

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISES BIOLÓGICAS, *IN VITRO*, DO COMPOSTO DE  
COORDENAÇÃO DE COBRE NA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.**

**ANA CAROLINE MAFRA BEZERRA**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

MARÇO DE 2021

**ANÁLISES BIOLÓGICAS, *IN VITRO*, DO COMPOSTO DE  
COORDENAÇÃO DE COBRE NA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.**

**ANA CAROLINE MAFRA BEZERRA**

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

Orientador: Professor Dr. Milton Masahiko Kanashiro.

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

MARÇO DE 2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

B574

Bezerra, Ana Caroline Mafra.

Análises biológicas, *in vitro*, do composto de coordenação de cobre na atividade antineoplásica. / Ana Caroline Mafra Bezerra. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

60 f. : il.

Bibliografia: 51 - 57.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Milton Masahiko Kanashiro.

1. Câncer. 2. Compostos de Coordenação. 3. Cobre. 4. Atividade antineoplásica. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ANÁLISES BIOLÓGICAS, *IN VITRO*, DO COMPOSTO DE  
COORDENAÇÃO DE COBRE NA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.

ANA CAROLINE MAFRA BEZERRA

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

Aprovada em 03de Março de 2021.

Banca Avaliadora:

---

Dr. Fabrício Moreira Almeida (Membro Interno - UENF)

---

Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida (Membro Interno - UENF)

---

Prof. Dr. Franz Viana Borges (Membro Externo - IFF)

---

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Membro Interno - UENF)

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Aos meus pais, Rose e Suliman pela incomparável dedicação e empenho de me amarem e me acolherem na jornada desta vida. E por me oportunizarem subsídios para realização dos meus sonhos.
- ❖ Ao meu irmão amado Diego que tanto estimo, gratidão pelo apoio, ombro e ouvidos amigos sempre que preciso.
- ❖ Agradeço ao meu orientador professor Milton, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Principalmente pela paciência, ensinamentos e direcionamentos.
- ❖ Aos companheiros de laboratório, pela ajuda incansável e pelos muitos momentos de descontração, Paula, Igor, Lucas, Laís e Lanna. E as companheiras acadêmicas Daphne e Kíssila pelo constante apoio.
- ❖ Às técnicas do LBR Rita Escocard e Juliana Azevedo pelas inúmeras ajudas, disponibilidade e pela paciência em auxiliar no desenvolvimento desse trabalho.
- ❖ A Capes e Universidade Estadual Darcy Ribeiro do Norte Fluminense, pela oportunidade de estudo.
- ❖ Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para avaliação deste trabalho.
- ❖ A revisora Laura, que prontamente pode contribuir para que eu finalizasse esta etapa.
- ❖ Aos meus amigos Franz, André, Érika, Carol, Raquel, Ellen, Débora, Leni e Aline pelo imenso apoio diário mesmo à distância e por todo amor emanado.
- ❖ E ao Khaledy pelo companheirismo incansável, paciência e principalmente por todo apoio e coragem que me ofereceu em todos os dias que precisei.

Gratidão a todos!

## RESUMO

O câncer é a segunda causa de morte mais frequente no mundo, matando mais de 8 milhões de pessoas todos os anos; a incidência de câncer deve aumentar em mais de 50% nas próximas décadas. Embora avanços terapêuticos tenham sido alcançados, alguns tipos de câncer ainda apresentam altas taxas de mortalidade. Esses fatores impulsionam a pesquisa por fármacos alternativos. Este trabalho investigou a citotoxicidade e a indução de apoptose *in vitro* de um novo complexo de cobre denominado **(H04)** contra várias linhagens de células cancerígenas. Os resultados indicaram que esse complexo, apresentou atividade citotóxica proeminente contra as células cancerígenas testadas, sendo mais eficaz do que a cisplatina. O mecanismo de ação promovido pelo composto sugere a indução de morte celular por apoptose, devido ao padrão de fragmentação do DNA celular detectado em citometria de fluxo. O complexo também promoveu uma significativa perda do potencial de membrana mitocondrial, nas células leucêmicas, confirmando os resultados obtidos no estudo do ciclo celular. Os resultados obtidos demonstram que é consistente a hipótese de que o composto de coordenação de cobre apresenta relevante atividade citotóxica, se mostra como um candidato promissor na busca de complexos bioativos contra o câncer, e se mostra necessário realizar estudos mais aprofundados para melhor elucidar o mecanismo de ação do composto **(H04)**.

**Palavras –chave:** Câncer; Compostos de coordenação; Cobre.

## ABSTRACT

Cancer is the second most common cause of death in the world, killing more than 8 million people every year; the incidence of cancer is expected to increase by more than 50% in the coming decades. Although therapeutic advances have been achieved, some types of cancer still have high mortality rates. These factors drive the search for alternative drugs. This work investigated the cytotoxicity and the induction of apoptosis in vitro of a new complex of copper called (H04) against several strains of cancer cells. The results indicated that this complex showed prominent cytotoxic activity against the cancer cells tested, being more effective than cisplatin. The mechanism of action promoted by the compound suggests the induction of cell death by apoptosis, due to the fragmentation pattern of cellular DNA detected in flow cytometry. The complex also promoted a significant loss of the mitochondrial membrane potential, in the leukemic cells, confirming the results obtained in the study of the cell cycle. The results obtained demonstrate that the hypothesis that the copper coordination compound has relevant cytotoxic activity is consistent, shows itself as a promising candidate in the search for bioactive complexes against cancer, and shows that it is necessary to carry out more in-depth studies to better elucidate the mechanism. action of the compound (H04).

**Keywords:** Cancer; Coordination compounds; Copper.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Número estimado de casos de incidentes de 2018 a 2040, todos os cânceres, de ambos os sexos, de todas as idades.....	13
<b>Figura 2</b> - Mortalidade conforme a localização primária do tumor e sexo. MS / INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil (2020).....	14
<b>Figura 3:</b> Mortalidade conforme a localização primária do tumor e sexo. MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil (2020).....	15
<b>Figura 4</b> – Etapas da Oncogênese.....	18
<b>Figura 5 (a)</b> - Processo de divisão celular e os protooncogenes em células normais....	19
<b>Figura 5 (b)</b> – Processo de divisão celular e oncogene em célula cancerosa.....	20
<b>Figura 6</b> – Linha do tempo de descobertas de mortes celulares.....	21
<b>Figura 7</b> – Vias da Apoptose.....	23
<b>Figura 8</b> - Estrutura 3D da Cisplatina.....	27
<b>Figura 9</b> - Viabilidade Celular da linhagem U937 com tratamento de 48 horas em concentrações variadas .....	40
<b>Figura 10</b> - Viabilidade Celular da linhagem MDA-MB-231 com tratamento de 48 horas em concentrações variadas.....	41
<b>Figura 11</b> - Concentração Inibitória de 50% ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) da Cisplatina e do Cobre (II).....	43
<b>Figura 12</b> - Análise do ciclo celular por Subg1.....	45
<b>Figura 13</b> - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo 48horas.....	46
<b>Figura 14</b> - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da linhagem MOLT-4 tratada com o composto (H04).....	48



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -Determinação da concentração inibitória 50% dos compostos <b>(H04)</b> e <b>(H18)</b> frente às linhagens de células de origem cancerígenas.....	42
---	----

## LISTA DE ABREVEATURAS

- A549** – Linhagem de carcinoma de pulmão humano
- APAF-1** - Protease de ativação apoptótica de fator 1 (do inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*)
- B16-F10** - Linhagem celular murina estabelecida de melanoma metastático
- Bax**- BCL2 associated X protein
- Bcl-2** - B cell lymphoma 2
- Bid**- Interacting do main death agonist
- BxPC-3** – Linhagem de adenocarcinoma pancreático humano
- CDDP** – Cisplatina
- CDKs** - quinases dependentes de ciclina
- DMEM/F-12** - 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 desoxirribonucleico
- EROs**- Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)
- FADD** - Fas associado ao domínio de morte (do inglês, *Fas-Associated Death Domain*)
- FAS** - Receptor de morte celular
- FDA** – Food and Drug Administration
- IAP** – Inhibitor of Apoptosis Protein
- ICGC** - Consórcio Internacional do Genoma do Câncer (do inglês, *International Cancer Genome Consortium*)
- IC50** - Concentração inibitória necessária para matar 50 % da população celular
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
- IsopOH**– Isopropanol
- JC-1** - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
- MDA-MB231** – Linhagem de adenocarcinoma e mama humano
- MOLT-4** - Linhagem celular humana de leucemia linfóide aguda
- MOMP** – Permeabilização a membrana externa mitocondrial
- MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- PBS** - Tampão Salino Fosfato (pH 7,2) (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*)
- PC3**– Linhagem de adenocarcinoma próstata

**PI** - Iodeto de propídio

**SMAC/DIABLO** – *Second mitochondria-derived activator of caspases/direct*

**THP-1** - Linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda

**TNF** - Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis fator*)

**TRAIL** - Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF

**U937** - Linhagem celular humana de linfoma histiocítico

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

# SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVEATURAS .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 ESTIMATIVAS DO CÂNCER .....	13
2.2 O CÂNCER E OS ASPECTOS BIOQUÍMICOS .....	15
2.2.1 CÂNCER E METÁSTASE .....	17
2.2.2 CICLO CELULAR .....	19
2.2.3 MORTE CELULAR .....	21
2.3 TRATAMENTOS .....	25
2.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO .....	27
2.5 COMPLEXOS DE COBRE .....	28
2.6 A PESQUISA DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO E O LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO RECONHECER (LBR) .....	31
3 JUSTIFICATIVA .....	33
4 OBJETIVOS .....	34
4.1. OBJETIVO GERAL .....	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
5.1 CULTIVO CELULAR .....	35
5.2 DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS COMPOSTOS .....	35
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DA METABOLIZAÇÃO DO MTT .....	35
5.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	36
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	37
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
6.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS NA VIABILIDADE CELULAR MEDIADO PELA METABOLIZAÇÃO DO MTT. ....	38
6.2 AVALIAÇÕES DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO, COM A MARCAÇÃO DO IODETO DE PROPÍDIO (PI). ....	44
6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
7. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônico-degenerativa que há décadas se apresenta como um desafio para a saúde pública mundial. Muitos avanços terapêuticos foram alcançados desde a descoberta da cisplatina como fármaco padrão no tratamento contra cânceres dos variados tipos, entre outras estratégias associadas também. Entretanto, alguns tipos de câncer ainda apresentam altas taxas de mortalidade.

Considerado um termo genérico, o câncer caracteriza-se uma neoplasia maligna. Além disso, caracterizadas também, 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 o conhecimento sobre a fisiologia da célula cancerígena já esteja consolidado, as causas biológicas desse fenótipo ainda estão sendo elucidadas (LÓPEZ-LÁZARO, 2018; SINHA, 2018).

Há um número variado de descobertas de tipos de cânceres, os tipos mais comuns são os de mama e de próstata, apresentam uma boa estimativa de cura quando diagnosticados no estágio inicial. Em contrapartida, os de pulmão, estômago, fígado, esôfago, pâncreas, melanoma e leucemia apresentam elevados índices de mortalidade, o que impulsiona a pesquisa sobre esta patologia e a busca por novas estratégias terapêuticas para combatê-la (INCA, 2018).

Os compostos de platina, como a cisplatina (cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], a carboplatina e a oxiliplatina são os mais usados para o tratamento contra o câncer. Por outro lado, estudos mais recentes têm sido desenvolvidos com metais essenciais, como o cobre, já que se espera que o nível de toxicidade dos compostos derivados desses metais seja menor que o de metais não-essenciais, como a platina ou o ródio, já utilizados com sucesso como agentes terapêutico, mas que ainda apresentam efeitos colaterais (CERCHIARO *et. al.*, 2005) Deste modo, o comportamento bioinorgânico do cobre vem despertando grande interesse da comunidade científica nas últimas décadas, quando foram esclarecidos os detalhes estruturais e principalmente suas funções ligadas à proteínas e enzimas.

Existe um grande interesse no desenvolvimento de complexos que tenham alta afinidade pelo DNA e que sejam capazes de clivar sua dupla fita, servindo como potenciais agentes terapêuticos contra o câncer, doenças virais e ferramentas para biologia molecular (RUPESH, *et al.*, 2006 *apud* SILVEIRA, 2008). Desde modo, muitos complexos metálicos estão sendo testados com diferentes tipos de ligantes afim de, possuírem a característica de clivagem do DNA. O cobre tem sido um dos metais mais usados a fim de alcançar este objetivo. Ele apresenta um grande potencial já que sua reatividade frente a oxidantes como peróxido de hidrogênio parecer ser sítio-específica (LI, *et al.*, 2005).

Seguindo essa vertente de estudo, nosso grupo de pesquisa tem relatado resultados promissores de trabalhos que consistem na síntese, caracterização e investigação da atividade biológica de alguns compostos de coordenação com centros de cobre (II) (SILVA, *et al.* 2021; MACIEL, *et al.*, 2019; BORGES, *et al.*, 2016; FERNANDES, *et al.*, 2015), ferro (III) (SIQUEIRA, *et al.*, 2020; HORN, *et al.*, 2013), cobalto (II) (MORCELLI, *et al.*, 2016) e platina (II) (MOREIRA, *et al.*, 2019).

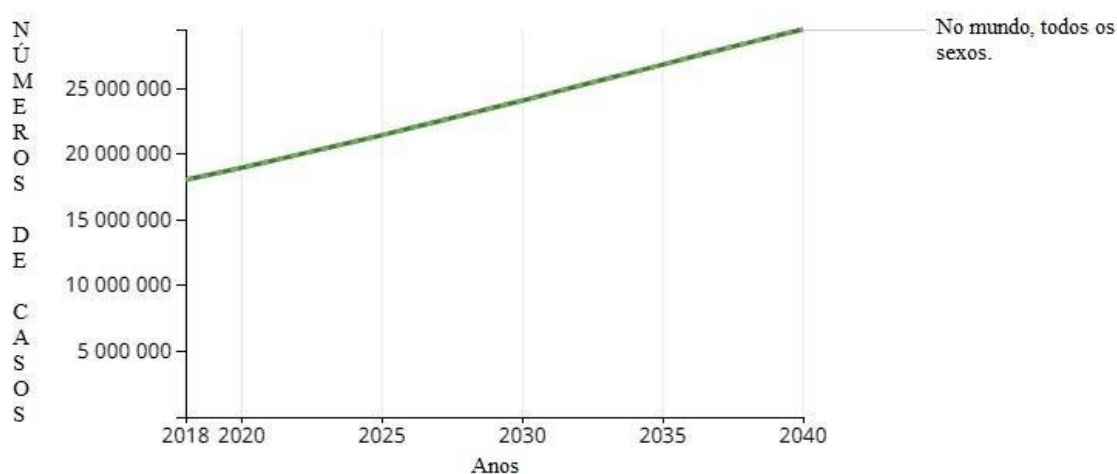
Desta maneira, a importância dos compostos de coordenação contendo metais e o crescente desenvolvimento, estimulam as buscas por novos compostos de coordenação que sejam mais eficientes, menos tóxicos e com potenciais aplicações terapêuticas futuras em câncer e outras áreas da medicina (MACIEL, 2019). Esta pesquisa então têm por objetivo principal a investigação de novos compostos de coordenação e seus efeitos biológicos no tratamento de câncer.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESTIMATIVAS DO CÂNCER

Cânceres afligem seres vivos multicelulares há mais de 200 milhões de anos, e há evidências de cânceres entre ancestrais dos humanos modernos, voltando bem mais de um milhão de anos (HAUSMAN, 2019). Médicos do Egito antigo (3000 a.C.) registraram doenças que, dadas suas características, provavelmente podiam ser classificadas como câncer. Hipócrates (377 a.C.) também descreveu enfermidades que se assemelhavam aos cânceres de estômago, reto, mama, útero, pele e outros órgãos (GARÓFOLO, 2004).

O câncer é uma das principais causas de morte mundial, prevê-se que o número de novos casos de câncer por ano aumente para 23,6 milhões até 2030 (IARC, 2019). Na projeção realizada pela organização mundial da Saúde (WHO, 2020), estima-se que em ambos os sexos, todos os tipos de cânceres em todas as idades poderão aumentar em até 30 milhões de casos até 2040, conforme a figura 1.



**Figura 1 - Número estimado de casos incidentes de 2018 a 2040, todos os cânceres, de ambos os sexos, de todas as idades.** Adaptado do *Global Cancer Observatory* (<http://gco.iarc.fr/>) (2020).

De acordo com Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva-INCA (2019), o câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. Os tipos de cânceres mais frequentes em homens, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, exceto o câncer de pele não



melanoma, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,5%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (INCA, 2020).

No Brasil, uma estimativa feita pelo INCA, explicita que poderão ocorrer 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. A estimativa revela que 309.750 óbitos no sexo masculino ocorrem em decorrência de algum tipo de neoplasia, de acordo com a **Figura 2**, e nas mulheres os números de óbitos em 2020, aconteceu em 107.235 casos, conforme apresentado na **Figura 3**. Sendo esses números provenientes, principalmente, dos Registros de Câncer e do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/MS).

- Em homens, Brasil, 2020

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	65.840	29,2
Cólon e Reto	20.540	9,1
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9
Estômago	13.360	5,9
Cavidade Oral	11.200	5,0
Esôfago	8.690	3,9
Bexiga	7.590	3,4
Laringe	6.470	2,9
Leucemias	5.920	2,6
Sistema Nervoso Central	5.870	2,6
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	225.980	<b>100,0</b>
Todas as Neoplasias	309.750	

**Figura 2: Mortalidade conforme a localização primária do tumor e sexo. MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil (2020).**

- Em mulheres, Brasil, 2018

Localização Primária	Óbitos	%
Mama	17.572	16,4
Traqueia, Brônquios e Pulmões	12.346	11,5
Cólon e Reto	9.995	9,3
Colo do útero	6.526	6,1
Pâncreas	5.601	5,2
Estômago	5.374	5,0
Sistema Nervoso Central	4.506	4,2
Fígado e Vias biliares intrahepáticas	4.369	4,1
Ovário	3.984	3,7
Leucemias	3.316	3,1
<b>Todas neoplasias</b>	<b>107.235</b>	<b>100,0</b>

**Figura 3: Mortalidade conforme a localização primária do tumor e sexo.** MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil (2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), na divulgação de relatórios coordenados alerta que, se números 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).

## 2.2 O CÂNCER E OS ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são designações para um conjunto de mais de 200 doenças que se desenvolvem progressivamente, a partir de qualquer tecido ou órgão, caracterizada principalmente, por uma proliferação desordenada, constituída por células transformadas, alta taxa metabólica, morfologia heterogênea, com alta capacidade de infiltração e disseminação (KUMAR *et al.*, 2014). Seus agentes de destruição são células humanas que, por assim dizer, desenvolveram alterações, e foram transformadas em patologias e posteriormente desencadeiam a formação de tumores (HAUSMAN, 2019).

Deste modo, o câncer pode ser considerado um termo genérico usado para designar um conjunto de doenças caracterizadas por expansão autônoma e disseminação de um clone somático (ICGC *et al.*, 2020). Os cânceres surgem de uma série de mutações ou alterações genômicas que fornecem à célula uma extensa capacidade de

evadir os sinais pró-apoptóticos e inibidores do crescimento e de ser autossuficiente em sinais de crescimento que permitem uma divisão infinita (BJAJ, 2020).

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 (CIVETTA, CIVETTA, 2011; VOGELSTEIN, KINZLER, 2004).

Alterações sofridas nos genes que codificam as proteínas p53, Rb, p16/CDKN2A e CDKN1B causadas por mutações, desencadeando a perda da regulação do ciclo celular. Em vista de que tais proteínas alteradas são imprescindíveis para que ocorra a proliferação celular exagerada, cujo resultado é uma massa anormal de tecido com alta capacidade de proliferação também denominada neoplasia (ZHANG; TANG; RYCAJ, 2018).

De acordo com Hanahan (2011), ao atingir esse comportamento, o clone do câncer deve se associar a várias vias celulares que lhe permitam desconsiderar as restrições normais ao crescimento celular, modificar o microambiente local para favorecer sua própria proliferação, invadir através de barreiras de tecidos, se espalharem para outros órgãos e evitar a vigilância imunológica. Assim, as alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Desta maneira, quando ativados, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas (NCI, 2019).

O processo de formação do câncer é denominado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere-se e dê origem a um tumor visível. Sendo assim, os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos são os responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor (INCA, 2019). O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, já que possui componentes que se enquadram nos três estágios de carcinogênese (ALMEIDA *et al.*, 2005).

As neoplasias (câncer *in situ* e câncer invasivo) correspondem à forma não controlada de crescimento celular e, na prática, são denominados tumores (INCA; SILVA, 2018). As neoplasias ou tumores são classificados em malignos ou benignos. Entretanto, câncer é a denominação genérica usada somente para tumores malignos, e

que originou-se devido a sua capacidade de invadir os tecidos vizinhos (UNICAMP, 2019).

As células tumorais possuem a capacidade de se desprenderem da massa tumoral formada e, ao serem transportadas através de vasos sanguíneos ou linfáticos, migrarem para órgãos distantes do local de origem, originando as metástases. A célula tumoral é, de forma geral, menos especializada funcionalmente que as suas células de origem. Os tecidos invadidos perdem suas funções conforme as células normais vão sendo substituídas pelas células transformadas, causando disfunções e falência do órgão invadido, podendo chegar, em casos mais severos, à morte do indivíduo (ROSAS *et. al.*, 2013; INCA, 2019).

As neoplasias benignas têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem definidos. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e os tecidos adjacentes (INCA; SILVA, 2018), permanecendo no local de origem, sem infiltrar ou invadir tecidos vizinhos ou provocar metástase para outros locais (UNICAMP, 2019).

As neoplasias malignas ou os tumores malignos manifestam um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte (INCA; SILVA, 2018). Segundo Terra (2016), a invasibilidade é uma característica das células cancerosas que permite à célula maligna se desprender do tecido, penetrar à corrente sanguínea ou os vasos linfáticos, levando à formação de tumores secundários, denominados metástases, em outros locais do corpo.

### **2.2.1 CÂNCER E METÁSTASE**

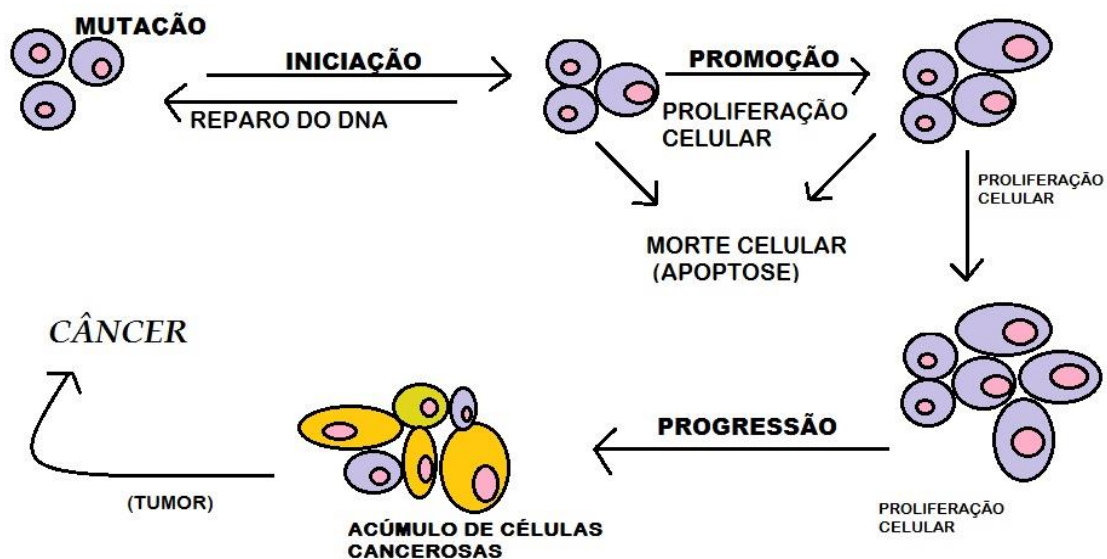
A metástase é uma etapa fundamental da progressão do câncer que indica um estágio mais avançado e um prognóstico pior. Vários processos celulares, incluindo a degradação da matriz extracelular (ECM), a transição epitelial-mesenquimal (EMT), angiogênese tumoral, o desenvolvimento de um microambiente tumoral inflamatório e a disfunção da maquinaria de MCP, foram demonstrados para ser essencial para a metástase do câncer (TALMAGDE *et al*, 2010).

De acordo com INCA (2008), a metástase é definida como o comprometimento à distância por uma parte do tumor que não guarda relação direta com o foco primário. A disseminação tumoral é um processo complexo e não de todo esclarecido, que pode ser dividido em cinco etapas:

- 1) invasão e infiltração de tecidos subjacentes por células tumorais, dada a permeação de pequenos vasos linfáticos e sanguíneos;
- 2) liberação na circulação de células neoplásicas, tanto isoladas como na forma de pequenos êmbolos;
- 3) sobrevivência dessas células na circulação;
- 4) sua retenção nos leitos capilares de órgãos distantes;
- 5) seu extravasamento dos vasos linfáticos ou sanguíneos, seguido do crescimento das células tumorais disseminadas.

Como descrito por Silva (2018), a oncogênese então é um processo composto por três estágios e exemplificado na **Figura 4**, sendo eles:

- Estágio de iniciação, no qual os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos.
- Estágio de promoção, no qual os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada.
- Estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula.



**Figura 4** – Etapas da Oncogênese. Da autora (2020).

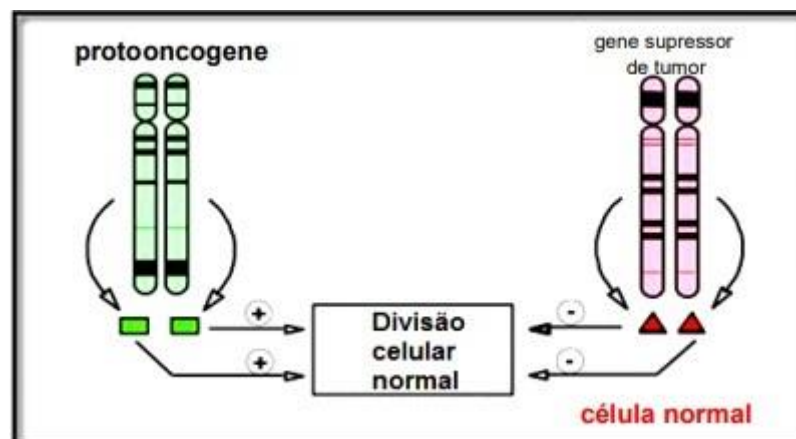
No estágio de progressão, já pode ser caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. De modo que, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença, assim os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são

chamados agentes onco-aceleradores ou carcinógenos (INCA, 2019). Quaisquer erros cometidos por uma célula metastática durante esses eventos celulares podem levar à morte celular. Portanto, a regulação da morte celular é crítica para as células cancerosas sobreviverem durante a metástase (TAMLMDGE *et al.*, 2010).

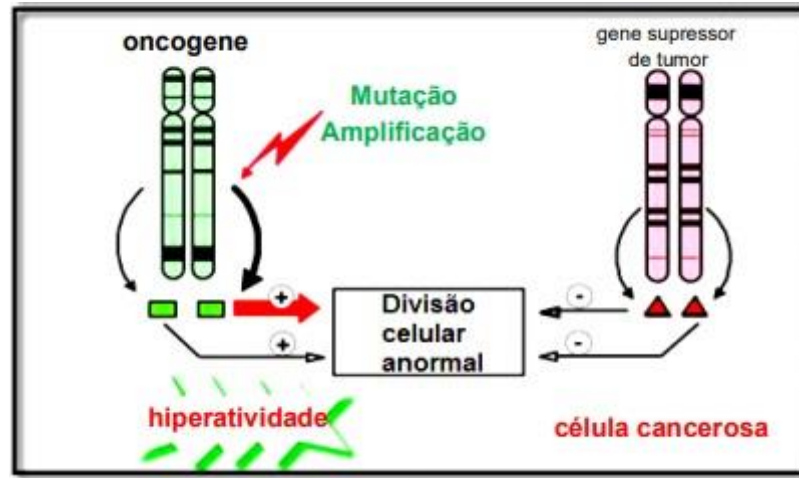
Além disso, para evitar a morte celular resultante do reconhecimento e destruição por linfócitos citotóxicos, como células assassinas naturais (NK), as células metastáticas devem desenvolver um mecanismo. As células tumorais devem sobreviver no ambiente de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelas células endoteliais ao cruzar o vaso ou a barreira do tecido durante a etapa de extravasamento (ECCLES; WELCH, 2007). Assim, as células malignas devem tolerar condições de hipóxia e proliferar em um ambiente sem as citocinas necessárias para o crescimento, a fim de atingir uma colonização bem-sucedida em seus locais de destino (AZAB *et al.*, 2013).

### 2.2.2 CICLO CELULAR

Os mecanismos que estão envolvidos no desenvolvimento de células malignas, sem sua maioria, têm interferência na divisão celular. Na fase G0 encontram-se as células que não estão sofrendo replicação. Deste modo, o DNA está super-enovelado e com baixa atividade nuclear (BOIM *et al.*, 2003 *apud* BULL, 2016). Posteriormente, a célula passa para a fase G1, etapa de preparação da célula para a multiplicação, com a síntese de constituintes essenciais para a nova célula gerada e preparação para a síntese do DNA, que acontecerá na fase S. Diversos mecanismos reguladores da multiplicação celular acontecem nas fases G1 e S. Produtos de oncogêneses ativam a multiplicação celular, enquanto que controles de retroalimentação (“*feedback*”), como demonstrado na **Figura 5 (a) e (b)**, como os genes supressores tumorais, detém a multiplicação celular quando danos no DNA são detectados (BOIM *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2010).



**Figura 5 (a)** - Processo de divisão celular e os protooncogenes em células normais. (Modificado por MAXWELL, 2020)



**Figura 5 (b)** – Processo de divisão celular e oncogene em célula cancerosa. (Modificado por MAXWELL,2020)

A checagem G2/M impede a entrada na fase mitótica se determinadas condições não forem identificadas, o tamanho das células e as reservas de proteína são avaliados, o papel mais importante deste ponto é garantir que todos os cromossomos tenham sido replicados e que o DNA replicado não seja danificado, caso os mecanismos de checagem detectarem problemas com o DNA, o ciclo celular é interrompido até completar a replicação do DNA ou repará-lo (NEPOMUCENO, 2017). Após a separação da célula mãe (citocinese), o ciclo de replicação celular é finalizado, com o retorno para a fase G0. Desta maneira, uma célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular, passando da fase M diretamente para uma nova fase G1 1 (BOIM *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2010).

O gene Tp53 é o gene conhecido por ser o supressor tumoral mais frequentemente alterado em tumores malignos. Ele é responsável pela codificação da proteína p53, por ser regulador do ciclo celular. (NOVÁK *et al.*, 2002; VERMEULEN *et al.*, 2003). Como supressor de tumor, regula a parada do ciclo celular, senescência e apoptose (LOWE, 1993). Essas são ações comuns da p53 para evitar transformações oncogênicas e ocorrência de tumores. Nas células em repouso, a atividade transcricional da p53 é fortemente controlada pela proteína ligase da ubiquitina E3, MDM2, levando à degradação da p53 e à rápida renovação (OLIVEIRA, 2020).

Segundo Oliveira (2020), a p53 é composta por três domínios, um domínio de transativação do terminal N (TAD, resíduos 1 a 70), DBD (resíduos 94 a 293) e um

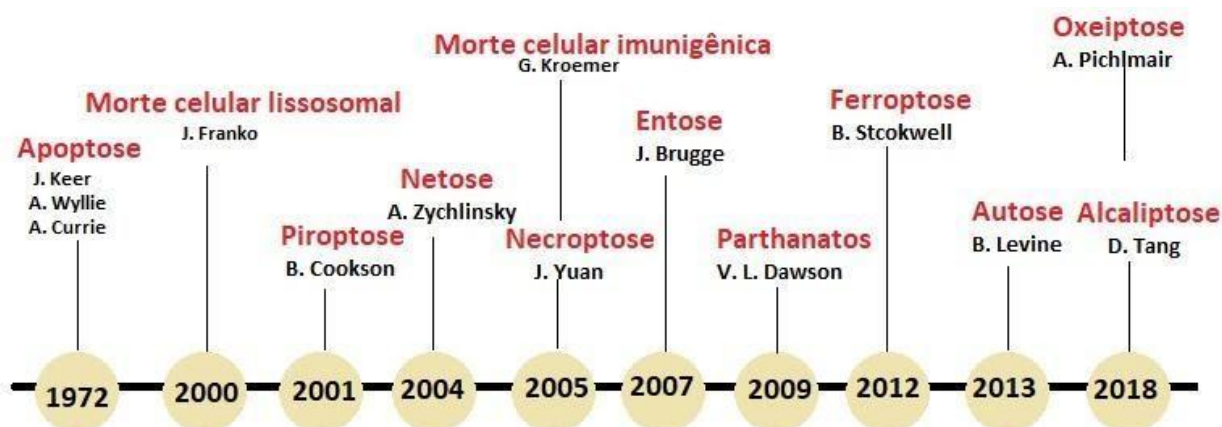


domínio de oligomerização (OD, 324 a 355) O *TP53* é um dos genes mais frequentemente mutados no câncer humano, com a maioria das alterações ocorrendo na região codificando o domínio de ligação ao DNA (DBD) (JOERGER, 2016).

Uma das principais características das células cancerígenas é ignorar os pontos de checagem e outros meios de verificação da qualidade do ciclo celular. Além disso, podem se dividir muitas vezes mais do que uma célula normal do corpo. Assim, o tumor se forma a partir da proliferação e crescimento anormal dessa célula. (STIVAROU; PATSAVOUDI, 2015). Portanto falhas na execução dos mecanismos de morte celular asseguram a manutenção e a propagação do fenótipo alterado das células cancerosas (BRAY *et al.*, 2018).

### 2.2.3 MORTE CELULAR

A observação científica da morte celular programada (MCP) começou historicamente em 1842, quando Karl Vogt estudava o desenvolvimento de girinos. No entanto, o aumento na pesquisa em MCP só começou quando o termo “apoptose” foi cunhado em 1972 por John Kerr, Andrew Wyllie e Alastair Currie (KERR, 1972). Desde então, vários estudos vem sendo desenvolvido a fim de descobrir novos mecanismos de morte celular, conforme apresentado na **Figura 6**.



**Figura 6** – Linha do tempo de descobertas de mortes celulares. (Modificado de TANG, 2019).

A morte celular é definida por uma sucessão de eventos e é difícil estabelecer qual fator causa a irreversibilidade da lesão. Agentes nocivos agem sobre as células causando danos reversíveis ou irreversíveis (morte celular). A produção de lesões



reversíveis ou não vai depender da natureza do agente indutor da intensidade e duração da agressão (FILHO, 2006).

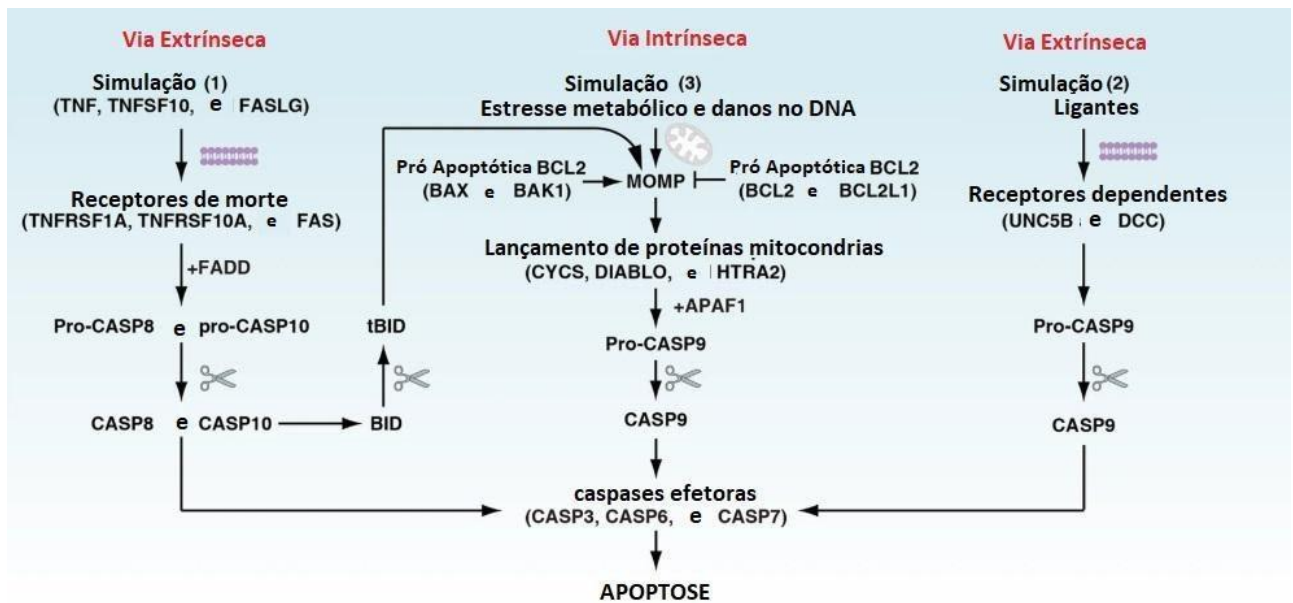
Durante muito tempo, acreditava-se que a morte celular era um processo passivo de caráter degenerativo, o que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento, em consequência disso, a célula pode alterar sua integridade da membrana plasmática e aumentar o seu volume, perdendo as suas funções metabólicas. Entretanto, os organismos multicelulares possuem a capacidade de induzir MCP como forma de resposta a estímulos intracelulares ou até mesmo extracelulares (GRIVICICH, 2007).

Segundo García (2012), o mecanismo apoptótico é essencial para o desenvolvimento natural celular, o equilíbrio homeostático entre a proliferação celular e a taxa de morte celular é um fator fundamental para a manutenção dos processos fisiológicos normais. De acordo com Hengartner (1992), sua desregulação está subjacente a vários processos patológicos e fisiológicos, incluindo homeostase celular, remodelação tecidual e tumorigênese.

Além disso, a MCP pode ser vista como barreiras naturais que restringem as células malignas de sobreviver e se disseminar. No entanto, as células cancerosas desenvolvem várias estratégias para evitar a morte celular programada, gerando mutações genéticas ou modificações epigenéticas nos principais moduladores das vias de morte celular programada (ZHENYI SU *et al*, 2015). A desregulação deste processo é uma das características do desenvolvimento e progressão do câncer, além disso, muitas células cancerígenas exibem resistência significativa à sinalização que afetam alguns níveis da cascata apoptótica (HENGARTNER, 1992).

Além de alterações morfológicas, a apoptose apresenta algumas alterações bioquímicas como a externalização de fosfatidilserina, que permite o reconhecimento por fagócitos sem a liberação de componentes pró-inflamatórios, clivagem do DNA realizado por endonucleases promovendo a fragmentação do DNA, e ativação das caspases. As caspases ativadas clivam inúmeras proteínas vitais e acabam com a integridade do núcleo e do citoesqueleto (WONG, 2011). Considerando-se a importância do processo de morte celular, torna-se possível inferir que mudanças na relação entre as taxas de sobrevivência e morte celular podem trazer consequências significativas para o organismo, sendo um exemplo o aparecimento de doenças como o câncer (PEIXOTO *et al*, 2017).

Segundo Taylor (2008), a ativação da apoptose pode ocorrer por meio de duas vias moleculares distintas, a via extrínseca ou do receptor da morte ou através da via intrínseca ou mitocondrial, ambas as vias levam à ativação de uma família de proteases de cisteína denominadas caspases, conforme ilustrado na **Figura 7**.



**Figura 7** – Vias da Apoptose. (Modificado de TANG, 2019).

As caspases correspondem a uma família de proteases sintetizadas na célula como precursores inativos, denominadas de pró-caspases (zimogênio), que após sofrerem clivagem proteolítica promovem a iniciação e regulação do processo apoptótico (TAN *et al.*, 2014).

A via intrínseca (ou mitocondrial) é ativada através de estímulos internos como o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, ausência de fatores de crescimento, danos ao DNA, bloqueadores de componentes do citoesqueleto, drogas quimioterapêuticas, estresse oxidativo, dentre outros fatores que alteram a fisiologia celular. Em resposta a estes estímulos, ocorre alteração do potencial e permeabilização mitocondrial, com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c e de endonucleases oriundas do espaço mitocondrial, além da produção substancial de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta via é modulada pela família Bcl-2 de proteínas pró e anti-apoptóticas de morte celular, que participam ativamente da regulação da apoptose (WONG, 2011).

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

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

Considera-se também a autofagia como um processo catabólico conservado evolutivamente no qual as estruturas da membrana intracelular empacotam complexos de proteínas e organelas para degradar e renovar esses componentes citoplasmáticos. É, portanto, crítico para a regulação do crescimento celular e homeostase interna (BOYA, 2013).

Nesta perspectiva, a autofagia é um processo de várias etapas que inclui nucleação, alongamento e autofagossomo e formação de autolisossomo e que é executado por uma série de genes altamente conservados denominados genes relacionados à autofagia (ATGs) (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011). As alterações na maquinaria autofágica podem levar a diversas condições patológicas, como neurodegeneração, envelhecimento e câncer (ZHENYI SU *et al.*, 2015).

Em contrapartida, a necrose denomina-se como um tipo de morte celular não fisiológica, causada por fatores externos. Ela também é considerada uma resposta celular a respostas 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 ao agravo 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).

Já são estudados também, outros tipos de morte, com base em suas características moleculares, com orientação fisiológica (como necroptose e piroptose, que são observadas durante o desenvolvimento e / ou no contexto de infecções virais), enquanto outras (como ferroptose, morte celular netótica e entótica, partanatos, morte celular dependente de lisossomo, morte celular dependente de autofagia, alcaliptose e oxeiptose) (TANG, 2019).

Em se tratando de câncer, a via apoptótica é uma das mais estudadas. De acordo com Kasiri (2019), supõe-se que o câncer seja um exemplo da desregulação do ciclo celular, com proliferação excessiva de células e / ou redução da remoção de células. Desta maneira, o defeito de apoptose durante a carcinogênese possui um papel vital no desenvolvimento, progressão e resistência às terapias antitumorais dos vários tipos de câncer.

Diante disso, uma possível investigação dos defeitos na maquinaria apoptótica pode resultar no desenvolvimento de novas abordagens de tratamento visando as vias apoptóticas de morte celular (KASIRI, 2019).

## **2.3 TRATAMENTOS**

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, merecendo cada vez mais pesquisas com a finalidade de obter melhor qualidade e humanização na assistência aos pacientes com essa doença.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2019), os tratamentos mais frequentemente adotados na terapia oncológica são: quimioterapia, radioterapia e a cirurgia sendo o planejamento do tratamento sendo orientado pelo tipo de tumor, estágio e recursos disponíveis. Deste modo, é necessária uma ação acelerada para melhorar os tratamentos para que se obtenham melhores metas a fim de reduzir as mortes por câncer.

Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. De acordo com INCA (2019), A cirurgia oncológica é um tipo de tratamento do câncer que consiste na retirada do tumor através de excisões no corpo do paciente, deste modo, quando indicada, sua intenção é remover totalmente o tumor. O câncer em sua fase

inicial pode ser controlado, ou mesmo curado, através do tratamento cirúrgico, atualmente considerado um dos tripés para o tratamento da doença, ao lado da quimioterapia e da radioterapia.

A radioterapia é um tratamento contra o câncer que utiliza altas doses de radiação para matar células cancerígenas ou reduzir o tamanho do tumor. Segundo INCA (2019), a radioterapia pode ser dividida em dois tipos:

- **Radioterapia externa ou teleterapia:** O tratamento com radioterapia consiste na irradiação de áreas do corpo que são previamente demarcadas. Essa abordagem pode ser curativa, pré-operatória, pós-operatória, pós-quimioterapia ou paliativa que consiste em antiálgica e anti-hemorrágica.
- **Braquiterapia:** aplicadores são colocados pelo médico, em contato ao local a ser tratado, e a radiação é emitida do aparelho para os aplicadores. Esse tratamento é feito no ambulatório (podendo necessitar de anestesia), de uma a duas vezes por semana.

A quimioterapia é um tipo de tratamento em que se utilizam medicamentos para combater o câncer, os mesmos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo, também, que se espalhem (INCA, 2019). A maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando também as células normais, particularmente aquelas de rápido crescimento, como as da mucosa gastrointestinal, capilares e do sistema imunológico, acarretando diversos efeitos colaterais (MAXWELL, 2020).

No tratamento de câncer mediado pela quimioterapia, uma das grandes limitações são os frequentes efeitos colaterais. Embora os fármacos com ação antitumoral sejam produzidos especificamente contra células cancerígenas, células hematopoiéticas e células epiteliais intestinais normais, e os queratinócitos da matriz capilar são frequentemente suscetíveis aos efeitos tóxicos desses agentes, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (ALMEIDA *et al*, 2005 *apud* BORGES, 2008).

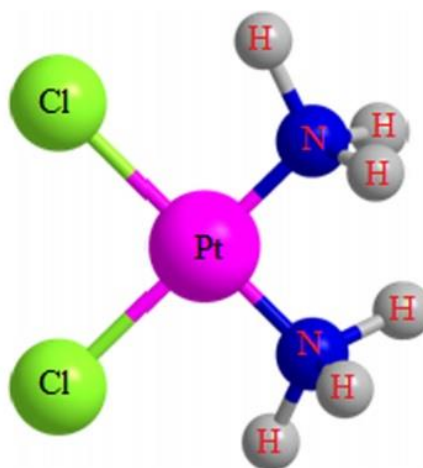
De acordo com Borges (2008), “o desenvolvimento de quimioterápicos com ações sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação é importante do ponto de vista clínico, pois estes agentes são muito estudados e clinicamente empregados”. A quimioterapia é possivelmente a terapia oncológica que pode ser mais explorada, uma vez que podem ser testadas a capacidade de indução de morte celular de inúmeros compostos químicos.

## 2.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO

A química inorgânica medicinal apresenta como ferramenta principal compostos de coordenação, com os quais metalofármacos são produzidos utilizando-se as características peculiares de íons metálicos. Nessa produção, as moléculas orgânicas apresentam função importante, podendo limitar as consequências tóxicas dos metais (BRUIJNINCX; SADLRER, 2008).

De acordo com Sadlrer (2008), a inserção de metais de transição nas estruturas de moléculas candidatas a fármacos, pode conferir-lhes determinadas propriedades inusitadas com relação aos seus análogos puramente orgânicos, como acidez de Lewis, magnetismo, atividade redox, luminescência, entre outros. Ademais, os íons metálicos apresentam números de coordenação, preferências estereoquímicas e reatividade que dependem da sua carga, tamanho e estrutura eletrônica, tornando-os uma plataforma única para o planejamento de novos fármacos com conceitos muito diferentes daqueles usados para moléculas orgânicas (COHEN, 2007).

A cisplatina foi sintetizada pela primeira vez por M. Peyrone em 1844 e sua estrutura química, **Figura 8**, foi elucidada por Alfred Werner em 1893 (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). A cisplatina é clinicamente comprovada para combater diferentes tipos de câncer, incluindo sarcomas, cânceres de tecidos moles, ossos, músculos e vasos sanguíneos (DESOIZE; MADOULET, 2002).



**Figura 8:** Estrutura 3D da Cisplatina. (GOSH, 2019).

O DNA é o principal alvo da cisplatina para mostrar atividade anticâncer (CARA; RABIK; DOLAN, 2007). A platina mono ou di-hidratada inserida no núcleo é

vulnerável o suficiente para reagir com bases de DNA (GOSH, 2019). Ao se ligar ao DNA genômico ou DNA mitocondrial, o fármaco cria lesões no DNA, bloqueia a sua produção e, conseqüentemente, a produção de proteínas. Dessa forma, interrompe a replicação do material genético, o que ativa as vias de morte celular (JORDAN; CARMOFONSECA, 2000).

Devido ao uso clínico bem-sucedido de cisplatina, muitos derivados deste composto foram sintetizados e suas atividades citotóxicas testadas. Na década de 90, foram aprovados para amplo uso os fármacos de segunda e terceira geração derivados desse metal, a carboplatina e a oxaliplatina, respectivamente. Tais fármacos são amplamente utilizados no tratamento clínico de diferentes tumores (JOHNSTONE, 2016). Apesar do desenvolvimento de efeitos colaterais, a cisplatina e seus análogos, é a droga que está entre os anticânceres, mais utilizadas na clínica médica. (ANUP *et al.*, 2017). Efeitos colaterais esses, podem-se destacar: a nefrotoxicidade, a neurotoxicidade e a ototoxicidade. Outro problema ainda apresentado é a quimiorresistência adquirida por alguns tumores a esse medicamento (DILRUBA, KALAYDA, 2016; PERES, CUNHA, 2013).

Nessas perspectivas, há motivações para o desenvolvimento de novos compostos mais eficazes e menos tóxicos no tratamento do câncer (FREZZA, 2010). Considerando o grande potencial farmacológico dos compostos de coordenação, há uma grande variedade de pesquisas sendo conduzidas ou que já foram concluídas, dentre as quais se destacam os complexos de platina, paládio, rutênio, rênio, cobalto, zinco, vanádio, gálio e cobre (PAIXÃO, 2017).

Muitos complexos metálicos relatados como agentes anticâncer atuam por um mecanismo oxidativo que envolve espécies reativas de oxigênio ROS, em um processo modulado pelo ligante responsável por alterações na carga, potencial redox e geometria ao redor do metal, afetando diferentes organelas (QUIU, 2019).

Assim, a descoberta do potencial terapêutico de complexos com outros centros metálicos além da platina, são alvos na pesquisa de novos fármacos antitumorais que sejam mais potentes, seletivos e menos tóxicos ao organismo.

## **2.5 COMPLEXOS DE COBRE**

Inspirado no sucesso da cisplatina como um agente anticâncer inorgânico eficaz, pesquisas para o desenvolvimento de novos complexos anticâncer baseados em um metal com ligantes funcionais estão ainda em ascensão. O cobre é um nutriente

essencial para a matéria viva. Por meio de suas pró enzimas, o cobre exibe uma variedade de funções metabólicas (ABDEL; OEHME, 1990). Sendo um elemento essencial e devido a característica endógena do íon, a atividade antitumoral dos complexos de cobre tem gerado grande interesse na busca por novos agentes quimioterápicos, com o objetivo de aplicações médicas, devido à sua bioatividade e atividade redox significativas (SUN *et al*, 2011; DUCAN *et al*, 2012).

Acredita-se que complexos bioativos com este metal, poderiam induzir uma maior resposta citotóxica em células neoplásicas em relação às células não tumorais, isto devido ao seu intenso metabolismo celular e a sua alta demanda de ATP requeridos pelo transporte de nutrientes (BHATTACHARJEE; CHAKRABORTY; SHUKLA, 2017) Deste modo, este fato poderia inibir o processo de proliferação celular (DENOYER, 2015).

Existem muitas pesquisas sobre os complexos de cobre, nas quais explicitam o seu potencial para auxiliar no tratamento de uma grande variedade de doenças como, por exemplo, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, tuberculose, câncer e com o potencial de regular o cobre corporal através de uma variedade de mecanismos (CARVALHO, 2018).

De acordo com Crouch (2009), os complexos bis (tiossemicarbazonato) cobre (II) também já foram investigados como um agente terapêutico eficaz para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, além disso, tais complexos inibem fortemente a fosforilação oxidativa e a síntese de DNA. São bem conhecidos também por manifestarem citotoxicidade principalmente através da geração de espécies reativas de oxigênio.

Entre os metais de transição, o cobre pode ser uma alternativa à platina (NG, 2014), pois desempenha um papel dinâmico na quimioterapia do câncer. Como resultado, muitas terapias com cobre foram desenvolvidas, algumas das quais estão sendo testados como potenciais novos agentes anticâncer (MACPHERSON, 2007).

De acordo com Massoud (2018), os complexos de cobre foram introduzidos nessa área com base no pressuposto de que, por ser um elemento essencial para a vida, pode ser menos tóxico em comparação com outros complexos metálicos usados. O cobre desempenha um papel crucial na bioquímica das células (TABTI, 2017), exercendo um papel vital em muitas atividades fisiológicas de diferentes tecidos e órgãos, além de atuar como co-fator de várias enzimas.



Como os complexos de cobre (I / II) são redox ativos, frequentemente lábeis e atípicos em sua preferência por geometrias de coordenação distorcidas, eles são muito menos previsíveis estruturalmente do que outros complexos de metais de transição de primeira linha (SANTINI, 2014). Vários compostos de cobre mostram propriedades antitumorais promissoras em estudos *in vitro* e *in vivo* (SANTINI, 2014; DENOYER, 2018; MACIEL *et al.*, 2020).

Segundo Muhammad (2019), o mecanismo primário anticâncer dos complexos de Cu (II) é a geração de espécies reativas de oxigênio ROS intracelulares, por redução de Cu (II) para Cu (I). As espécies reativas de oxigênio são metabólitos de O<sub>2</sub> altamente reativos, gerados na membrana interna das mitocôndrias e liberados em o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial (HAN, 2001).

As espécies reativas de oxigênio consistem em hidroxila radicais (HO •), radicais superóxido (O<sub>2</sub> • -) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e atuam como reguladores e mensageiros secundários em várias vias de sinalização celular, incluindo autofagia mediada por ERO e apoptose (MUHAMMAD e GUO, 2014).

De acordo com Deni (2018), interação de DNAs com pequenas moléculas foi alcançada como um elo importante na concepção de agentes quimioterapêuticos, para bloquear a etapa de replicação no ciclo celular. Desta maneira, moléculas pequenas, incluindo vários metais complexos, juntamente com diferentes ligantes, foram examinados para identificar sua afinidade pelo DNA, e posteriormente avaliados suas atividades anticâncer com várias linhagens celulares.

Outro estudo explicita que os complexos de cobre (II) à base de tiossemicarbazona contendo fração antraceno que interagem fortemente com o DNA e exibem uma atividade anticâncer notável contra a linhagem de células cancerígenas HeLa (KATE, 2014). Também demonstraram efeitos sobre as linhagens cancerígenas humanas (MOLT-4, MCF-7, A-549 e SK-II), bem como em fibroblastos normais (SANTINI, 2014).

Segundo Mahendiran (2018), foram relatados que os complexos de cobre (I) fosfina, mostram propriedades citotóxicas e antiangiogênicas significativas e induzem uma redução acentuada da massa tumoral *in vivo* sem perda significativa de peso corporal e com efeito adverso menos acentuado do que a cisplatina. Além disso, já foi relatada que os complexos de Cu podem ser usados como inibidores de proteassoma específicos de tumores e indutores de apoptose, visando a via da ubiquitina-proteassoma (UPP) (ZHANG, 2016).

Desta maneira, os complexos de cobre (II), são considerados agentes antitumorais promissores e têm atraído considerável importância devido à sua capacidade de interagir diretamente com o DNA/proteínas nucleares. Exibem sua atividade anticâncer ativando múltiplas vias, como a inibição da síntese de DNA e RNA e a interrupção da produção de ATP (PALANIMUTHU, 2013).

## **2.6 A PESQUISA DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO E O LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO RECONHECER (LBR)**

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

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

Na dissertação “Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica dos compostos de coordenação de cobalto e de ferro” de Paula Siqueira (2020), ao comparar a citotoxicidade dos compostos de cobalto e de ferro, foi possível observar que o complexo de ferro apresentou maior efetividade. Dentre os valores de IC<sub>50</sub> apresentados, o composto demonstrou os melhores resultados em linhagens humanas de leucemia linfóide aguda (MOLT-4), apresentando a IC<sub>50</sub> de  $4,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ; de câncer de pâncreas (BxPC-3) com IC<sub>50</sub> de  $10,19 \pm 1,1 \mu\text{M}$ . Além disso, os resultados da avaliação do ciclo celular (Sub-G1), potencial de membrana mitocondrial (JC1) e microscopia indicam que o Fe  $\alpha$ BMPA induz morte celular por apoptose nas linhagens celular humana de leucemia linfóide aguda e de adenocarcinoma pancreático (SIQUEIRA, 2020).

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

Recentemente, outra pesquisa realizada por Silva (2020), os estudos adicionais, quantitativos e qualitativos, com o complexo de cobre sugeriram a indução de morte celular apoptótica, pela ativação das vias intrínseca e extrínseca, em células BxPC-3. Além disso, quando realizada a avaliação da toxicidade aguda do complexo de cobre *in vivo* mostrou um excelente perfil de segurança em camundongos Balb/c nude.

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

### 3 JUSTIFICATIVA

A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional. Há uma projeção realizada pela organização mundial da Saúde (WHO, 2020), estima-se que em ambos os sexos, todos os tipos de cânceres em todas as idades poderá aumentar em até 30 milhões de casos até 2040.

O sucesso da cisplatina no tratamento clínico de vários tipos de neoplasias colocou a química de coordenação de drogas à base de metal na linha de frente na luta contra o câncer (SANTINI, 2014). Embora seja altamente eficaz no tratamento de uma variedade de cânceres, os efeitos colaterais e resistência a medicamentos são os dois desafios inerentes à cisplatina que limitam sua aplicação e eficácia. (GHOSH, 2019).

Desta maneira, a busca de novos compostos de coordenação à base de metal tornou-se mais frequente, a fim de descobrir novos compostos que possam atuar no tratamento do câncer e que venha ser menos citotóxico aos pacientes.

Em vista disso, o cobre é um elemento essencial para a maioria dos organismos aeróbicos, empregado como cofator estrutural e catalítico, e conseqüentemente, está envolvido em muitas vias biológicas. Deste modo, muita atenção foi dada à pesquisas sobre os mecanismos de absorção e distribuição do metabolismo e excreção de cobre, bem como sobre seu papel no desenvolvimento de câncer e outras doenças (SANTINI, 2014). Além disso, complexos de cobre têm sido estudados e apresentam potenciais propriedades terapêuticas como ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e anticancerígena (BOULSOURANI, *et al.*, 2017; SHOBHA DEVI, *et al.*, 2018).

Neste contexto, o nosso grupo vem testando a atuação de complexos metálicos de cobre, ferro, zinco, cobalto, gálio e platina com resultados preliminares promissores, exibindo atividade antineoplásica *in vitro* como também *in vivo* (MORCELLI *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2019; MACIEL *et al.*, 2020). Assim, faz-se pertinente a avaliação deste tipo de composto de coordenação, contribuindo para o desenvolvimento e a pesquisas de novas drogas para o tratamento da doença.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

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

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade citotóxica contra células cancerígenas dos complexos (**H04**) e (**H18**) por meio de ensaio de MTT;
2. Determinar a concentração inibitória 50% ( $IC_{50}$ ) dos compostos testados frente às linhagens celulares MOLT-4 (leucemia linfóide aguda), U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), PC3 (carcinoma de próstata humano), MDA-MB- 231 (adenocarcinoma de mama), A549 (adenocarcinoma de pulmão) e B16F10 (Melanoma Murino).
3. Investigar o tipo de morte celular induzido pelos compostos de cobre (**H04**) e de platina (**H18**).

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 CULTIVO CELULAR**

As linhagens celulares utilizadas na pesquisa foram MOLT-4 (leucemia linfóide aguda), U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), PC3 (carcinoma de próstata humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), A549 (adenocarcinoma de pulmão) e B16F10 (Melanoma Murino) procedentes do banco de células do RJ (BCRJ). Para a realização do cultivo celular, as células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco, BRL), incubadas em estufa (Forma Scientific, Inc, Modelo 3159 S/N 33808-427) a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub> atmosfera umidificada, sendo tripsinizadas ao alcançar confluência maior que 70 %.

### **5.2 DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS COMPOSTOS**

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

### **5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DA METABOLIZAÇÃO DO MTT**

As linhagens celulares, descritas em 5.1., foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular realizado de acordo com a metodologia descrita por (MOSMANN, 1983). Esta técnica tem por objetivo avaliar a metabolização do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltretazólio) por meio da formação de compostos coloridos de formazan. As células neoplásicas foram semeadas em placas de 96 poços com o volume de 100 µL/poço com células na concentração de 2x10<sup>5</sup> células/mL, incubadas por 2 horas tratadas, com o composto de interesse, em concentrações seriadas especificadas no item 6.

As placas experimentais foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C, com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após este período, foram adicionados 20 µL de MTT (5,0 mg/mL) para cada 100 µL de cultivo e a placa foi incubada por quatro horas. Após esse período, 170 µL do

sobrenadante de cada poço foi retirado e a eles adicionados 120  $\mu\text{L}$  de uma solução de isopropanol contendo 0,04 % de HCl concentrado, seguido da homogeneização dos poços para desfazer os cristais. Posteriormente, a placa foi centrifugada (centrífuga SORVALL®, modelo RT-7) a 1.500 rpm por 5 min. e em seguida 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços. A leitura dos valores de absorvância das amostras realizou-se em espectrofotômetro (EPOCHTM, BioTax® Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 570 nm.

#### **5.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Nos estágios tardios da morte celular por apoptose, o DNA é clivado pelas endonucleases em fragmentos de 200 pares de bases ou múltiplos. Durante o processamento das amostras, como descrito no item 4.3, o DNA fragmentado é removido e as células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região de Sub-G1 do histograma (GONG *et al.*, 1994). A presença da população celular na região do sub-G1 pode ser considerada como morte celular por apoptose. Sendo assim, para a avaliação do ciclo celular foram semeadas, em garrafas de cultura de 25  $\text{cm}^3$ , 3mL de células da linhagem experimental, selecionada no ensaio de MTT, ( $2 \times 10^5$  células/mL) incubadas por 4 horas. Após esse período, foram adicionados 3mL do tratamento contendo o composto, selecionado no ensaio de MTT, diluído em meio DMEM/F-12 suplementado (Gibco, BRL), nas concentrações de  $1 \times \text{IC}_{50}$  e  $2 \times \text{IC}_{50}$ , como determinado no ensaio de MTT. As garrafas experimentais foram incubadas por 12, 24 e 48 horas em estufa ( $37^\circ\text{C}$ , 5 % de  $\text{CO}_2$  e 37 umidade controlada). O controle branco foi realizado com 3mL de células ( $2 \times 10^5$  células/mL) e 3mL e meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) suplementado. O controle positivo foi obtido ao incubar 3mL de células ( $2 \times 10^5$  células/mL) e 3 mL de cisplatina (10  $\mu\text{M}$ ) diluído em meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) suplementado. Após o período de incubação, o conteúdo de cada garrafa (6mL) foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado por 5 min. a 10.000 rpm. O *pellet* obtido foi ressuspensão em PBS 1X, transferido para microtubo de centrifugação e centrifugado por 5 min. a 10.000 rpm. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Depois de lavado em PBS 1X, foi adicionado lentamente ao *pellet* 1mL de etanol 70 % gelado e as células submetidas à fixação por 30 min. a  $4^\circ\text{C}$ . Após o período de fixação, as células foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. e o *pellet* formado foi lavado com tampão fosfato-citrato (0,2 M, pH 7,8) e centrifugados por 5 min. A

10.000 rpm em cada lavagem. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado foi adicionado 1mL do tampão final (RNase a 100 µg/mL), iodeto de propídio (50 µg/mL) e tampão fosfato-citrato) em seguida as células foram incubadas a 37 °C, por 30 min. protegido da luz.

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

## **5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO**

A linhagem (MOLT-4) foi tratada e incubada como descrito no item 4.4. Após o período de incubação o conteúdo de cada garrafa (6mL) foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado por 5 min. a 2.200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* adicionados 500µL de solução de JC-1 (Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (25 µg/mL, Sigma) diluídos em meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL). As células, depois de ressuspensas, foram incubadas por 15 min. em estufa (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>). A seguir, as células em suspensão foram submetidas a centrifugação por 5 min. a 2.200 rpm e lavadas duas vezes com 1mL de meio de cultura DMEM/F-12 (Gibco, BRL) não suplementado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido ressuspense em 500µL de meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) não suplementado. A leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur™, modelo 342973). Os gráficos Dot-plot da porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

## **5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O programa GraphPadPrism versão 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas. Nos testes de análise de citotoxicidade dos compostos foi realizado o teste estatístico One-way ANOVA.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS NA VIABILIDADE CELULAR MEDIADO PELA METABOLIZAÇÃO DO MTT.

O alto índice mundial de novos números de casos e de mortalidade causada pelo câncer tem ocasionado uma intensa busca por novos agentes com atividade antineoplásica por parte da indústria farmacêutica e instituições de pesquisa nas últimas décadas. Fármacos que possam promover um tratamento mais eficaz e com efeitos colaterais menos severos que os apresentados pelo uso clínico atualmente, são fortes candidatos a agentes antineoplásicas (SILVA, 2020). Neste trabalho, foram testados os efeitos citotóxicos do composto de coordenação de cobre (**H04**), do composto de platina (**H18**) e do ligante (**H03**). A cisplatina, fármaco convencional utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, também foi utilizada como controle positivo dos experimentos.

A atividade citotóxica dos complexos estudados foi analisada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo tetrazólico), que avalia a função celular à nível mitocondrial (MOSMANN, 1983). Foi avaliada a atividade citotóxica *in vitro*, a fim de determinar as concentrações necessárias dos compostos capazes de induzir a morte celular em 50% das células de origem neoplásicas (IC<sub>50</sub>). Neste ensaio foram avaliadas as seguintes linhagens celulares de câncer humano: U937, MOLT-4, THP-1, MDA-MB231, A549, PC3, bem como, a linhagem celular de melanoma murino B16-F10. Foram realizados em três eventos independentes para cada linhagem, realizados em triplicatas e os valores de IC<sub>50</sub> expressos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . O controle branco baseou-se na incubação das células apenas com meio de cultura DMEM/F-12. O controle positivo foi realizado com a cisplatina diluído em meio de cultura nas mesmas condições dos compostos testados. Todas as linhagens foram incubadas por 48 horas de tratamento (**H04**), nas seguintes concentrações, de forma crescente (0,03125 $\mu\text{l}$  – 2  $\mu\text{l}$ ). Com exceção para a linhagem THP-1, que não expressou valores de densidade óptica nestas concentrações. Deste modo, a linhagem THP-1 foi tratada nas concentrações crescentes (0,015625 $\mu\text{l}$  - 1 $\mu\text{l}$ ).

Destaca-se que as concentrações variam de acordo com as linhagens cancerígenas, em relação ao tratamento, devido ao nível de sensibilidade e de características de aderência ou não. As células aderentes têm por características serem oriundas de tecidos duros, dependendo de ancoragem, aderindo-se à superfície de

contato, um pouco mais resistentes, já as células não aderentes são cultivadas em suspensão (ALVES, 2020).

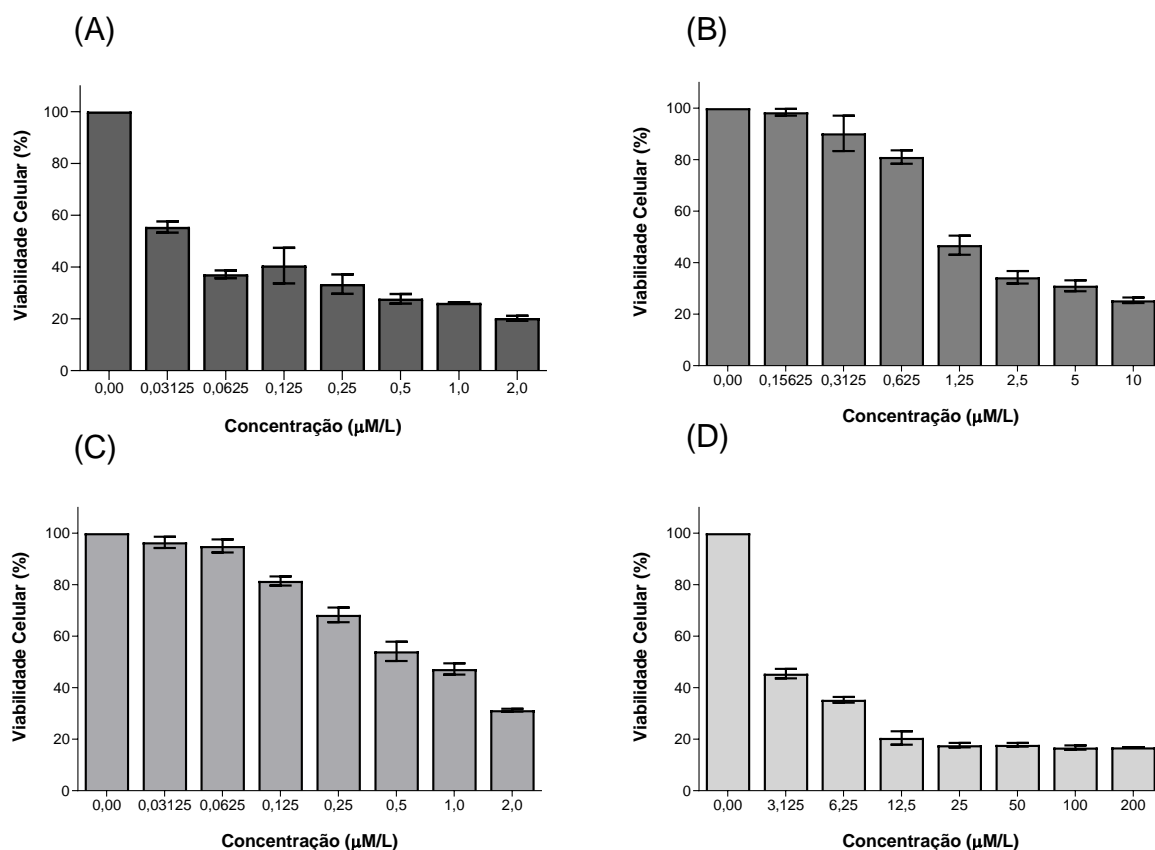
Nas análises citotóxicas do composto de platina (**H18**) utilizou-se as concentrações crescentes (3,125  $\mu\text{l}$  - 200  $\mu\text{l}$ ) na linhagem aderente MDA-MB- 231 e para as linhagens não aderentes, MOLT-4 e U937, foram testadas nas concentrações crescentes (0,1562  $\mu\text{l}$  -10  $\mu\text{l}$ ). A utilização de compostos de coordenação de platina na terapia do câncer vem sendo objeto de estudo ao longo das últimas décadas, com seis fármacos comercialmente aprovados para uso clínico até o momento.

Os compostos de platina, sozinhos ou ministrado em conjunto com outros fármacos, são usados para tratar de 40 a 80% dos pacientes com câncer, o que comprova a importância destes compostos para o tratamento desta doença e intensifica a busca por novos complexos de coordenação de platina, com destaque para a oumaplatina, aroplatina, enoplatina, zeniplatina, sebriplatina, miboplatina, picoplatina, satraplatina, lipoplatina e iproplatina que são objetos de extensiva pesquisa na terapia oncológica, sendo que vários desses complexos encontram-se em fase de teste clínico (NEVES e VARGAS, 2011; DILRUBA e KALAYDA, 2016; NDAGI et al., 2017).

O efeito citotóxico também foi analisado para o Ligante (**H03**) do composto de cobre, nas respectivas linhagens MOLT\_4, U937, nas concentrações crescentes (0,0011562  $\mu\text{l}$  – 0,1  $\mu\text{l}$ ) e para a linhagem MDA-MB- 231, (0,1562  $\mu\text{l}$  - 10  $\mu\text{l}$ ). As análises dos valores de densidade óptica foram utilizadas para calcular as concentrações necessárias para verificar a toxicidade dos compostos por meio do espectrofotometro, onde os resultados encontrados foram calculados com o programa GraphPadPrism Versão 8.0, os quais estão apresentados na **Figura 9**, **Figura 10** e **Tabela 1**.

Na **Figura 9**, observa-se a atividade citotóxica dos compostos (**H04**) e (**H18**) frente à linhagem celular de origem leucêmica U937. O composto de cobre (**H04**) apresentou a atividade citotóxica bastante proeminente quando comparada ao composto de platina (**H18**), da mesma forma quando comparada com o fármaco controle a cisplatina. O ligante (**H03**) do composto cobre também apresentou a atividade citotóxica inferior que o complexo (**H04**). Na **Tabela 1**, comparou-se os valores de  $\text{IC}_{50}$  destes compostos testados na linhagem celular U937. O composto (**H04**) apresentou  $\text{IC}_{50}$  de  $0,04 \pm 0,02 \mu\text{mol.L}^{-1}$  enquanto que o composto de platina (**H18**) a  $\text{IC}_{50}$  observada foi de  $19,28 \pm 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , mostrando a eficácia da atividade citotóxica do composto (**H04**).

Estes resultados também se confirmam quando comparamos a atividade citotóxica do composto (**H04**) com o seu ligante (**H03**) e com a cisplatina  $0,55 \pm 0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $5,3 \pm 1,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente.

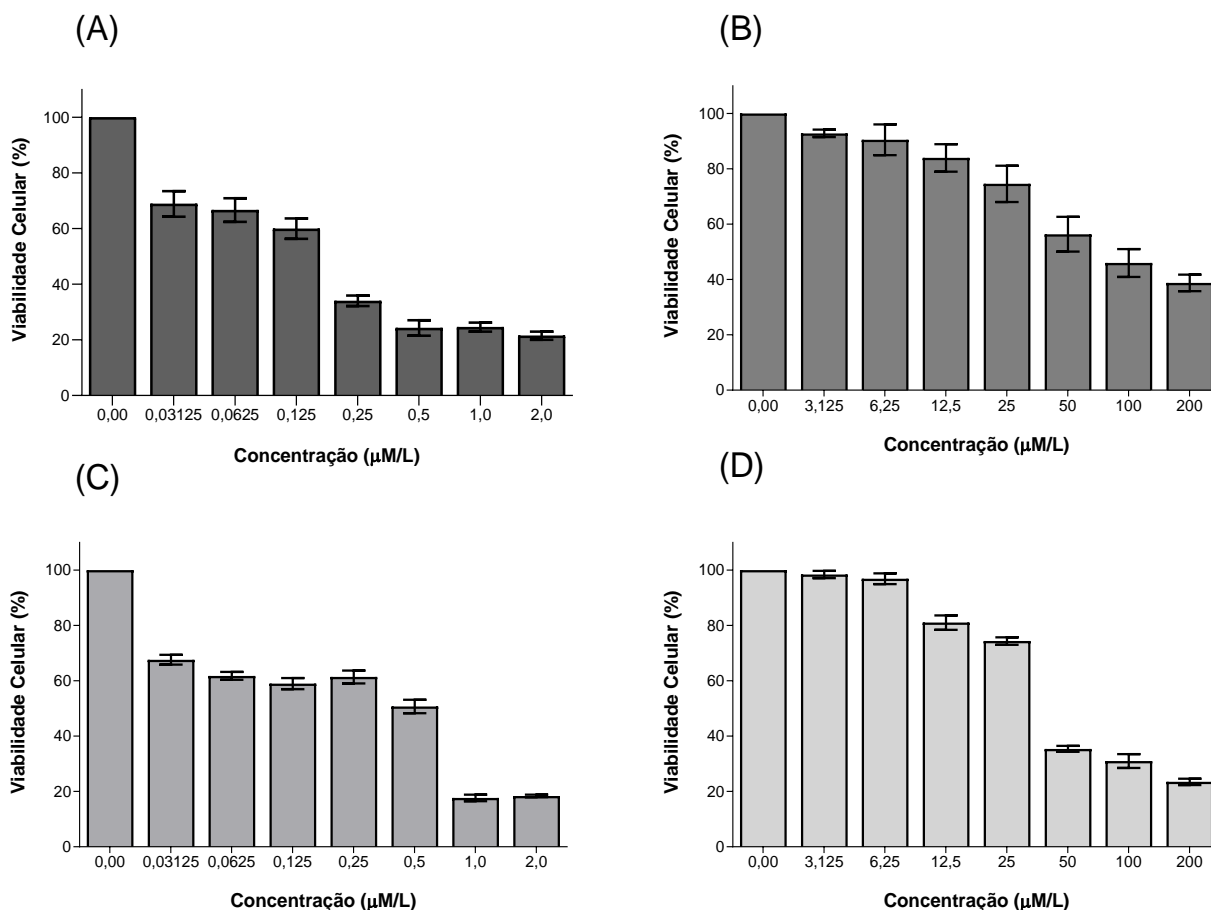


**Figura 9 - Viabilidade Celular da linhagem U937 com tratamento de 48 horas em concentrações variadas.** Análise feita por ensaio de viabilidade celular por MTT e estão expressas em (%). Em (A) Tratamento com o composto de cobre (**H04**) na concentração inicial de 2,0 micromolar; (B) Tratamento com o composto de Platina (**H18**) na concentração inicial de 10 micromolar; (C) Tratamento com Ligante (**H03**) na concentração inicial de 2,0 micromolar e (D) Tratamento com fármaco cisplatina com a concentração inicial de 200 micromolar.

Na **Figura 10** podemos observar a atividade citotóxica dos compostos (**H04**) e (**H18**) frente à linhagem celular MDA-MB-231 originada de tumor de mama humana. O composto de cobre (**H04**) apresentou a atividade citotóxica bastante pronunciada quando comparada ao composto de platina (**H18**), da mesma forma quando comparada com o fármaco controle a cisplatina. Entretanto, o ligante (**H03**) do composto cobre apresentou a atividade citotóxica similar ao complexo (**H04**).

Na **Tabela 1**, estão apresentados os valores de  $IC_{50}$  dos compostos testado na linhagem celular MDA-MB-231. O composto (**H04**) apresentou  $IC_{50}$  de  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$  enquanto que o composto de platina (**H18**) a  $IC_{50}$  observada foi de  $120,0 \pm 1,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , mostrando novamente a atividade citotóxica do composto (**H04**). Estes

resultados também se confirmam quando comparamos a atividade citotóxica do composto (**H04**) com a cisplatina  $53,3 \pm 1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Entretanto, quando comparamos as  $\text{IC}_{50}$  do composto de cobre (**H04**)  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e o ligante (**H03**)  $0,14 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , observamos que os valores são similares (**Tabela 1**).



**Figura 10 – Viabilidade Celular da linhagem MDA-MB-231 com tratamento de 48 horas em concentrações variadas.** Análise feita por ensaio de viabilidade celular por MTT e estão expressas em (%). Em (A) Tratamento com o composto de cobre (**H04**) na concentração inicial de 2,0 micromolar (B) Tratamento com o composto de Platina (**H18**) na concentração inicial de 200 micromolar; (C) Tratamento com Ligante (**H03**) na concentração inicial de 2,0 micromolar e (D) Tratamento com fármaco cisplatina, na concentração de 200 micromolar.

**Tabela 1-** Determinação da concentração inibitória 50% dos compostos (**H04**) e (**H18**) frente às linhagens de células de origem neoplásicas.

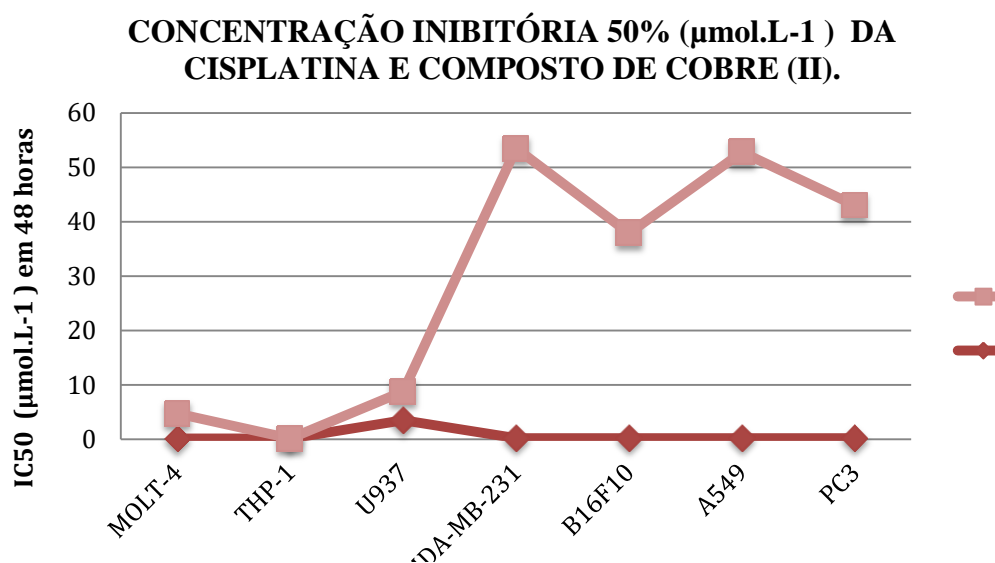
Células	Concentração Inibitória de 50% ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )			
	<b>H04</b> (Cu)	<b>H18</b> (Pt)	Cisplatina	<b>H03</b> (ligante)
U937	$0,04 \pm 0,02$	$19,28 \pm 2,0$	$5,3 \pm 1,1$	$0,55 \pm 0,01$
MDA-MB-231	$0,17 \pm 0,05$	$120,0 \pm 1,9$	$53,3 \pm 1,0$	$0,14 \pm 0,05$
Molt-4	$0,10 \pm 0,01$	145,2	$4,6 \pm 0,6$	nt
THP-1	$0,15 \pm 0,06$	nt	$11,8 \pm 1,1$	nt
A549	$0,18 \pm 0,03$	nt	$52,6 \pm 1,1$	nt
B16-F10	0,18	nt	$37,7 \pm 1,0$	nt
PC3	$0,18 \pm 0,04$	nt	$42,8 \pm 1,1$	nt

Os valores de IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram calculados pelo software GraphpadPrism versão 8.0 pelo método de regressão não linear. nt – não testado.

Na **Tabela 1** nota-se também que o composto (**H04**) foi mais ativo frente às linhagens U937 e Molt-4 com as IC<sub>50</sub>  $0,04 \pm 0,02 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. Com as outras linhagens testadas Molt-4, THP-1, A549, B16-F10 e PC3 os valores de IC<sub>50</sub> foram similares. Para o fármaco controle cisplatina os valores de IC<sub>50</sub> foram mais baixos para as linhagens leucêmicas, conforme nosso grupo já tem observado para vários outros compostos testados (SILVA, *et. al.* 2021; MACIEL, *et. al.*, 2019). A comparação da atividade citotóxica do composto (**H04**) com a cisplatina na **Tabela 1** e **Figura 11**, podemos observar que em todas as células testadas o complexo de cobre é pelo menos 100 vezes mais ativo que o fármaco de referência. Entretanto, a atividade citotóxica entre o ligante e composto de cobre (**H04**) é similar quando comparamos na linhagem MDA-MB-231 e aproximadamente 10 vezes mais ativa a comparação na linhagem leucêmica U937. Havendo a necessidade de complementar os estudos com as outras linhagens celulares para que o resultado seja mais conclusivo.

A utilização da cisplatina na terapia do câncer vem sendo objeto de estudo ao longo das últimas décadas, com seis fármacos comercialmente aprovados para uso clínico até o momento. A característica principal cisplatina é sua capacidade de se ligar ao DNA de maneira covalente, interferindo nos processos de divisão celular, levando à apoptose e necrose (NEVES E VARGAS, 2011). Os compostos de platina, geralmente, são os mais ativos entre os complexos metálicos, entretanto, o aparecimento de linhagens celulares resistentes a essa classe de fármacos, e os efeitos colaterais tóxicos

associados aos mesmos têm estimulado a procura por novas alternativas terapêuticas (ROSSI, 2005).



**Figura 11. Concentração Inibitória 50% da Cisplatina e do composto (H04).** Efeito citotóxico dos compostos de coordenação de cobre e da cisplatina, frente às células cancerígenas MOLT-4 (leucemia linfóide aguda), U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda, PC3 (carcinoma de próstata humano), MDA-MB- 231 (adenocarcinoma de mama), A549 (adenocarcinoma de pulmão) e B16F10 (Melanoma Murino) após tratamento por 48 horas de incubação, avaliado por meio de ensaio de viabilidade celular, MTT.

Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, Maciel (2016) também foi relatado que compostos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , quando avaliado no ensaio de viabilidade celular (MTT) foi citotóxico contra todas as linhagens neoplásicas estudadas: U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), MOLT-4 (leucemia linfóide aguda), Colo 205 (adenocarcinoma colorretal) e H460 (carcinoma de pulmão) (MACIEL, 2016). 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). Ressaltando a importância de estudos com composto com núcleo de cobre. Nessa perspectiva o complexo de cobre (H04) testado, demonstrou variação entre os valores de  $\text{IC}_{50}$  determinados para as diferentes linhagens neoplásicas testadas. Tal fato reflete a relevância do potencial farmacológico do complexo, associando diretamente ao 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). Além disso, alguns estudos demonstraram que os compostos de cobre possuem um espectro mais amplo de atividade e uma toxicidade mais baixa do que as drogas de platina, sendo sugerido por serem capazes de superar a resistência adquirida à cisplatina (SANTINI, 2019).

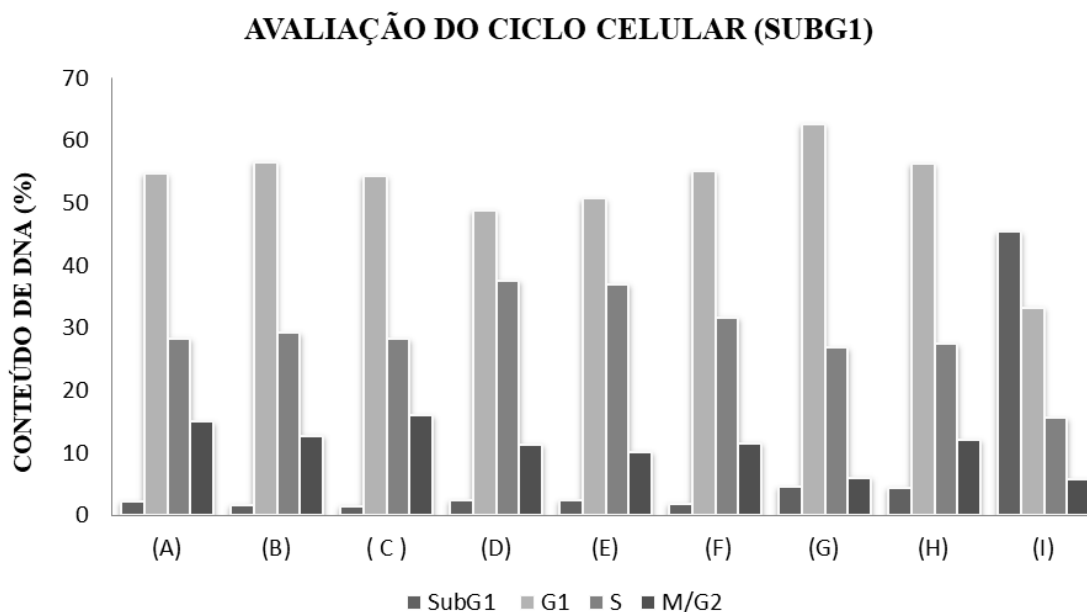
A avaliação da citotoxicidade realizada pelo método colorimétrico do MTT possibilitou selecionar as linhagens celulares mais sensíveis aos compostos testados para aprofundar os estudos na elucidação do tipo de morte celular induzido pelo composto de cobre (H04).

## **6.2 AVALIAÇÕES DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO, COM A MARCAÇÃO DO IODETO DE PROPÍDIO (PI).**

O conteúdo de DNA da célula pode fornecer uma grande quantidade de informações sobre o ciclo celular e, conseqüentemente, o efeito dos estímulos adicionados na fisiologia da célula (ANUP, 2017). Podem-se obter tais informações por meio da coloração com iodeto de propídio que é possível quantificar o conteúdo de DNA celular. No processo de apoptose a quantidade de DNA é menor devido a perda do mesmo devido a sua fragmentação característico neste tipo de morte celular (TANG *et al.*, 2019).

Quando analisado os estágios tardios de apoptose o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb ou múltiplos. O processamento das amostras remove o DNA fragmentado e as células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região Sub-G1 do histograma (GONG *et al.*, 1994). A presença da população celular nesta região do sub-G1 pode ser considerada como um indicativo de morte celular por apoptose.

Deste modo, para que fosse elucidado o mecanismo pelo qual o complexo de cobre afeta a viabilidade celular, a apoptose foi avaliada medindo-se a quantidade de células com baixo conteúdo de DNA na região sub-G1 em análise do ciclo celular por citometria de fluxo (NUNEZ, 2001). As células MOLT-4 foram tratadas com o composto em três tempos, respectivamente: 12 horas, 24 horas e 48 horas, que estão representados nos nas **Figuras 12, 13 e 14**. Neste ensaio as células foram tratadas com as concentrações de  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  que correspondem a 1 e 2 x o  $\text{IC}_{50}$  do composto (H04).

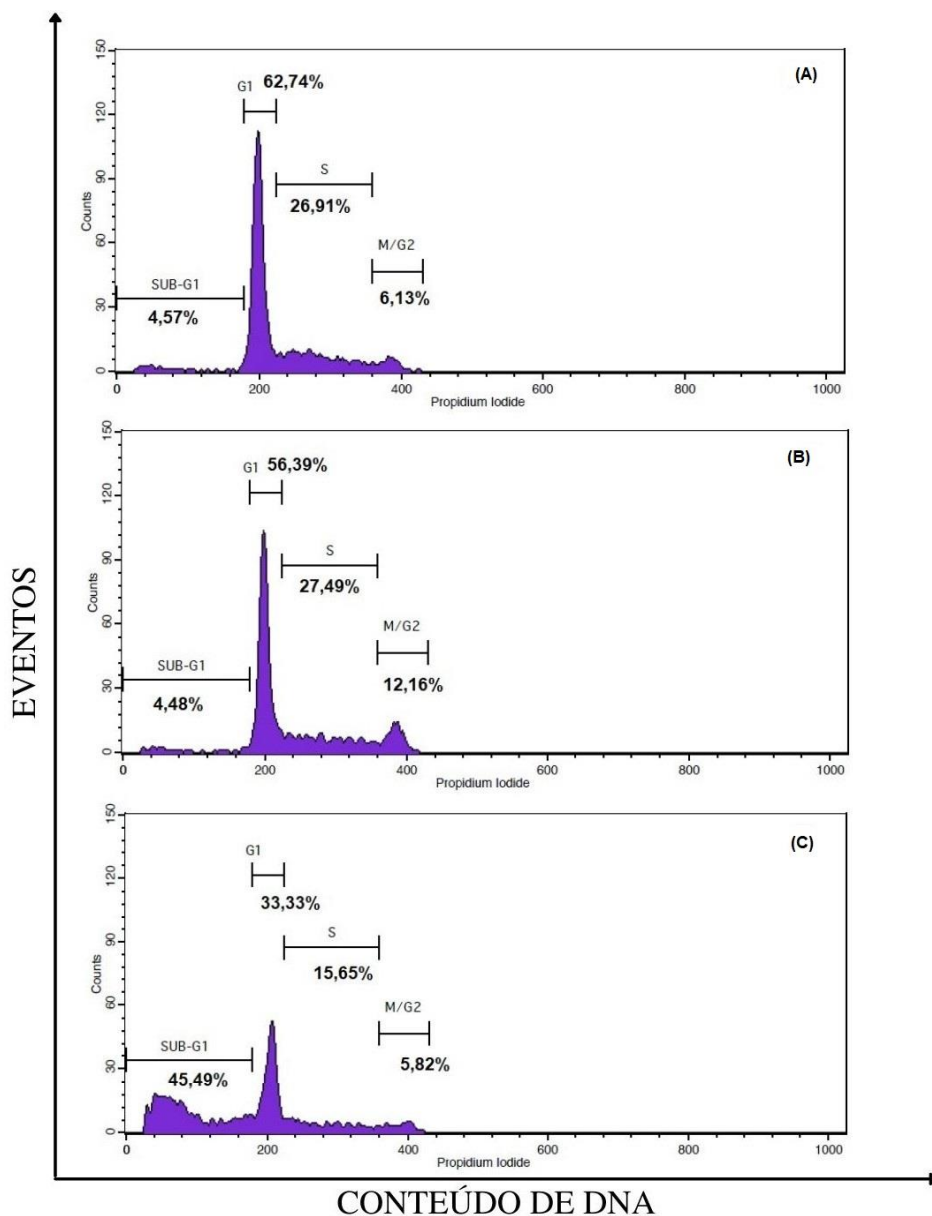


**Figura 12. Avaliação do Ciclo Celular (SubG1).** Células MOLT-4 tratadas e coradas com iodeto de propídio (PI). Histogramas representativos: (A) não tratadas, representando o controle branco por 12 h; (B) Tratadas com composto de cobre a  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 12 h; (C) Tratadas com composto e cobre a  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 12 h; (D) não tratadas, representando o controle branco por 24h; (E) Tratadas com composto de cobre a  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 24h; (F) Tratadas com composto e cobre a  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 24 h; (G) não tratadas, representando o controle branco por 48h; (H) Tratadas com composto de cobre a  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 48h e (I) Tratadas com composto e cobre a  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 48h.

Por meio dos histogramas gerados pela citometria de fluxo, pode-se quantificar a ação do composto em relação ao deslocamento das células para a região de sub-G1. Deste modo, esses dados foram reunidos na **Figura 12** em três tempos diferentes de estudo, para que fossem avaliados em quais estágios estariam ocorrendo o deslocamento do conteúdo de DNA, apresentado em (%). No tratamento realizado em 12 horas, observou-se que o controle de sub-G1 representou apenas 2,26% de células, seguidos por 1,69% quando tratadas com  $1x \text{IC}_{50}$  e 1,55% quando tratadas com o  $2x \text{IC}_{50}$  do complexo de cobre, respectivamente, demonstrando valores insignificantes de deslocamento das células para o sub-G1. Em 24 horas de tratamento, o grupo controle mostrou apenas 2,45% de células na região Sub-G1. As células tratadas com  $1x \text{IC}_{50}$  do composto de cobre (**Figura 12**) no item (E) e com o tratamento de  $2x \text{IC}_{50}$  (**Figura 12**) no item (F), apresentaram respectivamente apenas 2,42% e 1,96% de células presentes nesta região. Ambos os tempos testados, 12 horas e 24 horas não demonstraram resultados significativos para o deslocamento de células tratadas com o composto (**H04**) para a fase sub-G1, ressaltando a importância de investigações tardias em estágios de apoptose quando se avalia a fragmentação de DNA.



Quando as células MOLT-4 foram tratadas por 48 horas com o composto, como demonstrado na **Figura 13**, os dados da análise de citometria de fluxo apresentaram respectivamente: 4,57% em sub-G1 para as células não tratadas (**Figura 13A**), 4,48 % das células na região do sub-G1 para as células MOLT-4, tratadas com composto de cobre a 1x IC<sub>50</sub> (**Figura 13B**) e 45,49 % das células na região do sub-G1 para as tratadas com composto de cobre a 2 x IC<sub>50</sub> (**Figura 13C**).



**Figura 13: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.** Células MOLT-4 tratadas por 48 h e coradas com iodeto de propídio (PI). Histogramas representativos: (A) não tratadas, representando o controle branco; (B) Tratadas com composto de cobre a 0,1 μmol.L<sup>-1</sup> e (C) Tratadas com composto e cobre a 0,2 μmol.L<sup>-1</sup>.

Estes resultados sugerem que o composto de cobre (**H04**) em 48 horas na concentração de  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  exibe suas propriedades anticâncer na linhagem celular MOLT-4, sendo capaz de induzir a fragmentação do DNA nas células, indicando a presença de fragmentos oligonucleossomais, resultantes da ativação das endonucleases, que quebram o DNA nos nucleossomas e dá origem a um padrão de fragmentação repetitivo, típico de apoptose. Comparando aos tempos de tratamentos anteriores, 12h horas e 24 horas, a porcentagens de células mortas pelo deslocamento para sub-G1, aumentou aproximadamente 40%. Ressaltando que nenhum atraso do ciclo celular foi observado em G1, S e G2 /Fases M. Isso fornece evidências de que o complexo de coordenação de cobre exerce efeitos citotóxicos de apoptose em células de leucemia linfóide aguda.

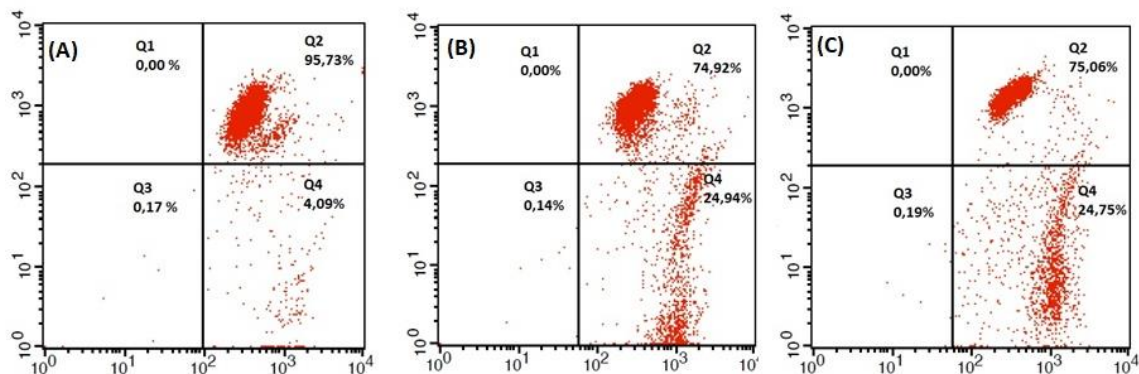
Outro trabalho desenvolvido no laboratório, Silva (2029) também demonstrou resultados importantes, sendo três complexos de cobre (II),  $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$  (**1**),  $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**2**) e  $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$  (**3**), induziram de morte celular por apoptose (SILVA, 2019). Além desse, outros estudos com complexos de cobre (II) mostraram que muitos desses derivados exibem atividade citotóxica proeminente, geralmente relacionada à capacidade de se ligar e clivar o DNA e regular a apoptose (BORGES, *et al.*, 2016; FERNANDES, *et al.*, 2015).

### 6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

A apoptose, um tipo de morte celular programada, pode ser ativada pela via intrínseca, cuja ativação ocorre em resposta a estímulos internos que alteram a homeostase mitocondrial e, conseqüentemente, resulta na ativação da caspase 9 executora (TANG *et al.*, 2019). As mudanças na função mitocondrial estão possivelmente ligadas à produção de espécies reativas intracelulares de oxigênio (ROS), o que reflete um importante desencadeador da apoptose por via intrínseca (SIQUEIRA, 2020).

Analisando a função mitocondrial, pode-se verificar as alterações na transição da permeabilidade da membrana mitocondrial. Este é parâmetro usado como um indicador de morte celular, uma vez que é um passo importante na indução de apoptose (ROY, *et al.*, 2014; ZOROVA, *et al.*, 2018). Assim, a verificação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) pode indicar se há ativação da via intrínseca da apoptose após um determinado estímulo. O ensaio foi avaliado usando a sonda fluorescente catiônica

lipofílica JC-1. As células MOLT-4 foram tratadas com o complexo de cobre nas concentrações  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (**Figura 14**), por 48 horas e analisadas por citometria de fluxo.



**Figura 14 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da linhagem MOLT-4 tratada com o composto (H04).** As células da linhagem MOLT-4 tratadas com o composto (H04) e marcadas com a sonda fluorescente JC-1 foram analisadas por citometria de fluxo após incubação por 48h. (A) Controle negativo; (B) Células Molt-4 tratadas com  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de (H04); (C) Células Molt-4 tratadas com  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de (H04).

As células do grupo controle apresentaram 95,73% das mitocôndrias ativas estando predominantemente concentrada no quadrante superior direito. Já no tratamento com o composto (H04), apresentaram uma mudança nas populações de células do quadrante superior direito para o quadrante inferior direito, apresentando um potencial de perda de membrana mitocondrial em 24,92% na concentração de  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e na concentração de  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  uma perda de 24,75%, não demonstrando diferenças entre as duas concentrações testadas (**Figura 14**). Mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos nesse processo. A análise dos dados obtidos sugere que o composto (H04) induza a despolarização da membrana mitocondrial resultando na disfunção das mitocôndrias. Portanto, o aumento de sua permeabilidade da membrana mitocondrial pode sugerir que a morte celular é desencadeada pela liberação do citocromo C que culmina na ativação de caspase 9. Esses dados fornecem evidências de que o complexo (H04) atua induzindo apoptose nas células de leucemia linfóide aguda, confirmando os resultados obtidos no estudo do ciclo celular.

Em um estudo publicado por Yang e colaboradores (2018), foi relatado o perfil citotóxico de dois complexos, um estruturado com o cobre (II),  $[\text{Cu(L)Cl}_2] \cdot 2$  (1) e o outro com níquel (II)  $[\text{Ni(L)Cl}_2]\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2). O complexo de cobre (1) foi o mais ativo

e exibiu atividade inibitória mais alta do que a cisplatina contra células de cânceres de ovário (SK-OV-3), estômago (MGC80-3) e cervical (HeLa) com valores de  $IC_{50}$  de  $3,69 \pm 0,16$ ,  $2,60 \pm 0,17$  e  $3,62 \pm 0,12$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. Além disso, observaram em seus experimentos a perda do potencial de membrana mitocondrial, com consequente aumento ROS e nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, além de liberação de citocromo C e ativação das caspases 3 e 9, sugerindo o desencadeamento da via intrínseca de apoptose em células MGC80-3.

E mais recentemente Maciel e colaboradores (2020), demonstraram que um composto de cobre (II) induz morte celular por apoptose na linhagem de carcinoma de pulmão NCI-H460 com comprometimento mitocondrial, e, possível participação do retículo endoplasmático neste processo. Nos ensaios *in vivo*, o complexo mostrou uma notável supressão do crescimento tumoral em lesões heterotópicas de células NCI-H460 em camundongos Balb/c *nude*, reduzindo em 48% o volume tumoral em comparação com o grupo controle.

Os dados mencionados nesta pesquisa demonstram que o composto (**H04**) pode exercer uma atividade citotóxica eficaz, corroborando com alguns trabalhos que também ratificaram resultados semelhantes. Foi capaz de reduzir de maneira significativa a viabilidade celular e demonstrou indícios relevantes de apoptose. Em contrapartida, ainda são necessários estudos complementares bioquímicos e morfológicos mais aprofundados para compreender melhor a interação do composto com as células cancerígenas. Ensaio futuros serão necessários para compreender melhor as vias de ação e os possíveis mecanismos envolvidos no processo. Tais resultados servem de motivação para a continuação das pesquisas na busca de novos compostos capazes de interagir com diferentes alvos celulares, como DNA, RNA e proteínas, visando à obtenção de novos compostos metálicos com potenciais aplicações terapêuticas futuras.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ O complexo de coordenação (**H04**) foi citotóxico frente a todas as linhagens cancerígenas testadas. As linhagens mais sensíveis ao tratamento, pelo ensaio de MTT foram a MOLT-4 e U937;
- ✓ Todas as linhagens testadas com o composto (**H04**) mostraram efeitos citotóxicos em concentrações bem menores que quando comparado ao fármaco padrão cisplatina;
- ✓ O composto de cobre (**H04**) foi mais ativo que o composto de Platina (**H18**) nas linhagens testadas;
- ✓ O tratamento com o composto de cobre induziu fragmentação do DNA ocorrendo o deslocamento de células MOLT-4 para a fase sub-G1 sugestiva de morte celular por apoptose;
- ✓ O composto (**H04**) foi capaz de induzir a perda do potencial de membrana mitocondrial na linhagem MOLT-4.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGEED AB, OEHME FW. A review of the biochemical Roles, toxicity and interaction of zinc, copper and iron: II. Copper. **VetHum Toxicol.** 1990 Jun;32(3):230-4. PMID: 2191491.

ALBERTS, b.; JOHNSON, a.; RAFF, l.; WALTER, R. L. **Biologia Molecular da Célula.** Porto Alegre: Artmed, 5 ed., p.1268, 2010.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos, ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova.** v. 1, p. 118- 129, 2005.

Ashkenazi A (2008) *Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer.* **Cytokine Growth Factor.** Rev 19: 325-331.

AZAB F, DE LA PUENTE P, Vij R, AZAB AK. A hipóxia tumoral promove disseminação e colonização tumoral na macro globulinemia de Waldenström. **Sangue.** 2013; 122: 3011–1.

BENNETT, S.; BREIT, S. N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. **Journal of Leukocyte Biology,** v.56, n. 3, p. 236–240, 1994.

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

BOIM, M.A.; SCHOR, N.; SANTOS, O. F. P. **Medicina celular e molecular: Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia,** São Paulo: Editora Atheneu, p. 382, 2003.

BORGES, F. V. **Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de compostos de coordenação de ferro.** Franz Viana Borges, orientação: Milton Masahiko Kanashiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2008, p. 104. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

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.

BOYA P, REGGIORI F, CODOGNO P. Emerging Regulation and functions of autophagy. **Nat Cell Biol.** 2013; 15: 713–20.

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

BULL, E. S. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de compostos de coordenação de cobre (ii) e gálio (iii)**. Érika Soares Bull, orientação: Christiane Fernandes Horn, Campos dos Goytacazes/RJ, 2016.

CARA A. RABIK, M. EileenDolan, Molecular mechanism of resistance and toxicity associated with platinating agents, **Cancer Treat. Rev.** 33 (2007) 9–23.

G. CERCHIARO, K. ALQUILANO, G. FILOMENI, G. ROTILIO, M.R. CIRIOLO, A.M.D.C, FERREIRA. **J. Inorg.biochem.** 99 (2005) 1433.

CARVALHO, G. M. **Estudo complementar de um complexo de coordenação de cobre e avaliação da interação com DNA humano *in silico***. 2018. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

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

CHIPUK, JE, BOUCHIER-HAYES, L. & GREEN, DR Permeabilização da membrana externa mitocondrial durante apoptose: o cenário de inocentes espectadores. **Diferença de morte celular**. 13 , 1396-1402 (2006).

COHEN, S. M.; **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2007 ,11 , 115.

DASARI S, TCHOUNWOU PB. Cisplatina na terapia do câncer: mecanismos moleculares de ação. **Eur J Pharmacol**. 5 de outubro de 2014; 740: 364-78. doi: 10.1016 / j.ejphar.2014.07.025. Epub 21 de julho de 2014. PMID: 25058905; PMCID: PMC4146684.

DE OLIVEIRA, Guilherme AP et al. The Status of p53 Oligomeric and Aggregation States in Cancer. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 548, 2020.

DENOYER, D. et al. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’. **Metallomics**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, 2015.

DENOYER, D.; CLATWORTHY, S. A. S.; CATER, M. A. Copper complexes in cancer therapy. In: SIGEL, A. et al. (Eds.). . **Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents**. Berlin, Boston: De Gruyter, 2018. v. 18p. 469–506.

DESOIZE B, MADOULET C. Aspectos particulares dos compostos de platina usados atualmente no tratamento do câncer. **CritRev. Oncol. Hematol.** 2002; 42: 317–325.

DURAIP, PANDIPALANIMUTHU, SRIDEVIVIJAYSHINDE, KUMARAVEL SOMASUNDARAM E ASHOKA G. Samuelson **Journal of Medicinal Chemistry** 2013 56 (3), 722-734 DOI: 10.1021 / jm300938r.

DILRUBA, S., KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1103–1124, 2016  
ECCLES SA, WELCH DR. Metástase: descobertas recentes e novas estratégias de tratamento. **Lanceta**. 2007; 369: 1742–57.

FILHO, Geraldo Brasileiro. **Bogliolo Patologia**, 7ª Ed. Guanabara Koogan – 2006.

FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; PINGDOU, Q.; **Curr. Pharm. Des.** 2010 ,16 , 1813.

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

GAROFOLO, Adriana *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev. Nutr.**, Campinas , v. 17, n. 4, p. 491-505, dez. 2004 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141552732004000400009&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141552732004000400009&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 28 jan. 2021.

GONG, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z.A. (1994) Selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 314–319.

GRIVICICH, Ivana *et al.* Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hall marks of cancer: then ext generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HAUSMAN DM. What Is Cancer? **Perspect Biol Med**. 2019;62(4):778-784. doi: 10.1353/pbm.2019.0046. PMID: 31761807.

HENGARTNER, MO, ELLIS, RE & HORVITZ, HR. O gene ced-9 de *Caenorhabditis elegans* protege as células da morte celular programada. **Nature** **356**, 494-499 (1992).

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: 12 dez. 2020.

IARC -. **PRESS RELEASE N° 263**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

JOERGER, AC; FERSHT, AR. O caminho da p53: Origens, inativação no câncer e abordagens terapêuticas emergentes. **Annu. Rev. Biochem.** 2016,85, 375-404.

JORDAN, P.; CARMO-FONSECA, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 8–9, p. 1229–1235, 2000.



KASIRI, Neda et al. Therapeutic potential of quercetin on human breast cancer in different dimensions. **Inflammopharmacology**, p. 1-24, 2019.

KERR, JF, WYLLIE, AH & CURRIE, AR Apoptose: um fenômeno biológico básico com amplas implicações na cinética tecidual. **Br.J. Câncer** **26**, 239–257 (1972).

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

LOWE, SW; SCHMITT, EM; SMITH, SW; OSBORNE, BA; JACKS, T. p53 é necessário para apoptose induzida por radiação em timócitos de camundongo. **Nature** 1993 ,362 , 847-849.

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

MACIEL, L.L.F. et al. In vitro and in vivo anti-proliferative activity and ultrastructure investigations of a copper (II) complex toward human lung cancer cell NCI-H460. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 210, p. 1-13, 2020.

MAXWELL (PUC RIO). **Câncer: aspectos gerais**. Disponível em: [https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/24950/24950\\_2.PDF](https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/24950/24950_2.PDF). Acesso em: 30 jan. 2020.

MAHENDIRAN, D. et al. Copper complexes as prospective anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation, selective targeting of cancer cells by DNA damage and S phase arrest. **RSC Advances**, v. 8, n. 30, p. 16973–16990, 2018.

MISHRA AP, SALEHI B, SHARIFI-RAD M, PEZZANI R, KOBARFARD F, SHARIFI-RAD J, NIGAM M. Programmed Cell Death, from a Cancer **Perspective: An Overview**. **Mol Diagn Ther**. 2018 Jun;22(3):281-295. doi: 10.1007/s40291-018-0329-9. PMID: 29560608.

MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. O papel das proteínas Atg na formação de autofagossomos. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2011; 27: 107–32.

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, 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.

MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 144–153, 2014.

Nationalcancerinstitute. CancerTypes. Disponível:NationalCancerInstitute: ComprehensiveCancerInformation Acesso:12/nov/19.

NEPOMUCENO, Leandro L.; FEERREIRA, Jorge L.; CRUZ, Vanessa S. V.; GABRIEL, Gabriela H.; ARAÚJO, Eugênio G. Mecanismo de reparo aos danos do DNA nos pontos de checagem do ciclo celular. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v.14 n.25; p.881, 2017.

NEVES, Amanda P.; VARGAS, Maria D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

NOVÁK, B.; SIBLE, J. C.; TYSON, J. J. Checkpoints in the Cell Cycle. **Encyclopedia of lifes ciences**, p. 1-8, 2002.

NUNEZ, R. (2001) DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v.3, p. 67-70.

PAUL, Anup *et al.* Unfolding biological properties of a versatile dicopper (II) precursor and its two mononuclear copper (II) derivatives. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 174, p. 25-36, 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.

PEIXOTO, M. S.; DE OLIVEIRA, M. F.G.; DE MEDEIROS, S. R. B. Cell death pathways of particulate matter toxicity. **Chemosphere**, 2017.

PJ CROUCH , LW HUNG , PA ADLARD , M. CORTES , V. LAL , G. FILIZ , KA PEREZ , M. NURJONO , A. CARAGOUNIS , T. DU , K. LAUGHTON , I. VOLITAKIS , AI BUSH , QX LI , CL MASTERS , R. CAPPAL , RA CHERNY , PS DONNELLY , AR WHITE E KJ BARNHAM , O aumento da biodisponibilidade do Cu inibe os oligômeros A $\beta$  e a fosforilação da tau, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* , 2009, **106** , 381 - 386

VERMEULEN, K.; BOCKSTAEKE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **CellProliferation**, v.36, p. 131-149, 2003.

ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES G. C. M. T.; CASTRO, H. C; LIONE, V. O. F. Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. **Revista Virtual de Química**. v. 5, 2, p. 243-265, 2013.

ROSSI, L. M. *et al.* **Inorg. Chim. Acta** 2005, 358, 1807.

SADLER, P. J.; *Platinum Met. Rev.* **2008**, 52, 21.

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.

SIQUEIRA, P.R. **Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica dos compostos de coordenação de cobalto e de ferro.** Orientação: Milton Masahiko Kanashiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2020. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

SILVA, M.B. **Avaliação da atividade antineoplásicas *in vitro* e *in vivo* de complexos de cobre II com ligantes *n,o*-doadores.** 2020. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

SILVA, Adriana Leonardo Lima; DE MORAES, Paula Rocha; MARUM, Darlan Silveira. Desafio do tratamento de câncer aplicação de nanotecnologia: uma revisão sistemática. **Revista Transformar**, v. 14, n. 1, p. 528-539, 2020.

SILVA, M. J. S. Da. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 4. ed. ed. [s.l.]: INCA, 2018. 111 p. ISBN: 9788573183511.

SILVEIRA, Vivian Chagas da. **Investigação da atividade biológica de complexos de cobre (II) com ligantes inspirados em biomoléculas.** 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

STIVAROU T. & PATSAVOUDI E. Extra cellular Molecules Involved in Cancer Cell Invasion. **Cancers**, v. 7, p. 238-265, 2015.

SU, Z., YANG, Z., XU, Y. *et al.* Apoptose, autofagia, necroptose e metástase de câncer. **Mol Cancer** **14**, 48 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>

TALMADGE JE, FIDLER IJ. Série centenária do AACR: a biologia da metástase do câncer: perspectiva histórica. **Cancer Res.** 2010; 70: 5649–69.

TAN, C.-P. *et al.* Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 953–1098, 2014.

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

TAYLOR RC, CULLEN SP, MARTIN SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 9: 231-241.

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.

UNICAMP. Patologia (Características gerais das neoplasias) Disponível em: [https://w2.fop.unicamp.br/ddo/patologia/downloads/db301\\_un5\\_Aula44CaracGerNeop.pdf](https://w2.fop.unicamp.br/ddo/patologia/downloads/db301_un5_Aula44CaracGerNeop.pdf). Acesso: 12/nov/19.

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. 117 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 2018.

WHO - World Health Organization (2019). Cancer. Disponível em: 114. Acesso 2019.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. Figure 1, 2016.

ZHANG, D.; TANG, D. G.; RYCAJ, K. Cancer stem cells: Regulation programs, immunological properties and immunotherapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, p. 94–106, 1 out. 2018.

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.

ZÖRNIG M, HUEBER AO, BAUM W, EVAN G. Reguladores de apoptose e seu papel na tumorigênese. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Reviews on Cancer**. 2001; 1551: F1–37.