática das caspases.

4.7. AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E SUA INIBIÇÃO POR NAC

4.7.1. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO CONSTITUTIVA DE ROS POR CÉLULAS BxPC-3

Para determinar o nível constitutivo de ROS presente em células BxPC-3 foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas sem e com concentrações crescentes do inibidor de ROS (NAC) (1.25, 2.5 e 5.0 mmol.L⁻¹) por 3 e 48 h. Decorrido o tempo de incubação, as células foram marcadas com a sonda fluorescente DCFH-DA (10 µmol.L⁻¹) (Sigma-Aldrich). Subsequentemente, as células foram removidas, lavadas em PBS, ressuspensas em 500 µL de PBS e realizada a quantificação da fluorescência, referente à presença de ROS, em citômetro de fluxo.

4.7.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS EM CÉLULAS BxPC-3 TRATADAS COM COMPLEXO 1

Para avaliar se o tratamento com complexo 1 interfere na produção de ROS em células BxPC-3, foi realizada uma citometria de fluxo. Para tal, células foram tratadas com complexo 1 (3,5 e 7,0 µmol.L⁻¹) e cisplatina (22 µmol.L⁻¹), sem e com pré-tratamento com NAC (5,0 mmol.L⁻¹), por 48 h. Os passos seguintes foram idênticos aos procedimentos descritos anteriormente no item 4.7.1.

4.8. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Uma investigação de alterações morfológicas e ultraestruturais por microscopia eletrônica foi realizada em células BxPC-3. Resumidamente, as células ($3-5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$), não tratadas e tratadas com, foram lavadas com PBS, fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 2 h, pós-fixadas por 20 min em solução 1: 1 de tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio (0,8%), desidratadas em séries crescentes de acetona e embebidas em resina epóxi (Poly/Bed 812®). Os blocos obtidos foram seccionados utilizando um ultramicrotomo *Reichert Ultracut S*, e as seções ultrafinas (70 nm de espessura) foram coletadas em grades de cobre (malha 400), coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL-1400 Plus (Japão) a 120 kV.

Para observação sob Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), as células pós-fixadas foram colocadas em lamínulas pré-revestidas com poli-L-lisina (Sigma®), pós-fixadas em solução 1: 1 de tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio (0,8%) por 30 min, desidratadas e secas ao ar. Sequencialmente, as amostras foram montadas com fita adesiva metálica sobre *stubs*, pulverizadas com 40-60 nm de ouro/paládio (Sputter Coater SDC 050) e examinadas em Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS EVO 40 XVP (Alemanha) a 15 kV.

4.9. EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

4.9.1. ANIMAIS

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, R/J, Brasil) sob o protocolo número 349. Camundongos Balb/c *nude* machos e fêmeas (6 a 8 semanas de idade) fornecidos pelo biotério central da UENF, foram alojados em gaiolas ventiladas com temperatura e umidade constantes, sob um ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, com livre acesso a ração e água.

4.9.2. DESENVOLVIMENTO DE LESÕES TUMORAIS EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE

A metodologia adotada para a indução de modelo tumoral heterotópico xenográfico com células de carcinoma pancreático (BxPC-3) utilizou camundongos Balb/c *nude*. Foram testadas 3 concentrações (5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6) de células em 3 grupos de 2 animais com idades entre 6-8 semanas. Para indução do tumor, todos os camundongos foram sedados por via intraperitoneal com xilazina (10 mg.kg^{-1}) e quetamina (85 mg.kg^{-1}). Cada grupo recebeu injeções intradérmicas dorsais de células veiculadas em 50 μL de PBS. Após 30 dias de inóculo, os volumes tumorais (mm^3) foram determinados por meio da mensuração das lesões com paquímetro e calculados usando-se a fórmula: $V_{\text{mm}^3} = (C \times L^2)/2$, onde C é o comprimento e L é a largura da lesão tumoral (TSIRMOULA, *et al.*, 2012).

4.9.3. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO 1

Para esse experimento, grupos de animais ($n = 6$, 3 machos e 3 fêmeas) foram injetados por via intraperitoneal com diferentes concentrações do complexo 1, variando de 10 a 100 mg.kg^{-1} de peso corporal veiculadas em (água ultrapura + DMSO). A sobrevivência dos animais foi monitorada por 15 dias. Após esse período, os dados obtidos foram utilizados para calcular a dose letal mediana (DL_{50}), utilizando-se o *software* GraphPad Prism V.5.01, com aplicação do teste de regressão não-linear. As curvas de sobrevivência foram construídas usando o método Kaplan Meier.

4.9.4. AVALIAÇÃO DO COMPLEXO 1 PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER PANCREÁTICO EM MODELO MURINO

A atividade antineoplásica do complexo 1 foi investigada *in vivo*, após a determinação da dose letal média (DL_{50}) do complexo 1 para camundongos Balb/c *nude*. Para indução do tumor, todos os camundongos foram sedados por via intraperitoneal com xilazina (10 mg.kg^{-1}) e quetamina (85 mg.kg^{-1}). Em seguida, a linhagem celular BxPC-3 de câncer de pâncreas humano (1×10^6

células em 50 μL de PBS) foi inoculada pela via intradérmica na região dorsal dos camundongos. Quando os nódulos tumorais se tornaram visíveis, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 6$, 3 machos e 3 fêmeas) e tratados, intraperitonealmente, com injeções do complexo 1 (8,0 e 33,0 mg.kg^{-1}) e da cisplatina (3,3 mg.kg^{-1}) (ASTON, *et al.*, 2017) e o grupo controle foi injetado com o veículo usado para diluir os complexos (água ultrapura + DMSO (v/v = 8%)). O tratamento foi administrado em 4 doses com intervalos de uma semana. Os volumes tumorais (mm^3) foram obtidos por meio da mensuração das lesões com paquímetro e calculados usando-se a fórmula: $V_{\text{mm}^3} = \text{comprimento} \times (\text{largura})^2/2$. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por inalação de CO_2 .

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm DP para estudos *in vitro* e *in vivo*. Para análises estatísticas, foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Todos os dados foram analisados utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.01*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

5. RESULTADOS

5.1. CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR COMPLEXOS DE COBRE (II)

A propriedade citotóxica dos complexos de cobre (II) $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**3**) foi determinada por meio de ensaio colorimétrico com MTT. Nestes ensaios foram avaliadas as seguintes linhagens celulares de câncer humano: BxPC-3, SkMel-5, COLO 205, U937, MCF-7, MDA-MB231, NCI-H460, A549, MOLT -4, THP-1 e PC3, bem como, a linhagem celular de melanoma murino B16F10. Os valores de concentração inibitória (IC_{50}) gerados (Tabela 1) mostram que o complexo 1 apresenta a maior atividade citotóxica entre os três complexos. Como controle celular normal, os três complexos foram avaliados contra células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Todos os complexos mostraram maior citotoxicidade contra as linhagens neoplásicas do que sobre as células saudáveis, como pode ser visto na Tabela 2. Essa seletividade é uma característica essencial a moléculas candidatas a agentes quimioterápicos. Além disso, a cisplatina, fármaco utilizado como controle positivo, mostrou valores de IC_{50} maiores que os dos complexos na maioria dos testes. Segundo TERRA (2016) o sal de cobre e os ligantes usados na síntese dos complexos apresentaram valores de IC_{50} superiores a $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ quando testados em algumas das linhagens neoplásicas (dados não mostrados).

Tabela 1. Concentração inibitória (IC_{50}) dos complexos 1, 2, 3 e da cisplatina contra linhagens celulares neoplásicas em 48 h de tratamento.

Linhagem	IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)			
	Complexo (1)	Complexo (2)	Complexo (3)	Cisplatina
A549	5,8 \pm 0,3	–	113,5 \pm 1,1	52,6 \pm 1,1
BxPC-3	3,5 \pm 0,3	4,3 \pm 0,4	97,3 \pm 1,1	11,0 \pm 1,0
B16F10	4,1 \pm 0,2	–	71 \pm 1,2	37,7 \pm 1,0
COLO 205	4,1 \pm 0,4	5,7 \pm 0,3	63,0 \pm 1,1	72,4 \pm 1,1
NCI-H460	3,7 \pm 0,2	–	60,8 \pm 1,1	24,5 \pm 1,1
MCF-7	5,1 \pm 0,2	–	139,1 \pm 1,2	16,0 \pm 1,1
MDA-MB231	3,8 \pm 0,1	–	109,5 \pm 1,1	53,3 \pm 1,0
MOLT-4	1,3 \pm 0,2	–	48,4 \pm 1,1	4,6 \pm 0,6
PC3	4,5 \pm 0,8	–	130,0 \pm 1,1	42,8 \pm 1,1
SkMel-5	4,5 \pm 0,4	8,5 \pm 0,5	83,1 \pm 1,1	73,1 \pm 1,2
THP-1	1,4 \pm 0,3	–	–	11,8 \pm 1,1
U-937	1,9 \pm 0,2	3,2 \pm 0,4	39,6 \pm 1,1	5,3 \pm 1,1

(–) Não determinada.

Tabela 2. Comparação entre as concentrações inibitórias (IC_{50}) dos complexos 1, 2 e 3 frente a quatro linhagens celulares neoplásicas e PBMCs.

Linhagem	IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
	BxPC-3	SkMel-5	COLO 205	U937	PBMC
Complexo (1)	3,5 \pm 0,3	4,5 \pm 0,4	4,1 \pm 0,4	1,9 \pm 0,2	11,0 \pm 2,0
Complexo (2)	4,3 \pm 0,4	8,5 \pm 0,5	5,7 \pm 0,3	3,2 \pm 0,4	16,0 \pm 2,0
Complexo (3)	97,3 \pm 1,1	83,1 \pm 1,1	63,0 \pm 1,1	39,6 \pm 1,1	> 200

O potencial seletivo, ou seja, a capacidade de afetar duas vezes mais a viabilidade de células neoplásicas do que as células saudáveis, de uma substância pode ser mensurado calculando-se o Índice de Seletividade (IS). Este índice corresponde à razão entre o valor da IC_{50} do complexo testado em células saudáveis e o valor da IC_{50} do complexo testado em células de origem neoplásica. A amostra que apresenta $IS \geq 2,0$ é considerada seletiva (SUFFNESS, PEZZUTO, 1990). Conforme pode ser visto na tabela 3, os três complexos apresentaram IS para a maioria das linhagens neoplásicas testadas.

Tabela 3. Índice de Seletividade (IS) dos complexos 1, 2 e 3 frente as linhagens celulares neoplásicas.

Índice de Seletividade (IS)			
Linhagem	Complexo (1)	Complexo (2)	Complexo (3)
A549	1,9	–	1,8
BxPC-3	3,1	3,7	2,0
B16F10	2,7	–	2,8
COLO 205	2,7	2,8	3,2
NCI-H460	3,0	–	3,3
MCF-7	2,2	–	1,4
MDA-MB231	2,9	–	1,8
MOLT-4	8,5	–	4,1
PC3	2,4	–	1,5
SkMel-5	2,4	1,9	2,4
THP-1	7,9	–	–
U-937	5,8	5,0	5,0

(–) Não determinado.

5.2. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR (SUB-G1)

Para elucidar o mecanismo pelo qual os complexos afetam a viabilidade celular, a apoptose foi avaliada medindo-se a quantidade de fluorescência emitida pelas células com baixo conteúdo de DNA marcado com iodeto de propídeo. Essas células são detectadas na região Sub-G1 em análise do ciclo celular por citometria de fluxo (NUNEZ, 2001). A linhagem BxPC-3 foi tratada com os complexos 1 e 2 e cisplatina. Como mostrado na Figura 4, células BxPC-3 apoptóticas foram detectadas após tratamento por 48 h com o complexo 1 e com a cisplatina. A amostra com células não tratadas (Figura 4 A) mostrou apenas 3,4% de células na região Sub-G1. Nas Figuras relacionadas aos tratamentos com cisplatina (B) e complexo 1 (C e D), observou-se um deslocamento acentuado das populações celulares para as regiões denominadas de Sub-G1. O tratamento com 22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cisplatina deslocou 62,6% das células para essa região, enquanto os tratamentos com o complexo 1 (3,5 e 7,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

promoveram deslocamentos de 39,3% e 48,0%, respectivamente, das células para a região Sub-G1.

As células BxPC-3 tratadas com complexo 2 e cisplatina por 48 h também apresentaram morte celular apoptótica no ensaio de avaliação do ciclo celular. A Figura 5 A, referente à amostra com células não tratadas, mostrou apenas 3,4% de células na região Sub-G1. No tratamento com 22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cisplatina (Figura 5 B) pode ser observado que 62,6% das células encontram-se na região Sub-G1. Enquanto, as Figuras 5 C e D representam deslocamentos de 45,9% e 60,0% das células para a região Sub-G1, após tratamento com o complexo 2 nas concentrações de 4,5 e 9,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Embora os dois complexos tenham apresentado resultados positivos para indução de apoptose frente à linhagem neoplásica testada, a partir dessa fase do trabalho decidiu-se continuar as experimentações só com o complexo 1 e a linhagem BxPC-3, a fim de desenvolver um protocolo abrangente, econômico e compatível com o tempo disponível para sua execução.

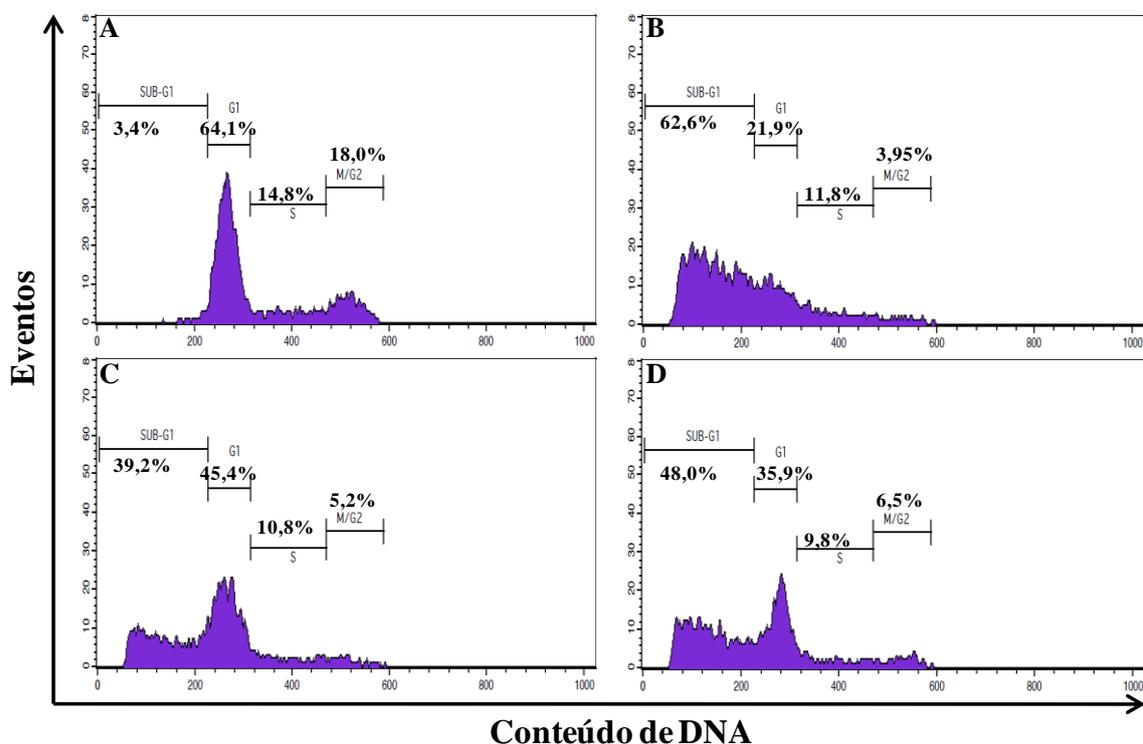


Figura 4. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células BxPC-3 incubadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cisplatina (22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); (C) células tratadas com complexo 1 (3,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e (D) células tratadas com complexo 1 (7,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

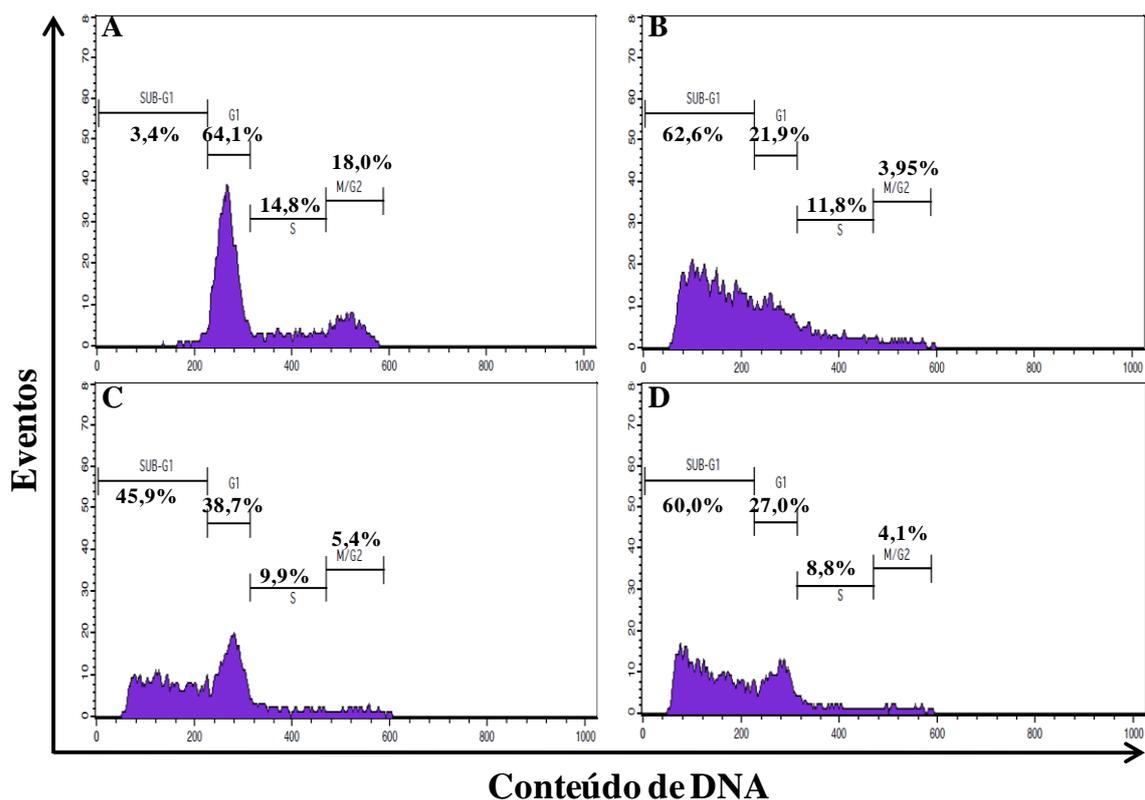


Figura 5. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células BxPC-3 incubadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cisplatina (22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); (C) células tratadas com complexo 2 (4,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e (D) células tratadas com complexo 2 (9,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

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

A análise da função mitocondrial é um parâmetro usado como um indicador de morte celular, uma vez que alterações na transição da permeabilidade mitocondrial é um passo importante na indução de apoptose (ROY, *et al.*, 2014; ZOROVA, *et al.*, 2018). Assim, a verificação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) pode indicar se há ativação da via intrínseca da apoptose após um determinado estímulo. A perda da função mitocondrial foi avaliada usando a sonda fluorescente catiônica lipofílica JC-1. As células BxPC-3 foram tratadas com o complexo 1 (3,5 e 7,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e 22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cisplatina por 48 h e analisadas por citometria de fluxo. A análise dos dados (Figura 6) mostra que a população de células não tratadas está predominantemente concentrada (97,4%) no quadrante superior direito, correspondente à região onde são encontradas células com mitocôndrias viáveis (Figura 6 A). As células tratadas com ambas as concentrações do complexo 1 (Figuras 6 C e D) apresentaram

uma mudança nas populações de células do quadrante superior direito para o quadrante inferior direito (36,4% e 94,7%, respectivamente) de maneira dependente de concentração. As células tratadas com cisplatina (Figura 6 B) também foram concentradas no quadrante inferior direito (57,5%). Esses dados sugerem que houve despolarização da membrana mitocondrial e fornecem evidências de que o complexo 1 atua induzindo apoptose nas células de câncer pancreático BxPC-3. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos no estudo do ciclo celular.

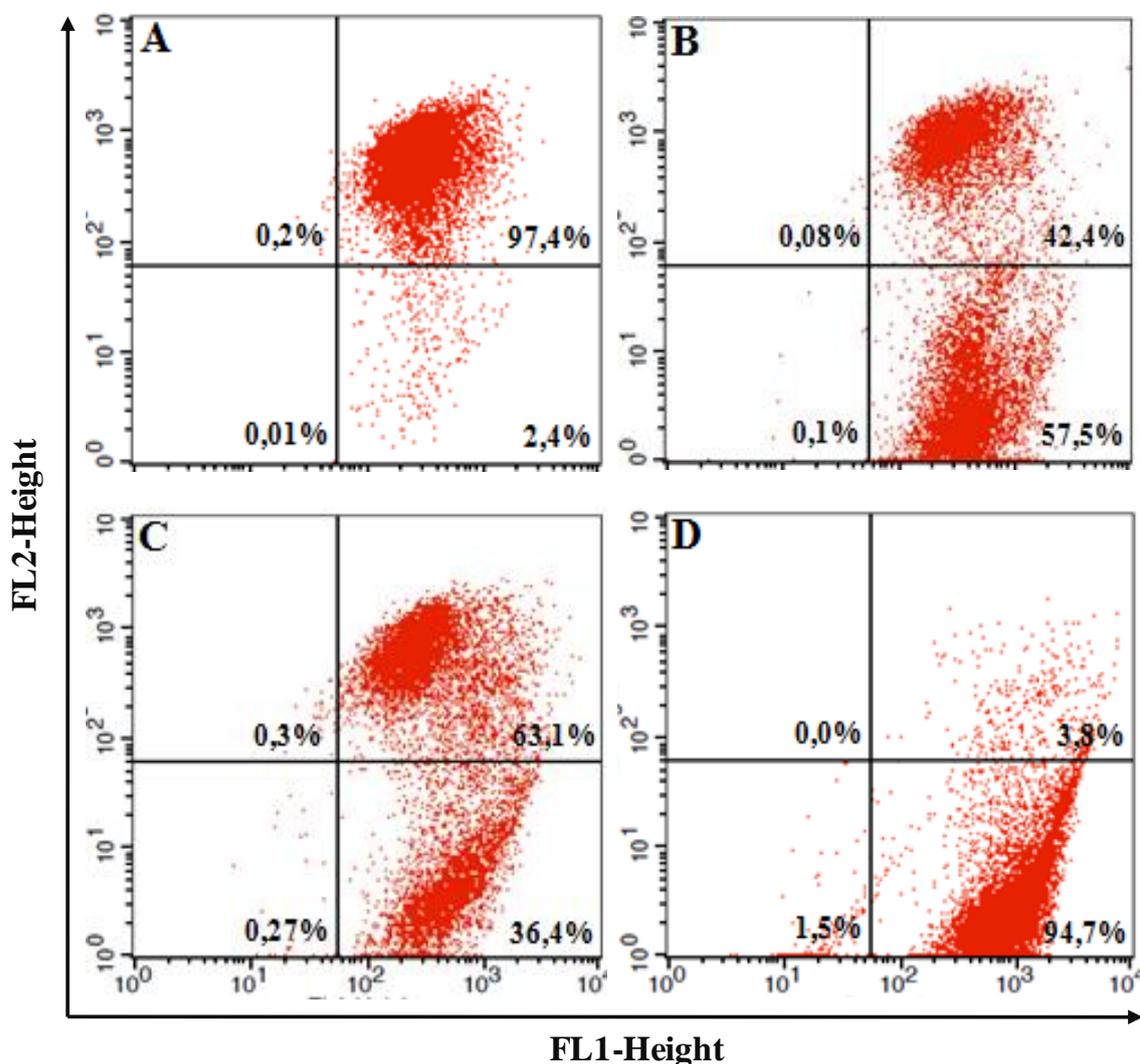


Figura 6. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. Células BxPC-3 incubadas por 48 h e coradas com JC-1. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cisplatina ($22 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (C) células tratadas com complexo 1 ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (D) e células tratadas com complexo 1 ($7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CASPASES

O padrão de ativação das caspases iniciadoras e efetoras foi avaliado na tentativa de consolidar o conhecimento da via apoptótica desencadeada nas células BxPC-3. Neste teste foram utilizados substratos para caspases efetoras (3 e 6), comuns a ambas as vias apoptóticas; para caspase 8, via de receptores de morte (extrínseca); e caspase 9, via mitocondrial (intrínseca). Os resultados obtidos indicam a ativação de todas as caspases avaliadas, após 12 e 24 h de incubação com o complexo 1, quando comparadas à amostra não tratada. A cisplatina, usada como controle positivo, também foi capaz de ativar todas as caspases testadas. Como pode ser observado nas Figuras 7 A e B as caspases 8 e 9 foram ativadas, o que sugere que as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca são estimuladas pelo complexo 1. Portanto, a ocorrência de morte celular por apoptose é fortemente evidenciada nessa investigação.

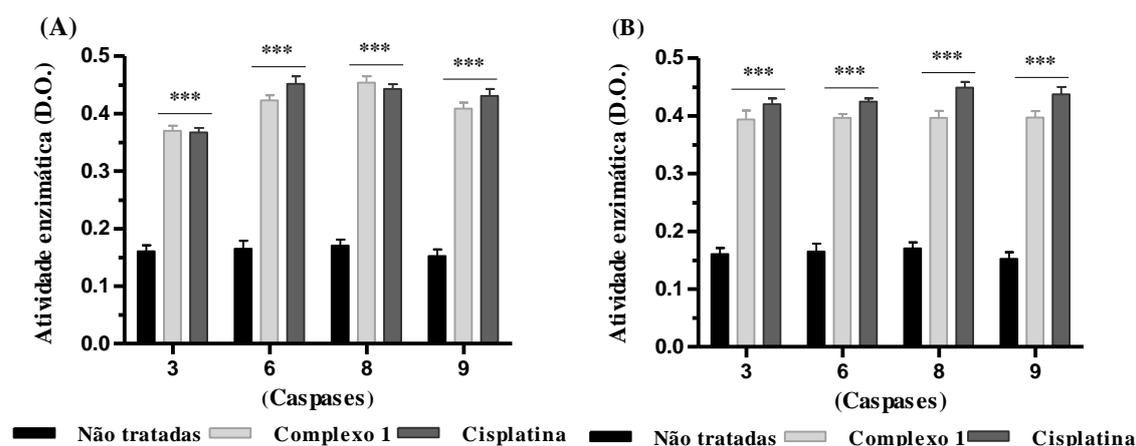


Figura 7. Avaliação da ativação de caspases. Células BxPC-3 não tratadas, tratadas com o complexo 1 ($7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e cisplatina ($22 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (A) e (B) incubação por 12 e 24 h, respectivamente. As barras representam médias \pm DP de dois experimentos independentes realizados em duplicata. ***, $P < 0,001$ versus células não tratadas.

5.5. AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELO COMPLEXO 1

5.5.1. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS POR CÉLULAS BxPC-3

Uma vez demonstrado que o complexo 1 induz perda do potencial de membrana mitocondrial, fez-se pertinente ampliar o conhecimento sobre a sua ação no que se refere à geração de ROS, e se essa propriedade seria responsável pela atividade antineoplásica apresentada. Para determinar o nível constitutivo de ROS presente em células BxPC-3 foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas sem e com concentrações crescentes do antioxidante NAC por 3 h. Decorrido o tempo de incubação, as células foram marcadas com a sonda fluorescente DCFH-DA. A Figura 8 apresenta o percentual de células com fluorescência referente à quantificação de ROS. A Figura 8 A, que representa as células sem tratamento, mostra que 76,7% das células BxPC-3 apresentam produção constitutiva de ROS. Quando as células foram incubadas com 1.25, 2.5 e 5.0 mM.L⁻¹ de NAC observa-se a produção de ROS em 83,3% (Figura 8 B); 85,8% (Figura 8 C) e 86,7% (Figura 8 D) das células, respectivamente. Esse resultado diferiu da literatura (ZAFARULLAH, *et al.*, 2003) que classifica o NAC como uma fonte de grupos sulfidríla que atuam eliminando radicais livres nas células, uma vez que interagem com ROS.

Para confirmar ou refutar o resultado do experimento anterior, foi realizado outro experimento nas mesmas condições, mas com tempo de incubação aumentado para 48 h. Surpreendentemente, os dados obtidos (Figura 9) seguiram a mesma tendência, mas com uma diminuição nos percentuais de células apresentando produção de ROS, quando comparado aos valores do primeiro experimento. Nesse tempo de incubação, o perfil de produção constitutiva de ROS foi encontrado em 72,1% das células sem tratamento (Figura 9 A). Nas células incubadas com 1.25, 2.5 e 5.0 mmol.L⁻¹ de NAC, observa-se a produção de ROS em 66,5% (Figura 9 B); 70,0% (Figura 9 C) e 74,8% (Figura 9 D) das células, respectivamente. Esses dados confirmam um perfil de produção elevado de ROS em altos percentuais de células BxPC-3, mesmo quando incubadas por 48 h com as concentrações testadas de NAC.

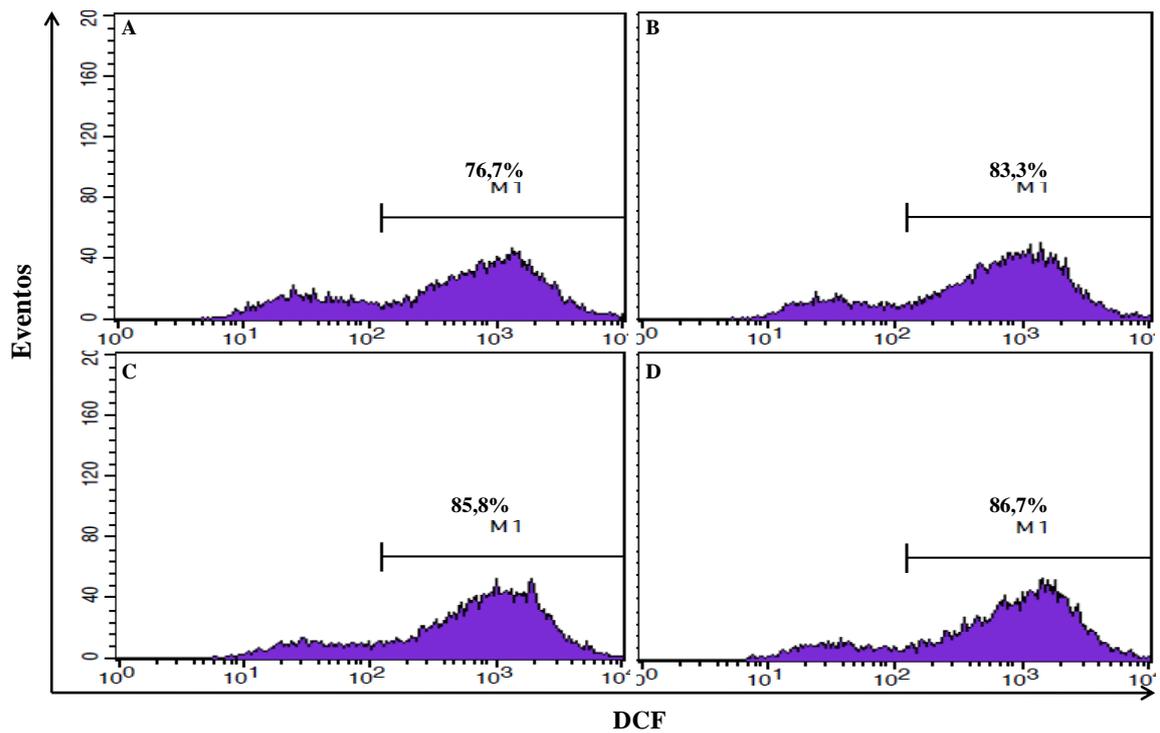


Figura 8. Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. Linhagem de câncer pancreático (BxPC-3) incubada por 3 h e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com 1,25; (C) 2,5 e (D) 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC.

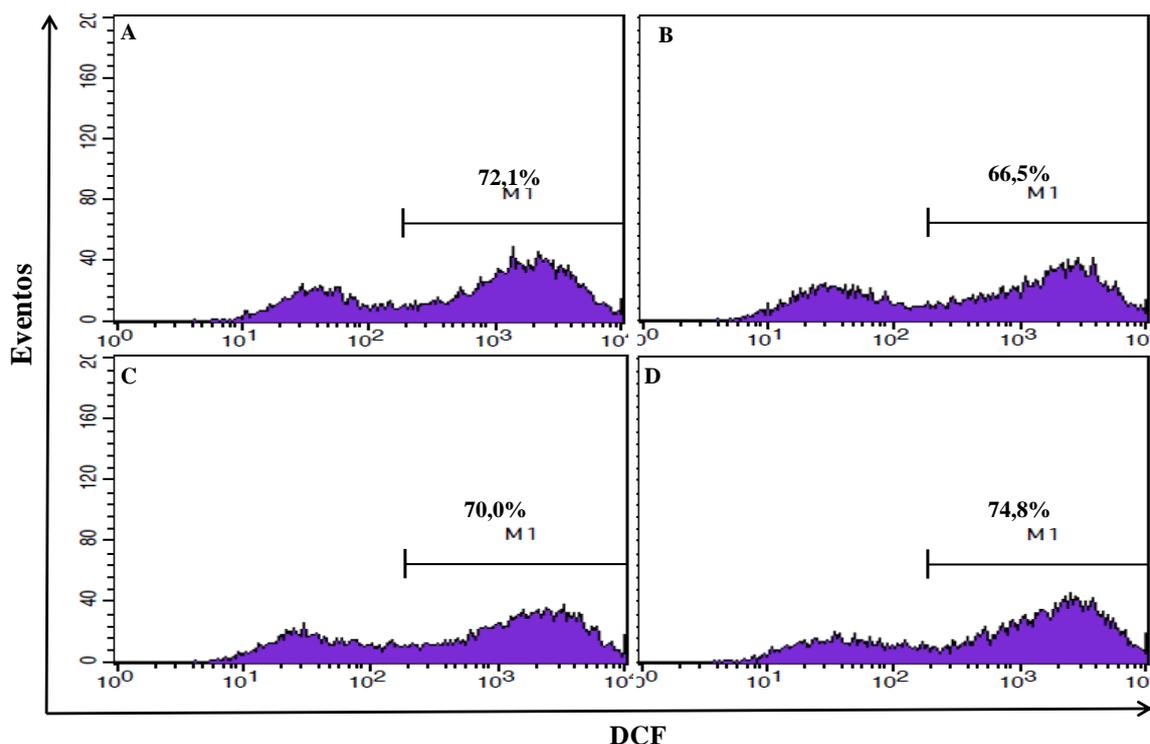


Figura 9. Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. Linhagem de câncer pancreático (BxPC-3) incubada por 48 h e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com 1,25; (C) 2,5 e (D) 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC.

5.5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS EM CÉLULAS BXPC-3 TRATADAS COM COMPLEXO 1

Com a finalidade de verificar se o tratamento com complexo 1 interfere na produção de ROS, células BxPC-3 foram tratadas por 48 h com complexo 1 e cisplatina, sem e com pré-tratamento com NAC. Em seguida, as células foram marcadas com a sonda DCFH-DA e a emissão de fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados dessa avaliação apresentam (Figura 10) as porcentagens de células com intensidade de fluorescência referente à marcação para presença de ROS. A Figura 10 A mostra que 87,2% das células não tratadas apresentam produção de ROS. As Figuras 10 B e C mostram células tratadas com 3,5 μmol.L⁻¹ do complexo 1, sem e com pré-tratamento com NAC (5,0 mmol.L⁻¹), respectivamente.

Os resultados mostram uma redução nas porcentagens de células nas regiões onde se concentram maior intensidade de fluorescência, 26,2% em (B) e 28,2% em (C), quando comparado com a amostra não tratada (A). Contudo, a

diferença entre as amostras com e sem o pré-tratamento com NAC foi de apenas 2,0% das células com marcação para presença de ROS. Nas Figuras 10, D e E, as células foram tratadas com $7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo 1, sem e com pré-tratamento com NAC ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$), respectivamente. Observa-se um deslocamento drástico de ambas as populações celulares, 75,2% em (D) e 72,2% em (E), em direção aos picos onde a intensidade de fluorescência é menor, indicando uma diminuição na quantidade de ROS promovida por ambos os tratamentos, com apenas 3,0% de diferença entre eles. Quando as células foram tratadas com $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cisplatina, sem e com pré-tratamento com NAC ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$), as figuras geradas apresentaram um perfil semelhante de marcação para ROS, tanto na comparação entre os tratamentos em (F) e (G), quanto em relação a amostra não tratada em (A).

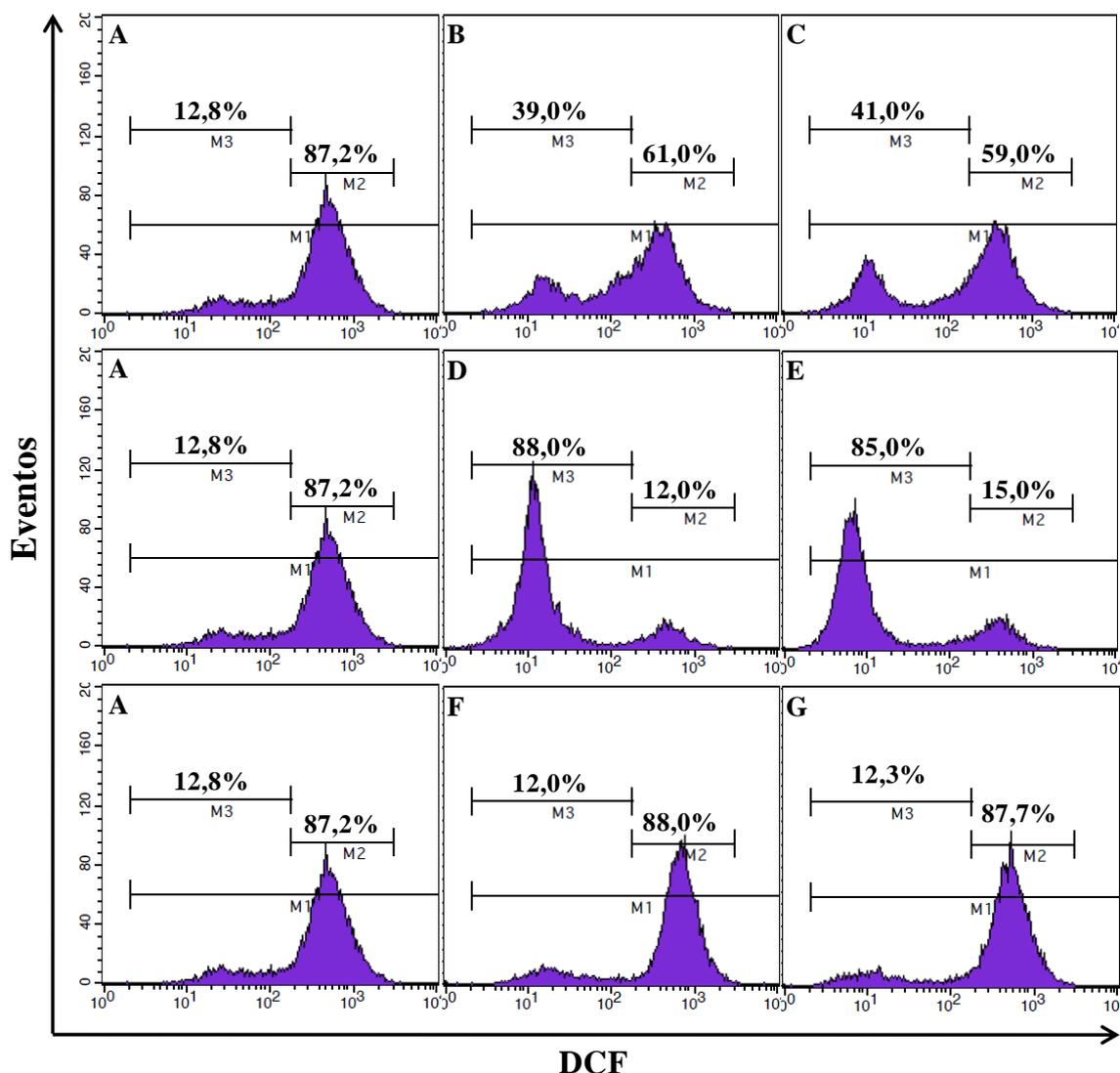


Figura 10. Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. Linhagem de câncer pancreático (BxPC-3) incubada por 48 h e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B e C) tratamentos com $3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1; (D e E) tratamentos com $7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1; (F e G) tratamentos com $22,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cisplatina; (C, E e G) amostras pré-tratadas por 2 h com $5,0 \text{mmol.L}^{-1}$ de NAC antes da adição dos complexos.

5.5.3. A CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO 1 É POTENCIALIZADA POR PRÉ-TRATAMENTO COM NAC

Para avaliar se o pré-tratamento das células BxPC-3 com NAC interfere na propriedade citotóxica apresentada pelo complexo 1, foram realizados ensaios metabólicos utilizando MTT. Nestes ensaios o complexo 1 foi avaliado isoladamente e em conjunto com pré-tratamentos com 1,25; 2,5 e $5,0 \text{mmol.L}^{-1}$ de NAC. Os valores de IC_{50} gerados (Tabela 4) mostram que a atividade citotóxica

do complexo 1 foi potencializada pelo pré-tratamento com NAC. A Figura 11 mostra os gráficos representativos dos testes de MTT realizados para determinar a combinação ideal entre as concentrações do complexo 1 e do NAC testadas. Constatou-se que a combinação entre 1 μmol do complexo 1 e 5 mmol do NAC reduziu drasticamente a viabilidade celular em relação ao tratamento só com a mesma concentração do complexo 1. Esse resultado sugere que o pré-tratamento das células com NAC, nessas condições, potencializa o efeito citotóxico do complexo 1.

Tabela 4. Concentração inibitória (IC_{50}) do tratamento só com complexo 1 e do tratamento conjunto de NAC com o complexo 1 contra a linhagem BxPC-3 em 48 h de incubação.

IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)			
Complexo 1 (C1)	C1 + 1,3 mmol.L^{-1} NAC	C1 + 2,5 mmol.L^{-1} NAC	C1 + 5,0 mmol.L^{-1} NAC
2,9 \pm 0,3	0,73 \pm 0,6	0,64 \pm 0,5	0,6 \pm 0,3

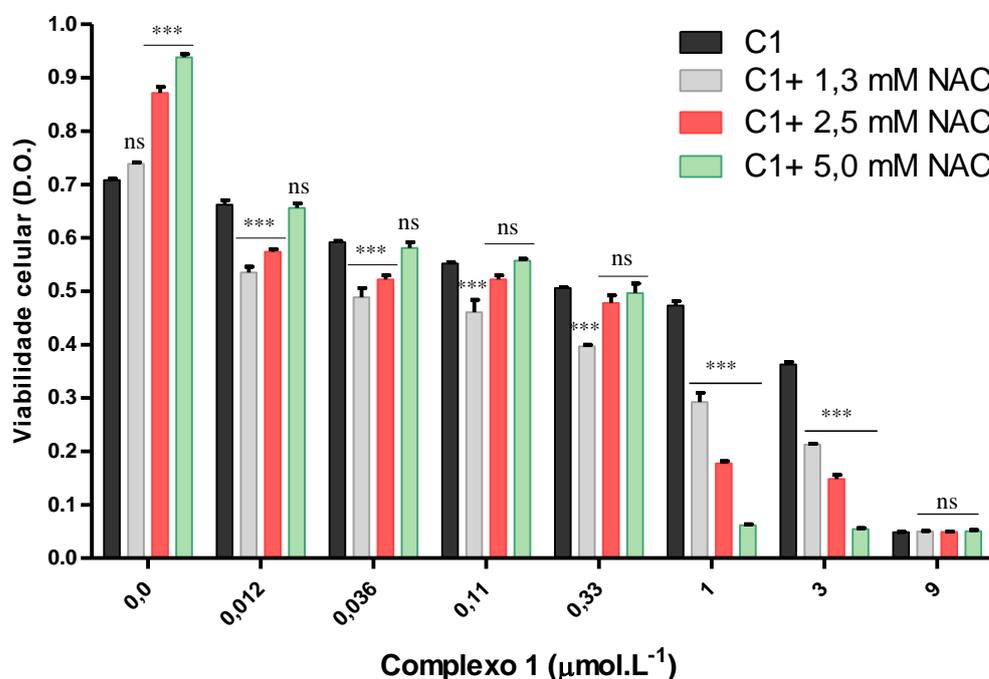


Figura 11. Viabilidade das células BxPC-3 após exposição ao complexo 1 isoladamente e em associação aos tratamentos de 1.3, 2.5 e 5.0 mmol.L^{-1} de NAC, por 48 horas. As curvas de dose-resposta foram obtidas no ensaio com MTT. Cada ponto de dados representa a média \pm DP. (n = 3). ns, não significativo; ***, P < 0. 001.

5.5.4. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR PROMOVIDAS PELA ASSOCIAÇÃO ENTRE O COMPLEXO 1 E O NAC

Para elucidar o mecanismo pelo qual o complexo 1, isoladamente e com pré-tratamento com NAC, afeta a viabilidade celular, avaliou-se a indução de apoptose por citometria de fluxo. A linhagem BxPC-3 foi tratada com o complexo 1, sem e com pré-tratamento com NAC e submetida a análise do ciclo celular (Sub-G1). Como mostrado na Figura 12, células BxPC-3 apoptóticas foram detectadas após tratamento por 48 h com o complexo 1 sem e com NAC. A amostra com células não tratadas (Figura 12 A) e tratadas só com NAC (Figura 12 B) apresentam apenas 2,0% e 1,5%, respectivamente, das células na região Sub-G1. A Figura 12 C representa o tratamento com $1,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1 com 2,4% das células em Sub-G1, enquanto na Figura 12 D, 23,8% das células, pré-tratadas com $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NAC e, posteriormente, tratadas com $0,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1, encontram-se na região Sub-G1. Nas Figuras subsequentes, 5,1% e 41,9% das células foram detectadas na região Sub-G1. Esses valores são relacionados aos tratamentos com $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo 1 (Figura 12 E), e ao pré-tratamento com $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NAC acrescido de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1 (Figura 12 F), respectivamente. Finalmente, nas Figuras 12 G e H podem ser observados deslocamentos de 26,4% e 48,1% das populações celulares para as regiões sub-G1, devido aos tratamentos com $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1 e ao pré-tratamento com $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NAC acrescido de $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1, respectivamente. Esses resultados apontam para um efeito sinérgico entre o complexo 1 e o antioxidante NAC, porém se faz necessária uma investigação mais ampla para se fazer tal inferência.

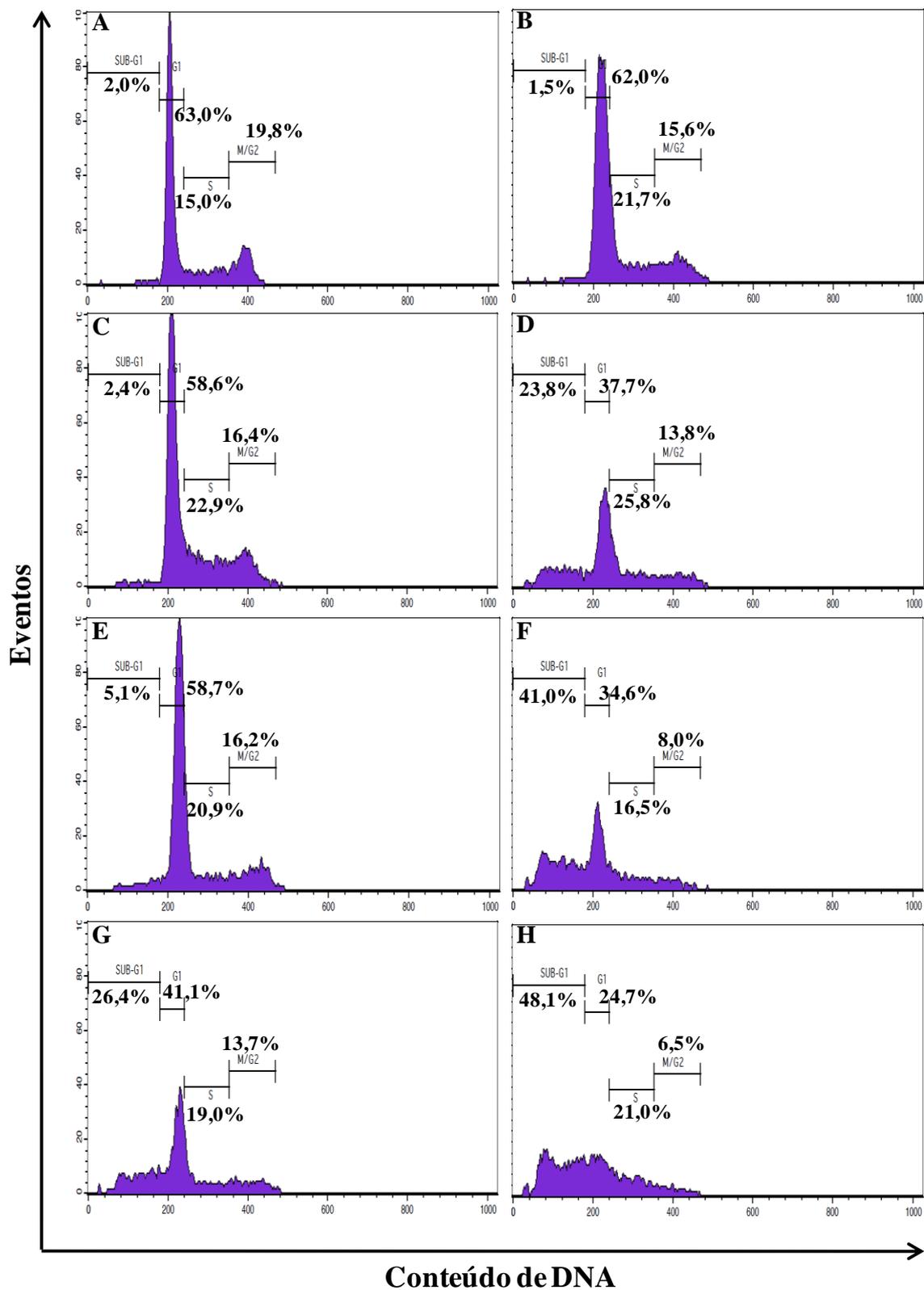


Figura 12. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células BxPC-3 incubadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) tratamento com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC; (C) tratamento com 1,25 μmol.L⁻¹ de complexo 1; (D) tratamentos com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC e 0,25 μmol.L⁻¹ de complexo 1; (E) tratamento com 2,5 μmol.L⁻¹ de complexo 1; (F) tratamentos com 5,0 mmol.L⁻¹ de NAC e 0,5 μmol.L⁻¹ de complexo 1;

(G) tratamento com $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1; (H) tratamentos com $5,0 \text{mmol.L}^{-1}$ de NAC e $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo 1.

5.6. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS PELO COMPLEXO 1 NAS CÉLULAS BxPC-3

O efeito dos tratamentos com complexo 1 e cisplatina nas células BxPC-3 por 12 e 24 h foi investigado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Figuras 13 e 14, respectivamente). A análise das imagens dessas microscopias revelaram características de morte celular por apoptose nas células tratadas com o complexo 1 e cisplatina. A análise por MEV mostrou células não tratadas (Figuras 13 A e B) bem aderidas umas às outras, com elementos visíveis de comunicação intercelular (cabeça de seta) e presença de estruturas de adesão, filopódios e lamelipódios (seta), na superfície da célula. Após o tratamento com o complexo 1 e a cisplatina (D, F) e (E, G), respectivamente, foram observadas alterações na morfologia da superfície (asterisco), isto parece ser devido a uma reorganização do citoesqueleto, com encolhimento celular e formação de "*blebbing*" de membrana (estrela) indicativas de apoptose.

As análises ultraestruturais por MET mostram fotomicrografias de células não tratadas (Figuras 14 A e B). Essas células têm características normais, como cromatina homogênea, mitocôndrias e retículo endoplasmático bem distribuído e estruturas de adesão na superfície celular. Na Figura 14 A é observada a presença de vesículas (estrela), enquanto na Figura 14 B a comunicação intercelular pode ser observada através do tráfego vesicular (asterisco). No entanto, a imagem representativa das células após 12 h de tratamento com o complexo 1 (Figura 14 C) mostra que o citoplasma é mais vesiculoso (estrela) e com uma diminuição nas estruturas de adesão. O tratamento das células por 12 h com a cisplatina (Figura 14 D) mostra que ainda há forte adesão célula-célula e troca de informações vesiculares por meio de junções comunicantes, como em células não tratadas (asterisco). Após 24 h de tratamento com o complexo 1 (Figura 14 E) é possível observar o início da condensação da cromatina na periferia nuclear, mitocôndrias com perfis morfológicos alterados (cabeça de seta), perda de contato intercelular e desorganização do citoplasma (estrela).

Enquanto, ao mesmo tempo de tratamento com cisplatina (Figura 14 F), não houve alterações significativas na perda de adesão, mantendo o contato célula-célula (asterisco). Além disso, as mitocôndrias permaneceram com padrões morfológicos normais (cabeça de seta). Com base nessas observações, pode-se sugerir que o complexo 1 atua mais rapidamente do que a cisplatina na promoção da apoptose nas células BxPC-3. A indução desse tipo de morte celular é corroborada pela observação anterior de ativação das caspases (Figura 7) pelo complexo 1 e pela cisplatina.

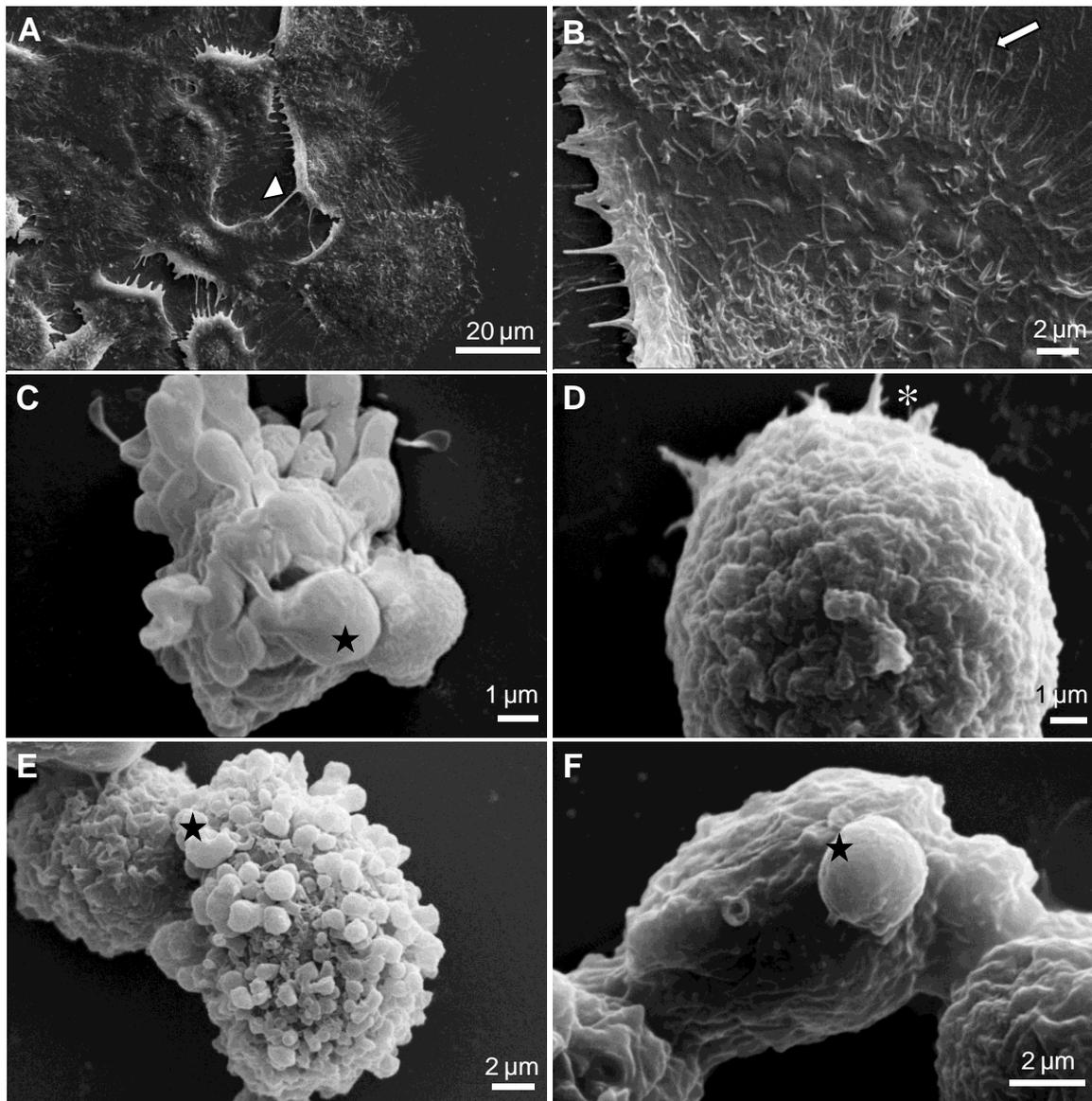


Figura 13. Fotomicrografias representativas de MEV da linhagem celular BxPC-3. (A e B) células não tratadas. (C e E) células tratadas com o complexo 1 ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$); e (D e F) células tratadas com cisplatina ($11,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$), por 12 e 24 h, respectivamente. Símbolos: ponta de seta, comunicação intercelular; seta, filopódios; asterisco, lamelipódios; estrela, formação de corpos apoptóticos.

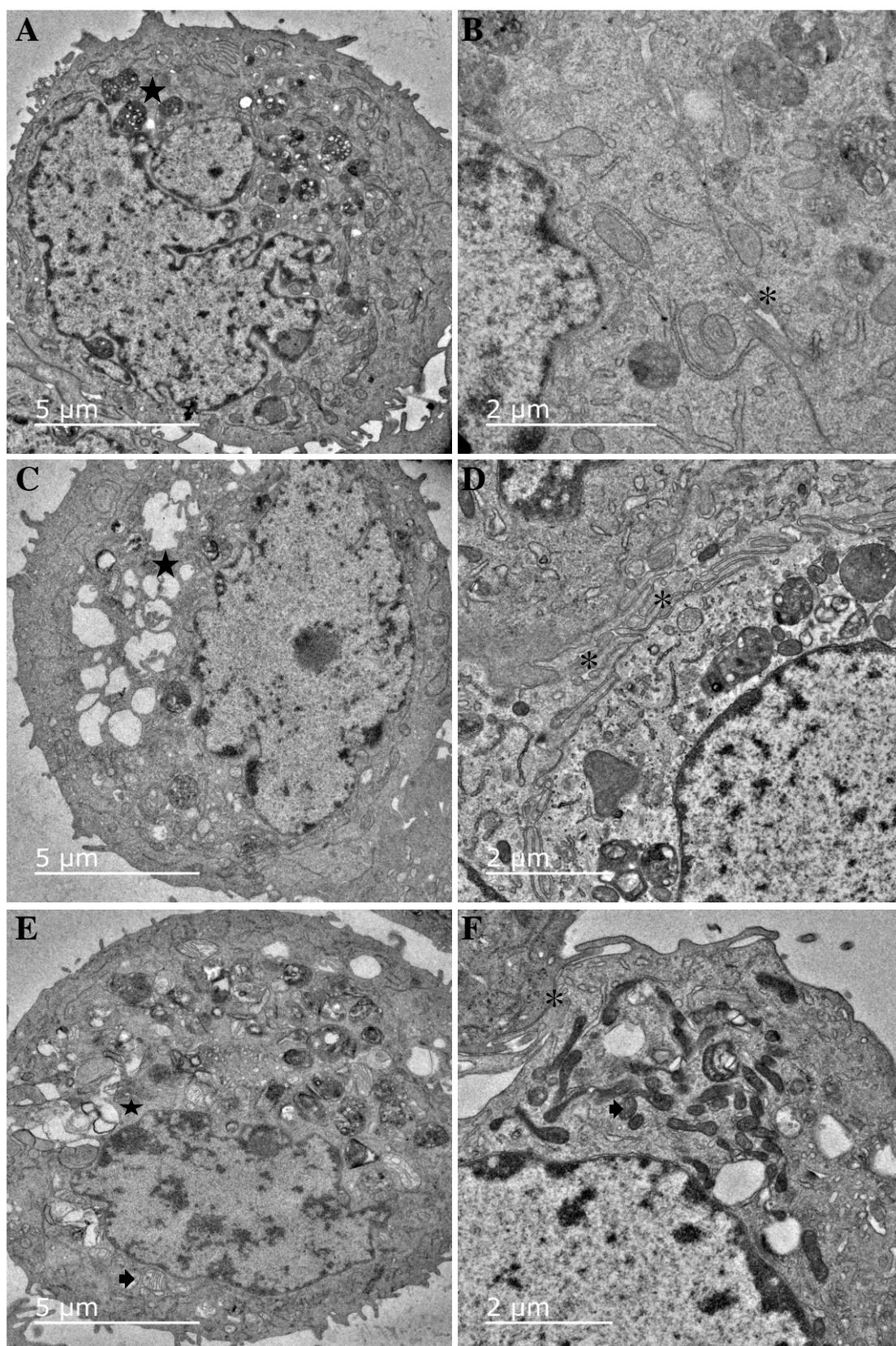


Figura 14. Morfologia ultraestrutural de células BxPC-3 analisadas por MET. Fotomicrografias representativas: (A e B) células não tratadas. (C e E) células tratadas com o complexo 1 ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$); e (D e F) células tratadas com cisplatina ($11,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$),

por 12 e 24 h, respectivamente. Símbolos: estrela, vesículas; asterisco, comunicação intercelular vesicular; ponta de seta, mitocôndrias.

5.7. ESTUDOS COM O COMPLEXO 1 SOBRE O CÂNCER PANCREÁTICO *IN VIVO*

5.7.1. DESENVOLVIMENTO DE LESÕES TUMORAIS EM CAMUNDONGOS BALB/C *NUDE*

A metodologia adotada para a indução de modelo tumoral heterotópico xenográfico com células de carcinoma pancreático (BxPC-3) em camundongos Balb/c *nude* foi bem sucedida. Os dados obtidos mostram que 2, das 3 quantidades de células testadas, induziram lesões com volumes tumorais muito heterogêneos entre os 2 animais de cada grupo após 30 dias de inóculo. Enquanto um dos camundongos inoculados com 5×10^5 células desenvolveu uma lesão de $210,7 \text{ mm}^3$, o outro animal não apresentou lesão aparente (Tabela 5 e Figura 15 A). Embora o inóculo com 5×10^6 células tenha induzido o aparecimento de lesões em ambos os animais do grupo, os volumes tumorais diferiram muito entre si ($277,9$ e $142,5 \text{ mm}^3$) (Tabela 5 e Figura 15 C). No entanto, o grupo inoculado com 1×10^6 células apresentou um resultado satisfatório, já que os 2 animais desenvolveram lesões com volumes semelhantes ($189,6$ e $180,9 \text{ mm}^3$) (Tabela 5 e Figura 15 B). Assim, esse experimento definiu a quantidade de células a ser utilizada no ensaio seguinte para a avaliação da supressão do crescimento tumoral promovida pelo complexo 1.

5.7.2. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO 1

Para obter o perfil de segurança do complexo 1, foi avaliada a sua toxicidade aguda em camundongos Balb/c *nude*. Para tal, grupos de 6 animais foram inoculados, intraperitonealmente, com 4 doses do complexo. A sobrevivência dos animais foi monitorada a cada 24 h por 15 dias. A dose letal média (DL_{50}) foi calculada a partir dos valores das porcentagens de sobrevivência dos grupos em cada concentração administrada, por aplicação do teste de regressão logarítmica não linear, utilizando-se o software *GraphPad Prism*, versão 5.01. Conforme pode ser

observado na Figura 16 A, a DL_{50} calculada foi de $65,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ e a sobrevivência dos camundongos, nos diferentes grupos, está representada por curvas de sobrevivência de Kaplan Meier.

5.7.3. ANÁLISE DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE LESÕES DE CÂNCER PANCREÁTICO HUMANO EM MODELO MURINO

Para avaliar o potencial inibitório de crescimento tumoral pelo complexo 1, foi desenvolvido um modelo xenográfico de câncer pancreático em camundongo Balb/c *nude*. As lesões tumorais foram induzidas por inoculação intradérmica dorsal de 1×10^6 células BxPC-3 em $50 \mu\text{L}$ de PBS, em animais com idades entre 6-8 semanas. Posteriormente, 4 doses do tratamento foram administradas semanalmente aos grupos ($n=6$) por via intraperitoneal.

Os resultados obtidos apontam que o complexo 1 tem uma acentuada atividade antineoplásica. O grupo tratado com $33,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ apresentou índice estatisticamente significativo de supressão do crescimento tumoral, reduzindo em 72% o volume médio dos tumores em relação ao grupo controle não tratado, ao término do tratamento. Embora o tratamento com três doses de $8,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ do complexo 1 tenha promovido a supressão, estatisticamente significativa, do crescimento tumoral, esse efeito não foi mantido até o término do experimento. A administração da cisplatina inibiu o crescimento tumoral em 31%, quando comparado ao grupo controle, mas esse resultado não foi estatisticamente significativo (Figuras 16 B e C). Além disso, os animais tratados com complexo 1 não apresentaram perda significativa de peso corporal ou outros efeitos colaterais identificáveis durante o período experimental. Por outro lado, o peso corporal médio dos animais tratados com cispatina foi significativamente menor que o do grupo controle (Figura 16 D).

Portanto, os resultados sugerem que o complexo 1 é mais eficaz contra o tumor e menos tóxico para os animais do que a cisplatina. Esse fato ressalta o efeito promissor apresentado pelo complexo 1 frente ao câncer pancreático. Por conseguinte, parte dessa pesquisa resultou na submissão de dois desses complexos no depósito de patente no INPI sob o Nº BR 10 2019 011056 2 em 29/05/2019.

Tabela 5. Volume tumoral (mm^3) das lesões promovidas por inoculação de células BxPC-3 em camundongos Balb/c *nude*.

Linhagem celular de carcinoma pancreático (BxPC-3)			
Nº de células	5×10^5	1×10^6	5×10^6
Volume tumoral (mm^3)	Sem lesão aparente	189,6	142,5
		210,7	277,9



Figura 15. Camundongos Balb/c *nude* com lesões tumorais de células de câncer pancreático BxPC-3, após 30 dias de inóculo ($n= 2$). Animais inoculados com 5×10^5 células (A); 1×10^6 células (B) e 5×10^6 células (C).

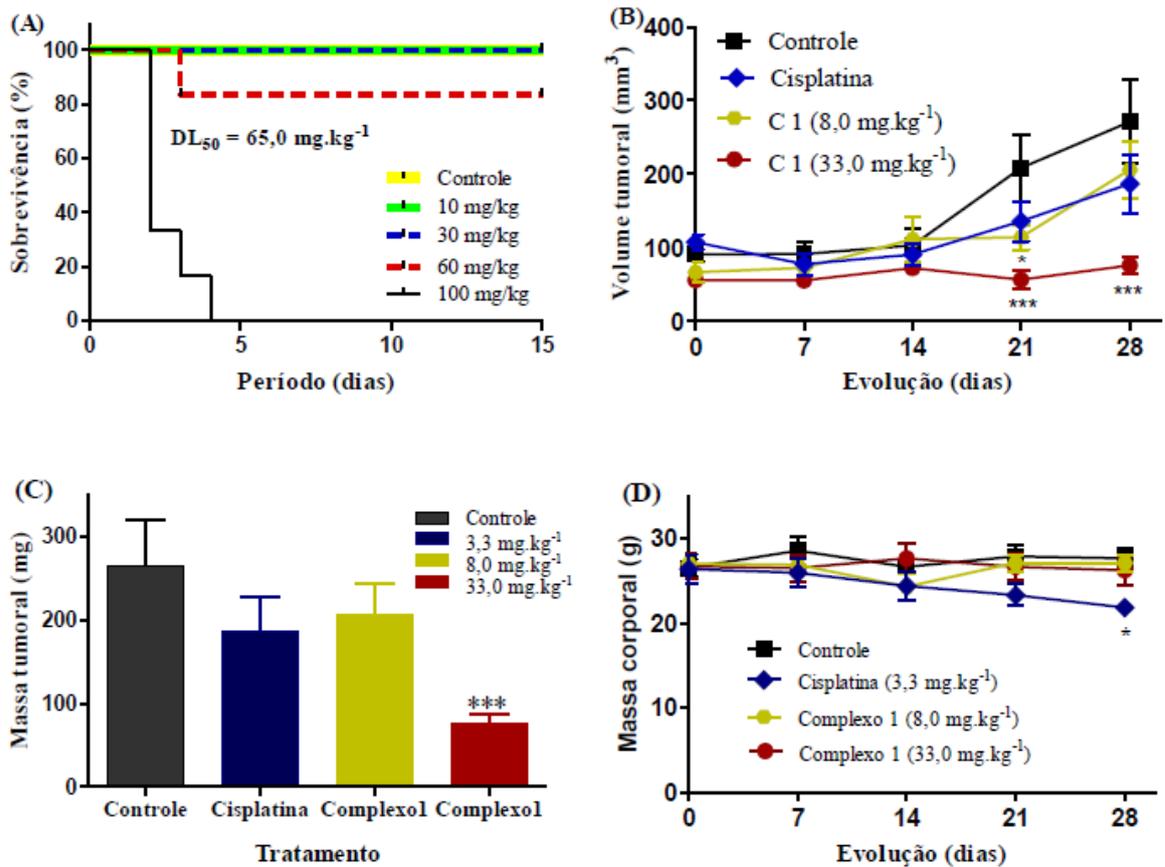


Figura 16. Eficácia do complexo 1 no crescimento de modelo de tumor pancreático humano a partir de células BxPC-3 em camundongos Balb/c *nude*. (A) curva de sobrevivência (Kaplan Meier); (B) Curvas de crescimento de lesões tumorais (volume médio do tumor em função do tempo); (C) peso total médio dos tumores dissecados no final do estudo; e (D) curvas de perda de peso corporal em função do tempo. N = 6; os dados foram analisados por ANOVA/Bonferroni e expressos como a média \pm DP; *, P < 0,05; ***, P < 0,001 em relação ao grupo controle não tratado.

6. DISCUSSÃO

O câncer é uma doença crônico-degenerativa que se apresenta atualmente como um dos principais desafios da saúde pública mundial. Embora avanços significativos na terapia contra o câncer tenham sido alcançados ao longo dos anos, alguns tipos de câncer ainda apresentam altas taxas de mortalidade, devido às restrições impostas pelos tratamentos utilizados rotineiramente, como os efeitos colaterais severos e a resistência aos tratamentos (WHO, 2018, 2020).

Entre as abordagens propostas para minimizar os impactos acarretados pelo câncer está a síntese de complexos metálicos com potencial antineoplásico. Tais estudos têm utilizado, além da platina, outros metais visando obter novos compostos com vasto espectro de atuação frente à heterogeneidade do câncer. O uso de metais essenciais na síntese desses compostos tem como objetivo obter moléculas que causem menor toxicidade aos tecidos não afetados pelo câncer (NDAGI, MHLONGO, SOLIMAN, 2014; SANTINI, *et al.*, 2014).

O cobre é um elemento essencial para o corpo humano e está envolvido em processos fisiológicos críticos. Assim, ele é considerado um potencial agente farmacológico com menor toxicidade que os metais pesados não endógenos (GU, *et al.*, 2019; LU, *et al.*, 2019). A observação de níveis elevados de cobre em alguns tecidos cancerígenos (até 2 a 3 vezes), em comparação com amostras de tecido normal correspondente, pode ser um indicativo de que esse elemento está associado ao desenvolvimento e progressão do câncer. No entanto, um maior requerimento de cobre pelas células tumorais em comparação às células normais, pode se tornar um alvo terapêutico contra o câncer (BHATTACHARJEE, CHAKRABORTY, SHUKLA, 2017; MEDICI, *et al.*, 2015; SHOBHA DEVI, *et al.*, 2018).

Este trabalho apresenta, inicialmente, a propriedade citotóxica dos complexos de cobre (II), $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**3**), em valores de IC_{50} . Esses dados foram determinados por meio de ensaio de MTT utilizando-se um painel com 12 linhagens neoplásicas. Conforme avaliação da Tabela 1 pode-se inferir que o complexo 1 mostrou maior citotoxicidade do que os complexos 2 e 3. No entanto, embora o complexo 2 só tenha sido avaliado sobre 4 linhagens neoplásicas, apresentou valores de IC_{50} também promissores. Em relação ao complexo 3, salientam-se os resultados

obtidos sobre as linhagens COLO 205 e NCI-H460, que mostraram valores de IC₅₀ menores, quando comparados as demais linhagens de tumores sólidos. Ainda que, as linhagens leucêmicas tenham apresentado valores de IC₅₀ menores, geralmente essas células são mais sensíveis aos tratamentos.

Analisando-se ainda a Tabela 1, fica evidente que os complexos 1 e 2 foram marcadamente mais eficazes do que a cisplatina na diminuição da viabilidade de todas as células cancerígenas testadas. Além disso, os três complexos mostraram maior citotoxicidade contra as linhagens neoplásicas do que sobre as células saudáveis (PBMC) (Tabela 2), mostrando excelente índice de seletividade para várias linhagens estudadas (Tabela 3).

Assim, essa triagem mostrou que esses novos complexos de cobre (II), principalmente os complexos 1 e 2, apresentam atividade citotóxica proeminente contra células cancerígenas. Contudo, uma comparação com outros dados publicados na literatura fica limitada, por causa do ineditismo dos complexos aqui avaliados. No entanto, nossos dados estão de acordo com relatos de Koňariková e colaboradores (2016), que consideram os complexos de cobre (II) promissores no desenvolvimento de novos tratamentos para várias neoplasias malignas (KOŇARIKOVÁ, *et al.*, 2016; SANTINI, *et al.*, 2014).

Para os complexos de cobre (II) aqui estudados, houve uma variação acentuada entre os valores de IC₅₀ apresentados para as diferentes linhagens neoplásicas testadas. Tal fato reflete a relevância do potencial farmacológico de cada complexo, inferindo diretamente no grau de sensibilidade de cada linhagem celular. Essas respostas estão relacionadas à complexidade morfológica e fisiológica, além das inúmeras alterações genéticas inerentes aos diferentes tipos de câncer, os quais revelam padrões de respostas à citotoxicidade induzida por diferenças estruturais nessas moléculas (WANG, *et al.*, 2019).

Entre as inúmeras publicações sobre a atividade antineoplásica de complexos de cobre, Montagner e colaboradores (2015) relataram que um complexo dinuclear contendo o ligante (2,6-*bis*(1,4,7-triazacilonon-1-ilmetil)-4-metilfenol), mostrou seletividade sendo mais citotóxico contra as linhagens celulares de câncer de pâncreas (BxPC-3, AsPC-1, Capan-1 e PANC-1) do que sobre uma linhagem celular humana não tumoral (HEK 293). Esse estudo demonstrou que o complexo atua interagindo com o DNA celular e induz morte celular por apoptose, ativando a via dependente de p53 nas células cancerígenas

de pâncreas Capan-1 (MONTAGNER, *et al.*, 2015). Além desse, outros estudos com complexos de cobre (II) mostraram que muitos desses derivados exibem atividade citotóxica proeminente, geralmente relacionada à capacidade de ligar e clivar DNA e regular a apoptose (BORGES, *et al.*, 2016; FERNANDES, *et al.*, 2015).

Baseando-se nesses relatos, investigações foram realizadas, *in vitro*, para descobrir o mecanismo de ação subjacente a atividade citotóxica apresentada pelos complexos 1 e 2 contra a linhagem de câncer de pâncreas (BxPC-3). O tipo de morte celular deflagrado em resposta ao tratamento com os complexos foi investigado mediante a análise do ciclo celular em ensaio de Sub-G1. A distribuição da fluorescência nas células, com marcação do DNA por iodeto de propídeo, foi quantificada por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos sugerem que os complexos promoveram morte celular por apoptose, como pode ser observado nas Figuras 4 e 5. Tal inferência baseia-se na detecção do padrão de fragmentação do DNA, característico do processo de morte celular por apoptose. Esse evento de fragmentação é promovido pela ativação de endonucleases nos estágios finais do processo apoptótico (KAJSTURA, *et al.*, 2007; NUNEZ, 2001). Portanto, esses ensaios quantificaram a fluorescência das células com conteúdo de DNA reduzido, as quais apareceram na região Sub-G1 em relação às fases do ciclo celular, demonstrando alterações nos perfis de células tratadas em relação às amostras não tratadas. Desse modo, a indução de apoptose pelos complexos 1 e 2 pode ser corroborada por um estudo anterior que obteve resultados semelhantes ao testar o complexo de cobre (II) [(H₂L₂) Cu (μ-Cl) 2Cu (H₂L₂)] Cl₂•5H₂O nas linhagens celulares U937 e THP-1 (FERNANDES, *et al.*, 2015).

Assim sendo, esses resultados são animadores já que a indução de apoptose é uma das principais considerações no desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos, dada a conexão conhecida entre o câncer e esse tipo de morte celular. Estas considerações referem-se ao fato das células apoptóticas serem transformadas em corpos apoptóticos, os quais são engolfados por fagócitos *in vivo* sem afetar os tecidos circundantes por não estimular um processo inflamatório (COTTER, *et al.*, 2009; JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002).

A fim de estruturar um protocolo abrangente, econômico e compatível com o tempo disponível para sua execução, optou-se por selecionar um complexo e uma linhagem celular para a finalização desse trabalho. Isto posto, a linhagem BxPC-3 foi escolhida porque o câncer de pâncreas é um dos mais agressivos e letais (GUO, *et al.*, 2017) e mostrou alta sensibilidade ao complexo 1. Assim, a capacidade do complexo 1 de induzir morte celular por apoptose em células BxPC-3 foi, adicionalmente, investigada quanto a alterações no potencial de membrana mitocondrial. A manutenção desse potencial é um evento essencial na viabilidade celular, pois a geração da maioria das moléculas de ATP, que fornecem energia para as funções básicas das células, depende da integridade da função mitocondrial.

Desse modo, a análise do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um parâmetro usado como um indicador de morte celular, uma vez que, a alteração na transição da permeabilidade mitocondrial é um passo importante na indução de apoptose (DEWSON, KLUCK, 2009; ROY, *et al.*, 2014; ZOROVA, *et al.*, 2018). Além disso, a verificação da função mitocondrial pode indicar se há ativação da via intrínseca da apoptose após um determinado estímulo. A perda da função mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliada usando a sonda fluorescente catiônica lipofílica JC-1.

A análise dos dados obtidos mostrou que as amostras tratadas, tanto pelo complexo 1 quanto pela cisplatina, apresentaram despolarização da membrana mitocondrial (Figura 6) confirmando assim, que a atuação de ambos os tratamentos resulta em disfunção das mitocôndrias. Esses dados fornecem evidências de que o complexo atua induzindo apoptose nas células de câncer pancreático, confirmando os resultados obtidos no estudo do ciclo celular.

A propriedade de induzir apoptose, evidenciada nos ensaios anteriores, foi confirmada pela verificação da atividade enzimática das caspases. Essas proteases são componentes-chave do processo apoptótico. Nas células eucarióticas normais, as caspases existem em estados inativos (procaspases) e estão envolvidas no crescimento e diferenciação celular e regulação da apoptose. Quando as caspases são ativadas, o programa apoptótico é acionado, causando morte celular (TANG, *et al.*, 2019). O padrão de ativação das caspases iniciadoras e efetoras foi avaliado para esclarecimento da via apoptótica desencadeada nas células BxPC-3. Os resultados obtidos indicam a ativação de todas as caspases

avaliadas em resposta aos tratamentos com o complexo 1, quando comparadas à amostra não tratada. A cisplatina, usada como controle positivo, também foi capaz de ativar todas as caspases testadas. Como visto na Figura 7, (A) e (B), as caspases 8 e 9 foram ativadas, o que sugere que ambas as vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca, são estimuladas. Esse fato está de acordo com a informação de que a ativação da caspase 8 também pode levar à disfunção mitocondrial, com liberação das proteínas mitocondriais e, conseqüentemente, há a ativação da via intrínseca (ROY, *et al.*, 2014; TAN, *et al.*, 2014). Portanto, não é possível afirmar, inequivocamente, se uma das duas vias apoptóticas está sendo predominantemente ativada pela ação dos tratamentos. No entanto, a ocorrência de morte celular por apoptose é fortemente evidenciada nessa investigação, consolidando assim, os dados obtidos nas experimentações anteriores.

Diante dos resultados promissores obtidos nos ensaios anteriores com o complexo 1, fez-se pertinente ampliar o conhecimento sobre a sua ação no que se refere à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e se essa propriedade seria responsável pela atividade antineoplásica apresentada. Para determinar o nível constitutivo de ROS presente em células BxPC-3 foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas sem e com concentrações crescentes do antioxidante NAC por 3 e 48 h. Decorrido o tempo de incubação, as células foram marcadas com a sonda fluorescente DCFH-DA.

Os dados obtidos (Figuras 8 e 9) mostraram que as células BxPC-3 apresentam um perfil elevado de produção constitutiva de ROS. Esse resultado está em acordo com estudos que apontam que as células cancerígenas exibem uma maior geração de ROS em relação às células normais, sendo essa característica diretamente relacionada com a progressão tumoral e o processo metastático (FRUEHAUF, MEYSKENS, 2007). Surpreendentemente, quando as células foram incubadas com concentrações crescentes do antioxidante *N*-acetil-L-cisteína (NAC), os percentuais de ROS aumentaram em todas as concentrações e tempos testados. Esse resultado diferiu de uma publicação que classifica o NAC como uma fonte de grupos sulfidríla que atuam eliminando radicais livres nas células, uma vez que interagem com ROS (ZAFARULLAH, *et al.*, 2003). Por outro lado (MEZENCEV, *et al.*, 2013) relataram que o tratamento de células de câncer pancreático (AsPC-1) com 15 mmol/L de NAC aumentou a

concentração de ROS. Apesar dessa dubiedade nas informações sobre a atuação do NAC, a investigação prosseguiu com a avaliação da produção de ROS em células BxPC-3 tratadas com complexo 1.

Essa avaliação verificou se o tratamento com complexo 1 interfere na produção de ROS em células BxPC-3. Para tal, células não tratadas e tratadas por 48 h com complexo 1 e cisplatina, sem e com pré-tratamento com NAC, foram marcadas com DCFH-DA. A emissão de fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo (Figura 10). As células não tratadas apresentaram um perfil elevado de produção constitutiva de ROS, semelhante aos resultados dos ensaios anteriores, confirmando que essa condição é prevalente nessa linhagem de câncer pancreático.

No entanto, quando as células foram tratadas com $3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo 1, sem e com pré-tratamento com NAC ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$), houve uma diminuição das porcentagens de células no pico onde se concentra maior intensidade de fluorescência, quando comparado com a amostra não tratada. Contudo, a diferença entre as amostras com e sem o pré-tratamento com NAC foi de apenas 2,0% das células com marcação para presença de ROS. Isso sugere que o pré-tratamento com o antioxidante promoveu uma ligeira diminuição na produção de ROS quando comparado ao tratamento só com o complexo 1.

Nas amostras em que o tratamento como complexo 1 foi de $7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, houve uma diminuição acentuada das porcentagens de células na região demarcada para a marcação de ROS, refletindo uma diminuição marcante na produção de ROS induzida por ambos os tratamentos do complexo 1, ou seja, com e sem NAC, em relação a amostra não tratada. Entretanto, quando a comparação feita é entre o tratamento isolado e o tratamento conjunto com NAC, o resultado é controverso, pois o esperado seria que a amostra pré-tratada com o antioxidante apresentasse um percentual menor de células com marcação de ROS, mesmo que essa diferença seja de apenas 3,0%. No entanto, pode-se ressaltar a diminuição drástica na quantidade de ROS promovida por ambos os tratamentos nessa concentração do complexo 1. Esses resultados sugerem que esse complexo bloqueia a produção de ROS, uma vez que o tratamento só com o NAC não alterou os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio.

Quando as células foram tratadas com $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cisplatina, sem e com pré-tratamento com NAC, os resultados gerados apresentaram um perfil

semelhante de marcação para ROS, tanto na comparação entre os tratamentos, quanto em relação a amostra não tratada. Esses resultados indicam que esses tratamentos não alteraram as concentrações de ROS na linhagem de câncer pancreático, e que o mecanismo de atuação do complexo 1 difere da atuação da cisplatina sobre esse tipo de câncer.

Para avaliar se o pré-tratamento das células BxPC-3 com NAC interfere na propriedade citotóxica apresentada pelo complexo 1, realizou-se ensaios metabólicos utilizando MTT. Nestes ensaios o complexo 1 foi avaliado isoladamente e em conjunto com pré-tratamento com 3 concentrações de NAC. Os valores de IC₅₀ gerados (Tabela 4) mostram que a atividade citotóxica do complexo 1 foi potencializada pelo pré-tratamento com NAC. A Figura 11 mostra um gráfico representativo dos testes de MTT realizados para determinar qual a melhor combinação entre as concentrações do complexo 1 e do NAC testadas. Nota-se que quando acontece uma combinação entre 1 µmol do complexo 1 e 5 mmol do NAC, a viabilidade celular, no tratamento associado, baixa drasticamente em relação ao tratamento só com a mesma concentração do complexo 1. Esse resultado é indicativo de que o pré-tratamento das células com NAC, nessas condições, potencializou o efeito citotóxico do complexo 1. O mecanismo adjacente a esse resultado carece de mais investigações teóricas e práticas, pois seria precipitado inferir qualquer colocação a respeito sem base para tal. Contudo, os dados obtidos pareceram tão promissores que incentivou-nos a verificar o mecanismo de ação de algumas dessas combinações que mostraram proeminente diminuição de viabilidade celular.

Buscando elucidar o mecanismo pelo qual o complexo 1 em associação com pré-tratamento com NAC, afetou a viabilidade celular, avaliou-se a indução de apoptose por citometria de fluxo. A linhagem BxPC-3 foi tratada com o complexo 1, sem e com pré- tratamento com NAC e submetida a análise do ciclo celular (Sub-G1). Avaliando-se os dados obtidos (Figura 12) verifica-se que as amostras com células não tratadas e tratadas só com o NAC apresentaram baixos percentuais de células apoptóticas, o que mostra que o tratamento só com NAC não leva uma quantidade significativa de células à morte. No entanto, ao analisar as amostras tratadas só com o complexo 1 e em conjunto com NAC, percebe-se que a associação de uma concentração quatro vezes menor do complexo 1 com o antioxidante é capaz de promover percentuais de apoptose maiores que o

complexo isoladamente. Esses resultados apontam para um efeito sinérgico entre o complexo 1 e o antioxidante NAC, porém se faz necessário uma investigação mais ampla para se fazer tal inferência.

No entanto, é importante ressaltar que a possibilidade de ocorrência de sinergismo representa um achado muito promissor, uma vez que um efeito sinérgico entre substâncias é uma estratégia eficaz no tratamento de doenças. Os benefícios dessa interação implicam em redução de doses administradas, aumento da eficácia farmacológica, redução de efeitos colaterais e retardo no desenvolvimento de mecanismos de resistência (CHOU, 2010).

Os resultados da investigação por ensaios quantitativos, quanto a capacidade de indução de apoptose, foram confrontados por ensaios qualitativos de Microscopias Eletrônicas de Transmissão (TEM) e Varredura (MEV). Essas microscopias constituem-se metodologias adequadas para a verificação de alterações morfológicas e ultraestruturais típicas de morte celular por apoptose.

As fotomicrografias obtidas, após o tratamento das células com o complexo 1 e a cisplatina, apresentam alterações morfológicas e ultraestruturais que reforçam a ocorrência de apoptose. As alterações fenotípicas mais contundentes observadas foram um aumento de vesículas citoplasmáticas, perda de contato intercelular, desorganização do citoplasma, formação de "blebbing" de membrana, diminuição das microvilosidades na superfície celular, condensação do DNA, além de mitocôndrias e retículo endoplasmático com perfis morfológicos alterados (Figuras 13 e 14).

Baseando-se nessas observações, pode-se inferir que o complexo 1 e a cisplatina atuam na promoção de apoptose nas células BxPC-3, corroborando com os resultados dos ensaios anteriores, principalmente, a ativação das caspases, uma vez que, essas enzimas clivam os substratos celulares causando uma desorganização do citoplasma e, conseqüentemente, o aparecimento de alterações morfológicas e ultraestruturais.

Tais alterações são decorrentes, principalmente, da clivagem de substratos intracelulares componentes do citoesqueleto pelas caspases. Um desses substratos é a actina, que quando clivada, causa um rearranjo na distribuição das organelas e altera a forma da célula. Esse processo provoca picnose celular, desestabiliza a membrana plasmática e, conseqüentemente, gera protusões chamadas de "blebbing" da membrana (AL-BAHLANI, *et al.*, 2017). Outras

alterações são causadas pela atividade efetora da caspase 3 que ativa a enzima DNase. Em seguida, essa enzima entra no núcleo e cliva o DNA, desestruturando o genoma que se condensa. A atividade das caspases também promove a desestabilização da lamina nuclear, tornando o núcleo picnótico e fragmentado (ELMORE, 2007; WONG, 2011).

Além da seletividade de atuação sobre as células cancerígenas, é de fundamental importância que substâncias candidatas a se tornarem medicamentos antineoplásicos não promovam morte celular por necrose. Essa proposição é feita com base em estudos patológicos que afirmam que a ocorrência de taxas necróticas superiores a 5% do número total de células de um organismo geram reações inflamatórias incompatíveis com a vida (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2018). Por isso, deve-se enfatizar a importância da promoção de apoptose na identificação de moléculas com potencial antineoplásico, uma vez que esse tipo de morte celular não libera mediadores pró-inflamatórios.

Vários complexos de cobre (II) têm sido sintetizados e propostos como potenciais agentes anticâncer com base em ensaios *in vitro*, entretanto esses efeitos são pouco investigados em modelos *in vivo*. Aqui, essa investigação se estendeu para essa modalidade com a obtenção de resultados promissores.

O perfil de segurança do complexo 1 foi avaliado *in vivo* pela determinação da sua toxicidade aguda em camundongos Balb/c *nude*. Conforme pode ser observado na Figura 16 (A) a DL₅₀ (dose letal para 50 % dos animais) foi de 65,0 mg.kg⁻¹ do animal. Este valor é muito superior ao descrito na literatura para a cisplatina que é de 6,6 mg.kg⁻¹ do animal (ASTON, *et al.*, 2017), o que significa que o complexo de cobre é quase 10 vezes menos tóxico aos animais, quando comparado a esse fármaco convencional utilizado na clínica oncológica. Portanto, esse dado toxicológico é promissor, indicando uma boa tolerância sistêmica ao complexo.

O desenvolvimento de lesões tumorais heterotópicas xenográficas em modelos murinos permitem testar as propriedades terapêuticas de novas substâncias. A metodologia adotada para a indução de modelo tumoral com células de carcinoma pancreático (BxPC-3) em camundongos Balb/c *nude* foi bem sucedida. Os dados obtidos (Tabela 5 e Figura 15) indicam que houve reprodutibilidade e otimização do método utilizado por Lu, *et al.* (2008) que necessitou de uma concentração celular 10 vezes maior para induzir tumor com

essa linhagem celular (LU, *et al.*, 2008). Além disso, o êxito desse trabalho foi importante para o prosseguimento da experimentação de verificação de supressão do crescimento tumoral pelo complexo.

Para avaliar o potencial inibitório de crescimento tumoral pelo complexo 1, o modelo de câncer pancreático, anteriormente descrito, foi reproduzido numa quantidade de camundongos Balb/c *nude* necessária para a experimentação. Os resultados obtidos apontam que o complexo 1 tem uma acentuada atividade antineoplásica. O grupo tratado com 33,0 mg.kg⁻¹ apresentou índice estatisticamente significativo de supressão do crescimento tumoral, reduzindo em 72% o volume médio dos tumores em relação ao grupo controle não tratado, ao término do tratamento. Embora o tratamento com três doses de 8,0 mg.kg⁻¹ do complexo 1 tenha promovido a supressão, estatisticamente significativa, do crescimento tumoral, esse efeito não foi mantido até o término do experimento. A administração da cisplatina inibiu o crescimento tumoral em 31%, quando comparado ao grupo controle, mas esse resultado não foi estatisticamente significativo (Figura 16, B e C). Além disso, os animais tratados com complexo 1 não apresentaram perda significativa de peso corporal ou outros efeitos colaterais identificáveis durante o período experimental. Por outro lado, o peso corporal médio dos animais tratados com cisplatina foi significativamente menor que o do grupo controle. Portanto, os resultados indicam que o complexo 1 é mais efetivo contra o tumor e menos tóxico para os animais do que a cisplatina. Esse fato ressalta o efeito promissor apresentado pelo complexo 1 frente ao câncer pancreático. Além disso, essa modalidade de experimentação é muito relevante para o avanço das pesquisas, uma vez que existem poucas publicações de investigações sobre os efeitos de complexos de cobre em modelos *in vivo* (SANTINI, *et al.*, 2014).

Por conseguinte, a heterogenia das neoplasias é condição inquestionável de necessidade de estratégias inovadoras para contornar deficiências recorrentes nos tratamentos disponíveis atualmente. Dessa forma, nossos achados são promissores e instigantes para a realização de estudos complementares com grande potencial de desenvolvimento de um medicamento antineoplásico.

Por fim, esse trabalho resultou em um depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Nº BR 10 2019 011056 2) (KANASHIRO,

M.M., *et al.*, 2019) e na redação de um manuscrito que será submetido para publicação.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a atividade citotóxica *in vitro* de três novos complexos de cobre (II), sendo, dois binucleares ($[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$) (1) e ($[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (2) e um mononuclear $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (3). O complexo 1 foi um pouco mais ativo que o complexo 2, e ambos foram bem mais ativos que o complexo 3 quando testados em células cancerígenas;

Todos os três complexos foram menos citotóxicos sobre células saudáveis, quando comparado às células cancerígenas, apresentando índice de seletividade para a maioria das linhagens;

Os complexos 1 e 2 induziram fragmentação do DNA sugestiva de morte celular por apoptose em células BxPC-3;

Estudos adicionais, quantitativos e qualitativos, com o complexo 1 sugerem a indução de morte celular apoptótica, pela ativação das vias intrínseca e extrínseca, em células BxPC-3;

O pré-tratamento de células BxPC-3 com um antioxidante potencializou a atividade citotóxica e a capacidade de induzir apoptose do complexo 1;

O complexo 1 mostrou um excelente perfil de segurança em camundongos Balb/c *nude*, e foi capaz de inibir significativamente o crescimento de lesões tumorais de câncer pancreático, sem redução significativa do peso corporal dos animais;

Por fim, o conjunto de dados apresentados incita a perspectiva de novas pesquisas com esse complexo, visando consolidar o conhecimento do seu potencial antineoplásico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BAHLANI, S. *et al.* Platinum-Based Drugs Differentially Affect the Ultrastructure of Breast Cancer Cell Types¹. Al-Bahlani S, Al-Dhahli B, Al-Adawi K, Al-Nabhani A, Al-Kindi M. Platinum-Based Drugs Differentially Affect the Ultrastructure of Breast Cancer Cell Types. *Biomed. **BioMed Research International***, v. 2017, p. 1–13, 2017.

ALBERTS, B. *et al.* Molecular biology of the cell. 5th ed. **Garland Science**, 2010. 1392p.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. Treating Advanced Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/advanced-cancer/treatment.html>>. Acesso em: 4 fev. 2020.

ASHKENAZI, A., DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 28, n. 281, p. 1305–8, 1998.

ASTON, W. J. *et al.* A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

BARBOSA, I. R. *et al.* Cancer mortality in Brazil: Temporal trends and predictions for the year 2030. **Medicine (United States)**, v. 94, n. 16, p. 1–6, 2015.

BHATTACHARJEE, A.; CHAKRABORTY, K.; SHUKLA, A. Cellular copper homeostasis: Current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. **Metallomics**, v. 9, n. 10, p. 1376–1388, 2017.

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

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

BRAY, F. *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790–801, 2012.

BRUIJNINCX, P.C.A., SADLER, O. . New trends for metal complexes with anticancer activity. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, p. 197–206, 2008.

CHEN, L., HANN, B., WU, L. Experimental models to study lymphatic and blood vascular metastasis. **J Surg. Oncol**, v. 103, n. 6, p. 475–483, 2011.

CHEN, W. *et al.* Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 12, p. 1210–6, 2014.

CHOU, T. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Res**, v. 70, n. 2, p. 440– 6, 2010.

CIVETTA, M.T.M., CIVETTA, J. . Carcinogénesis. **Salud Publica**, v. 53, p. 405–414, 2011.

COTTER, T. G. Apoptose cancer. v. 9, p. 501–507, 2009.

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

DEWSON, G., KLUCK, R. M. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 16, p. 2801–2808, 2009.

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

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

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

ESPINOSA, E., RAPOSO, C. G. Classification of Anticancer Drugs Based on Therapeutic Targets. In: REDDY, L.H.; COUVREUR, P. (Ed.). **In Macromolecular Anticancer Therapeutics**. 1^a ed. Springer, New York, 2010.

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

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

FISCHER, U., SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 187–215, 2005.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 1351–1371, 2011.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, F. L. Reactive oxygen species: A breath of life or

death? **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 3, p. 789–794, 2007.

FUCHS, F. D., WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica – Fundamentos da terapêutica racional**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010.

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

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, p. 37–43, 2007.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 3, n. 3, p. 335–343, 2007.

GU, S. S. *et al.* Mitochondria-localizing N-heterocyclic thiosemicarbazone copper complexes with good cytotoxicity and high antimetastatic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 654–664, 2019.

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

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

GUO, L. *et al.* Elevated expression of SATB1 is involved in pancreatic tumorigenesis and is associated with poor patient survival. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 8842–8848, 2017.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HONG, E. *et al.* Elevated pressure enhanced TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via ERK1/2-inactivation. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 20, n. 4, p. 535–48, 2015.

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

INCA. **Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022**. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/search/conteudo/estimativa do cancer para o trienio 2020-2022](https://www.inca.gov.br/search/conteudo/estimativa%20do%20cancer%20para%20o%20trienio%202020-2022)>. Acesso em: 6 abr. 2020.

JANNEKE, P. C. G., *et al.* 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.

JOHNSTONE, R. W., RUEFLI, A. A., LOWE, S. W. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 153–164, 2002.

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

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

KOŇARIKOVÁ, K. *et al.* Autophagy in MCF-7 cancer cells induced by copper complexes. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1221–1224, 2016.

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**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2018.

LEMASTERS, J. J. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Target Defense against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Aging.

Rejuvenation Research, v. 8, n. 1, p. 3–5, 2005.

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

LI, M. J. *et al.* Synthesis, characterization, DNA binding, cleavage activity and cytotoxicity of copper(ii) complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 7, p. 2789–2798, 2014.

LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Caspase-independent cell death? **Oncogene**, v. 23, p. 2766–2773, 2004.

LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, n. July, p. 95–113, 2018.

LU, X. *et al.* Discovery of β -carboline copper(II) complexes as Mcl-1 inhibitor and in vitro and in vivo activity in cancer models. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, 2019.

LU, Y. Y. *et al.* Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 35, p. 5403–5411, 2008.

MARKOWSKA, A. *et al.* Noble metals in oncology. **Oncol Contemp**, v. 19, n. 4, p. 271–275, 2015.

MASAHIKO KANASHIRO, M. *et al.* **Pedido nacional de Invenção , Modelo de Utilidade , Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**, 2019.

MCCARTHY, N.J, EVAN, G. I. Methods for detecting and quantifying apoptosis. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 36, p. 259–278, 1998.

MEDICI, S. *et al.* Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 2015.

MEZENECV, R. *et al.* Molecular analysis of the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on the proliferation and invasiveness of pancreatic cancer cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, n. 5, p. 504–518, 2013.

MJOS, K. D., ORVIG, C. Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry. **Chem. Reviews**, v. 114, p. 4540–4563, 2014.

MONTAGNER, D. *et al.* DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 145, p. 101–107, 2015.

MORCELLI, S. R. *et al.* Synthesis, characterization and antitumoral activity of new cobalt(II) complexes: Effect of the ligand isomerism on the biological activity of the complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 161, p. 73–82, 2016.

MOREIRA, R. O. *et al.* Modulating the antitumoral activity by the design of new platinum(II) compounds: Synthesis, characterization, DFT, ultrastructure and mechanistic studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 194, n. June 2018, p. 200–213, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MURAD, A.M., KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**. Guanabara; Rio de Janeiro. 2000.

NDAGI, U., MHLONGO, N., SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 144–153, 2014.

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

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 592–603, 2004.

PEIXOTO, M. S., DE OLIVEIRA GALVÃO, M. F., BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Cell death pathways of particulate matter toxicity. **Chemosphere**, v. 188, p. 32–48, 2017.

PERES, L. A. B., CUNHA, A. D. J. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. **Journal Brasileiro de Nefrotoxicidade**, v. 35, n. 4, p. 332–340, 2013.

PORTUGAL, J., BATALLER, M., MANSILLA, S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. **Tumori**, v. 95, p. 409–421, 2009.

RAJESWARAN A, TROJAN A, BURNAND B, G. M. Efficacy and side effects of cisplatin and carboplatin based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomiz. **Lung Cancer**, v. 59, n. 1, p. 1–11, 2008.

RICCI, M.S., ZONG. W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11, p. 342–357, 2006.

ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1965.

ROY, M. J. *et al.* Cell death and the mitochondria: Therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 8, p. 1973–1987, 2014.

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

SCHLENKE, P. *et al.* Evaluation of a novel mononuclear cell isolation procedure for serological HLA typing. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 6, p. 808–813, 1998.

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

SHINTANI, T., KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. **Science**, v. 306, p. 990, 2004.

SHOBHA DEVI, C. *et al.* Recent Advances in Copper Intercalators as Anticancer Agents. **Journal of Fluorescence**, v. 28, n. 5, p. 1195–1205, 2018.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. Genomic instability - The engine of tumorigenesis? **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 701–708, 2003.

SIEGEL, R. L., MILLER, KIMBERLY D, JEMAL. A. Cancer Statistics , 2019. **CA CANCER J CLIN**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

SINHA, T. Tumors: Benign and Malignant. **Cancer therapy & Oncology International Journal**, v. 10, n. 3, p. 1–3, 2018.

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

SUFFNESS, S.M., PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed), **Methods in plant biochemistry: Assays for bioactivity**. v.6. Academic Press, London, 220p. 1990.

TAN, M.L. *et al.* Programmed cell death pathways and current antitumor targets. **Pharm Res**, v. 26, p. 1547–60, 2009.

TAN, C. P. *et al.* Metallomics insights into the programmed cell death induced by

metal-based anticancer compounds. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 978–995, 2014.

TANG, D. *et al.* The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, v. 29, n. 5, p. 347–364, 2019.

TERRA, W. DA S. Síntese, caracterização e prospecção da atividade antitumoral de compostos de coordenação de cobre II com ligantes *n,o*-doadores. 2016. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. **Science**, v. 267, p. 1456–1462, 1995.

TOMASETTI, C., LI, L. VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355 n. 6331, p. 1330–1334, 2017.

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

TSIRMOULA, S. *et al.* Implications of pleiotrophin in human PC3 prostate cancer cell growth in vivo. **Cancer Science**, v. 103, n. 10, p. 1826–1832, 2012.

TSUJIMOTO, Y., SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ**, v. 12, p. 1528–1534, 2005.

VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, p. 789–799, 2004.

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

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact->

sheets/detail/cancer>. Acesso em: 17 mar. 2020.

WHO. **Outlines steps to save 7 million lives from cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/04-02-2020-who-outlines-steps-to-save-7-million-lives-from-cancer>>. Acesso em: 6 abr. 2020.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J. Exp. Clin. Canc. Res.**, v. 31, p. 136–142, 2011.

MARTINS, B. X. *et al.* BBA - General Subjects Myrtenal-induced V-ATPase inhibition - A toxicity mechanism behind tumor cell death and suppressed migration and invasion in melanoma. **BBA - General Subjects**, v. 1863, n. 1, p. 1–12, 2019.

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

YANG, Q. Y. *et al.* Syntheses, crystal structures, and antitumor activities of copper(II) and nickel(II) complexes with 2-((2-(Pyridin-2-yl)hydrazono)methyl)quinolin-8-ol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1874, 2018.

YANG, Z. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nat. Cell Biol**, v. 12, p. 814–822, 2010.

ZAFARULLAH, M. *et al.* Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 6–20, 2003.

ZONG, W.X., THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev**, v. 20, p. 1–15, 2006.

ZOROVA, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 2018.