

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE AS CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS HUMANAS DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE (II) E  
PLATINA (II) TENDO COMO O LIGANTE UMA TIOSSEMICARBAZONA

**TAYMARA SABINO TAVARES JORGE**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes

Mai/2022

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE AS CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS HUMANAS DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE (II) E  
PLATINA (II) TENDO COMO O LIGANTE UMA TIOSSEMICARBAZONA

**TAYMARA SABINO TAVARES JORGE**

“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”.

Orientador: Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro  
Coorientadora: Leide Laura Figueiredo Maciel

Campos dos Goytacazes

Maio/2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

J82

Jorge, Taymara Sabino Tavares.

ESTUDO IN VITRO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE AS CÉLULAS NEOPLÁSICAS HUMANAS DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE (II) E PLATINA (II) TENDO COMO O LIGANTE UMA TIOSSEMICARBAZONA / Taymara Sabino Tavares Jorge. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

54 f.

Bibliografia: 46 - 54.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientador: Milton Masahiko Kanashiro.

Coorientadora: Leide Laura Figueiredo Maciel.

1. Câncer. 2. Complexos de cobre (II). 3. Atividade citotóxica.. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE AS CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS HUMANAS DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE (II) E  
PLATINA (II) TENDO COMO O LIGANTE UMA TIOSSEMICARBAZONA

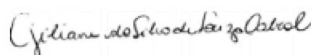
**TAYMARA SABINO TAVARES JORGE**

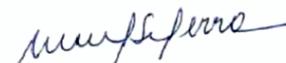
“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”.

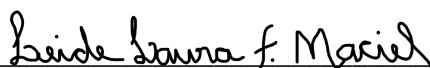
Aprovada em 30 de maio de 2022

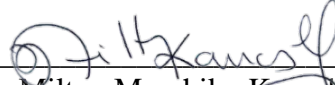
Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. João Carlos de Aquino Almeida (UENF)

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Giliane da Silva de Souza Cabral (UENF)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Wagner da Silva Terra (IFF)

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Leide Laura Figueiredo Maciel (UENF)  
COORIENTADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (UENF)  
ORIENTADOR

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelas oportunidades e cuidado ao longo de toda a trajetória;
- A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelo acolhimento e pela oportunidade de realizar uma pós-graduação;
- Aos meus pais, Elisabete Rosa Sabino e José Tavares Jorge (que veio a falecer ao final desta jornada acadêmica) que me apoiaram na continuidade dos estudos, mesmo que ambos tenham vivido realidades diferentes a minha, me dando forças diárias, incentivo, apoio, paciência e todo carinho ao longo desta trajetória;
- Minhas irmãs Sara Sabino e Hemily Sabino que me incentivaram a iniciar a pós-graduação, me dando força, apoio e dias mais leves diante as dificuldades encontradas pelo caminho;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro em concessão de bolsa de estudo;
- Agradeço ao meu orientador prof. Milton Masahiko Kanashiro, pela oportunidade de ingresso no grupo de pesquisa do laboratório, pela paciência e orientação, contribuindo de forma decisiva para minha formação;
- Agradeço imensamente minha coorientadora Laura Figueiredo Maciel, que tanto me ensinou, me guiou pelos experimentos, me estimulou à pesquisa, me instruindo a uma melhor escrita científica, pela companhia diária de trabalho no laboratório e por toda paciência e sabedoria ao me ensinar e me coorientar durante o mestrado;
- Ao Hyago Santos Gonçalves, que também me incentivou e me deu suporte diário para conclusão desta etapa acadêmica. Principalmente por todos os finais de semanas e feriados que eu estava no laboratório ao invés de estarmos em programações de casal. (Risos), por toda compreensão de muitas vezes estar ausente e cansada e assim mesmo, me dando todo apoio e leveza ao caminho;
- Aos amigos, Ana Caroline, Lucas, Lanna, Igor e Lais que se disponibilizaram a me instruir desde a minha chegada até o final deste processo no laboratório, pelos incentivos, força, apoio, ombro amigo, conhecimentos, e por proporcionarem momentos de muitas risadas deixando a rotina e os dias mais leves;
- Aos companheiros de laboratório do LBR Giliane e Fabricio, pela amizade, incentivo, orientação, disponibilidade e auxílio para a realização deste trabalho;

- Aos técnicos do LBR, Núbia, Rita e Juliana, pela ajuda imprescindível para o desenvolvimento dos experimentos;
- Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite e de forma significativa contribuem para meu desenvolvimento profissional e acadêmico.
- Ao Fabricio Moreira Almeida, por toda a disponibilidade em revisar o trabalho para defesa.
- A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Gratidão a todos!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	08
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	09
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 CÂNCER: Características gerais .....	14
1.2 MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	18
1.3 TRATAMENTO DE NEOPLASIAS .....	23
1.4 METALOFÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL .....	24
1.5 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE.....	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 GERAL.....	30
3.2 ESPECÍFICOS .....	30
<b>4 METODOLOGIA PROPOSTA</b> .....	31
4.1 CULTIVO CELULAR .....	31
4.2 DILUIÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS.....	31
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO (MTT).....	31
4.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR (SUB-G1) POR CITOMETRIA DE FLUXO ....	32
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (JC-1) POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	33
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS EM CÉLULAS H460 TRATADAS COM O COMPLEXO DE COBRE .....	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	35

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS NA VIABILIDADE CELULAR.....	35
5.2 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR (SUB-G1) .....	36
5.3 ESTUDO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_M$ ) .....	37
5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO's EM CÉLULAS H460 TRATADAS COM COMPLEXO DE COBRE .....	38
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	46



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma* (INCA, 2021).....	14
<b>Figura 2</b> Características adquiridas pelas células tumorais. A direita: as novas marcas adicionais do câncer (Modificado de Hanahan e Weinberg, 2022).....	16
<b>Figura 3</b> Condição do microambiente tumoral (Adaptado de CHOUAIB et al., 2014).....	17
<b>Figura 4</b> Esquema representativo das vias apoptóticas extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) – (Modificado de TANG et al., 2019).....	19
<b>Figura 5</b> Diferença entre a morte celular por apoptose e por necrose. Fonte: (TERRA, 2016).....	21
<b>Figura 6</b> Representação esquemática dos tipos de autofagia: Macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (Modificado de PARZYCH; KLIONSKY, 2014).....	22
<b>Figura 7</b> Estrutura da cisplatina (a) e seus análogos carboplatina (b) e oxiplatina (c) (GHOSH, 2019).....	25
<b>Figura 8</b> Representação esquemática da entrada da cisplatina na célula e sua posterior ligação com o DNA no núcleo (NEVES; VARGAS, 2011).....	26
<b>Figura 9</b> Viabilidade das células H460 após exposição ao complexo de cobre (A), platina (B) e o ligante (C), por 48 horas. As curvas de dose-respostas foram obtidas no ensaio com MTT. As diferenças significativas foram consideradas como * P < 0,05, ** P<0,01, ***P<0,001...36	36
<b>Figura 10</b> Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Células H460 incubadas por 48 horas e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cobre (1,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ); (C) células tratadas com cisplatina (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).....	37
<b>Figura 11</b> Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. Células H460 incubadas por 48 horas e coradas com JC-1. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cobre (1,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e (C) células tratadas com cisplatina ( 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).....	38
<b>Figura 12</b> Análise da geração de ROS por citometria de fluxo. A linhagem H460 foi incubada por 48 horas e marcada com DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cobre (1,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ); (C) células tratadas com cisplatina (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e (D) amostra pré-tratada por 2 h com 5 $\text{mmol.L}^{-1}$ de NAC antes da adição do complexo de cobre.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b><u>Tabela 1</u></b> Concentração inibitória IC <sub>50</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> ) dos complexos cobre H31, Ligante H36 e Platina H39 contra linhagens celulares neoplásicas em 48 h de tratamento.....	35
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A549** - Linhagem de carcinoma de pulmão humano

**APAF-1** - *Apoptotic protease activating factor 1*

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

**Bax** - *BCL2 associated X protein*

**Bcl-2** - *B cell lymphoma 2*

**BCRJ** - Banco de Células do Rio de Janeiro

**BID** - *Interacting domain death agonist*

**COLO 205** - Linhagem celular humana de adenocarcinoma colorretal

**DCFH-DA** - 2,7-Diclorofluoresceína diacetato

**DL50** - Dose letal para 50 % da amostra

**DMEM/F-12** - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12*

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**FADD** - *Fas-Associated Death Domain*

**FAS** - Receptor de morte celular

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**H460** - Linhagem celular humana de adenocarcinoma de pulmão

**IC<sub>50</sub>** - Concentração inibitória necessária para matar 50 % da população celular

**INCA** - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

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

**MDA-MB-231** – Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama

**MOLT-4** - Linhagem celular humana de leucemia linfoide aguda

**MOMP** - Permeabilização da membrana externa mitocondrial

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

**NAC** - N-Acetil Cisteína

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PBMC** - Células mononucleadas do sangue periférico ( do inglês, peripheral blood mononuclear cells)

**PBS** - Tampão Fosfato Salino (NaCl 0,137 m/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,008 m/L; KCl 0,0026 m/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0014 m/L, pH 7,2)

**PC3** - Linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata

**PI** - Iodeto de propídio

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigênio

**SCC-9** – Câncer Humano de Língua.

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

**TNF** - Tumor necrosis fator

**TRAIL** - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

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

**WHO** - *World Health Organization*

**$\Delta\Psi_m$**  - Variação do potencial de membrana mitocondrial

## RESUMO

O câncer é considerado uma doença crônico-degenerativa que engloba um conjunto heterogêneo de mais de 200 tipos caracterizados, principalmente, por uma proliferação desordenada e descontrolada de células anormais que crescem além de seus limites usuais. Essa doença apresenta altas taxas de incidência e mortalidade, gerando impactos relevantes na saúde pública mundial. Desde o advento da cisplatina na terapia oncológica, inúmeros estudos buscam o desenvolvimento de novos fármacos baseados em metal que apresentem atividade antineoplásica mais seletiva e menos tóxica. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial citotóxico de um composto de coordenação de cobre (II) (H31) e um de platina (II) (H39) por meio de testes *in vitro*. Os compostos foram estudados frente as seguintes linhagens neoplásicas humanas: H460 e A549 (carcinomas de pulmão), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), PC3 (carcinoma de próstata), U937 (linfoma histiocítico), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e THP-1 (leucemia monocítica aguda). O ensaio de viabilidade celular baseado na metabolização do MTT foi realizado para determinar a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) dos compostos. Os resultados apontam que os dois complexos foram ativos, assim como o ligante (H31) quando testado sozinho, e apresentaram propriedades citotóxicas acentuada contra as células neoplásica, sendo que o complexo de cobre (II) (H31) foi marcadamente mais eficaz do que a cisplatina sobre as 7 linhagens de origem neoplásica humanas. A investigação da via de morte foi realizada contra a linhagem H460, por apresentar elevada sensibilidade frente ao tratamento com o complexo de cobre (II) (H31), com uma  $IC_{50}$  de 0,9  $\mu\text{mol/L}$  contra 25  $\mu\text{mol/L}$  da cisplatina, bem como pelo comportamento agressivo da doença. O mecanismo de ação promovido pelo complexo de cobre (II) H31 através do ensaio SUB-G1 sugere a indução de apoptose, devido ao padrão de fragmentação do DNA celular detectado em citometria de fluxo. Os resultados mostram ainda um possível envolvimento da mitocôndria no processo de morte celular, promovendo a perda do potencial de membrana mitocondrial (JC-1), bem como o aumento nos níveis de geração de ERO's após o tratamento com o complexo. Por fim, ressalta-se que o complexo de cobre (II) (H31) tem potencial como agente antineoplásico, abrindo a perspectiva para outras pesquisas no desenvolvimento de novos quimioterápicos.

Palavras-chave: câncer, complexos de cobre (II), atividade citotóxica.

## ABSTRACT

Cancer is considered a chronic-degenerative disease that englobes a heterogeneous set of more than 200 diseases characterized mainly by a disordered and uncontrolled proliferation of abnormal cells that grow beyond their usual limits. This disease has high incidence and mortality rates, generating relevant impacts on global public health. Since the advent of cisplatin in cancer therapy, numerous studies have sought the development of new metal-based drugs that have more selective and less toxic antineoplastic activity. In this context, the present work had as objective the study of the cytotoxic potential of a copper (II) (H31) and a platinum (II) (H39) coordination compound through *in vitro* tests. The compounds were evaluated against the following human neoplastic lines: H460 and A549 (lung carcinoma), MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma), PC3 (prostate carcinoma), U937 (histiocytic lymphoma), MOLT-4 (acute lymphoblastic leukemia) and THP-1 (acute monocytic leukemia). Cell viability assay by MTT metabolism was performed to determine the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) The results indicate that the two complexes were active, as well as the ligand (H31) when tested alone, and showed marked cytotoxic properties against neoplastic cells, with the copper (II) complex (H31) being markedly more effective than the cisplatin on the 7 lineages of human neoplastic origin. The investigation of the cell death pathway was carried out with the cell line H460, for presenting high sensitivity to treatment with the copper (II) complex (H31), with an IC<sub>50</sub> of 0.9 μmol/L against 25 μmol/L of cisplatin, as well as for the aggressive behavior of the disease. The mechanism of action promoted by copper (II) complex H31 through the SUB-G1 assay suggests the induction of apoptosis, due to the pattern of cellular DNA fragmentation detected in flow cytometry. The results also show a possible involvement of mitochondria in the cell death process, promoting the loss of mitochondrial membrane potential (JC-1), as well as an increase in the levels of ROS generation after treatment with the complex. Finally, it is emphasized that copper (II) complex (H31) has potential as antineoplastic agent, opening the perspective for further research in the development of new chemotherapeutic agents.



Keywords: Cancer. Copper (II) complexes. Cytotoxic activity.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CÂNCER: Características gerais

O câncer é uma das principais doença da atualidade e se apresenta como um grande desafio, gerando impactos relevantes na saúde pública mundial (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). A palavra câncer é um termo genérico, usado para denominar neoplasias malignas, que tem como características principais a proliferação de células anormais que se desenvolvem de forma desordenada e descontrolada, evadindo-se de seus limites anatômicos normais e com potencial invasivo e metastático (AHMAD & AHSAN, 2020; GUTSCHNER & DIEDERICHS, 2012; PUGAZHENDHI ET AL., 2018).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar (INCA, 2022), a incidência de novos casos ocorre principalmente por fatores ambientais e com a exposição dos indivíduos aos denominados carcinógenos, dentre os quais, destacam-se a obesidade, sedentarismo, dieta pobre em vegetais, tabagismo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, bem como por fatores genéticos. Os tipos de câncer mais estimados na população brasileira são apresentados na **Figura 1**. Espera-se ainda que 625 mil novos casos de câncer surjam a cada ano entre 2020 a 2022.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	<b>Homens</b>  <b>Mulheres</b> 	Mama feminina	66.280	29,7%	
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%	
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%	
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%	

\* Números arredondados para múltiplos de 10

**Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma\* (INCA, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), se as tendências atuais continuarem, pode-se esperar um aumento mundial de 60% nos casos de câncer nas duas próximas décadas. 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, 2022).

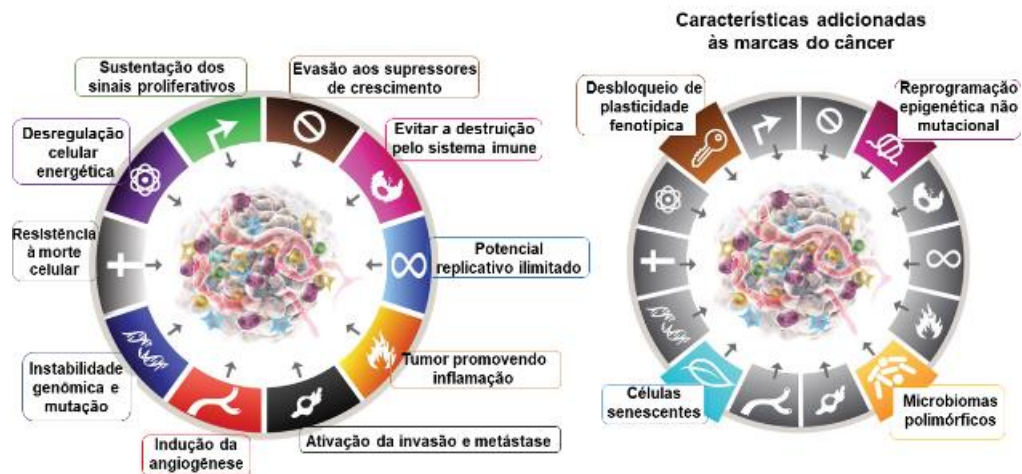
No Brasil, o câncer de pulmão ocupa a terceira neoplasia mais comum entre os homens, e a quarta mais incidente entre as mulheres (INCA, 2021). Em uma análise geral, essa neoplasia pulmonar atinge números alarmantes e abrange 18,4 % das mortes relacionadas em todo o mundo (ARFFMAN et al., 2018; BRAY et al., 2018; HUANG et al., 2020).

O levantamento realizado pelo INCA (2021) retrata um alto índice em diferentes tipos de neoplasias que se fossem diagnosticadas no seu processo inicial, poderiam promover um quadro de saúde diferenciado aos pacientes, tendo como resultante uma redução nos novos casos. O diagnóstico tardio, contribui para uma possível progressão da doença ou até mesmo a morte. Esses atrasos estão parcialmente relacionados à disponibilidade limitada de procedimentos diagnósticos como biópsias (percutâneas ou cirúrgicas), mediastinoscopias e broncoscopias no sistema público de saúde (TSUKAZAN et al., 2018).

As células cancerígenas são derivadas de alterações genéticas, desencadeadas quando ocorrem falhas na atividade normal celular, devido às mutações em genes específicos que controlam os 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. Os proto-oncogenes são inativos em células normais, no entanto, quando sofrem alterações estruturais, tornam-se ativos, passando a ser denotado como oncogenes, contribuindo desta forma para o desenvolvimento de neoplasias (KUMAR et al., 2011; TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015). Já os genes supressores de tumor estão associados às vias de inibição do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Quando a estabilidade desses genes é perturbada, a célula perde o controle da divisão celular, o que pode colaborar para o desenvolvimento da doença, transformando as células normais em células malignas (SINHA, 2018).

Acredita-se que o vasto genótipo de células tumorais seja resultado da manifestação de inúmeras alterações essenciais na fisiologia celular, que coletivamente ditam o crescimento de células malignas. Os principais eventos dessas células transformadas foram elucidados no trabalho de Hanahan e Weinber (2011), no qual em uma recente publicação, Hanahan (2022) apresentou uma refinada revisão, que agrupam características adicionais, sendo estas o “desbloqueio de plasticidade fenotípica”, “reprogramação epigenética não mutacional”, “microbiomas polimórficos” e “células senescentes” (**Figura 2**) (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

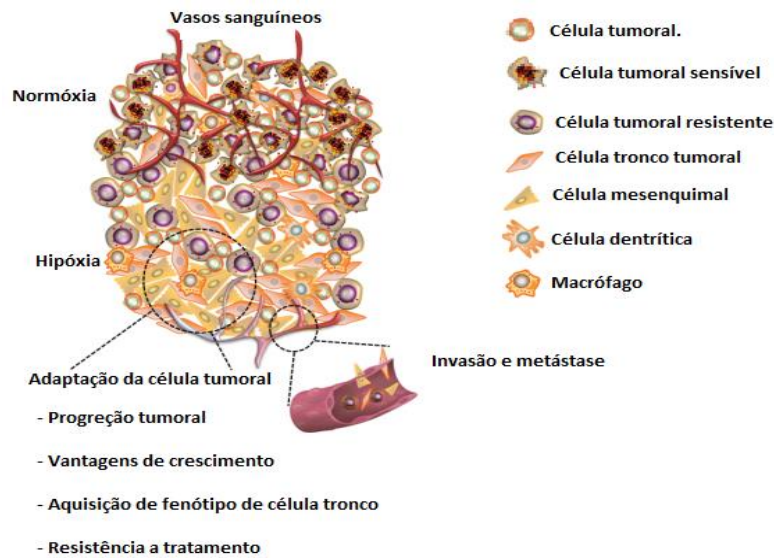




**Figura 2.** A esquerda: características adquiridas pelas células tumorais. A direita: as novas marcas adicionais do câncer (Modificado de HANAHAN E WEINBERG, 2022).

Uma das principais características das neoplasias malignas é a capacidade de realizar metástase. Este processo consiste na disseminação sistêmica de células cancerígenas através da invasão da matriz extracelular e da membrana basal de vasos sanguíneos e linfáticos. Assim, o câncer se dissemina além do local de onde se iniciou (sítio primário) para outras partes do corpo. O processo metastático dificulta a erradicação do câncer, uma vez que a localização e a extensão das lesões podem ser incompatíveis com ressecções cirúrgicas, radioterapia e outros tratamentos. Por isso, os altos índices de óbitos causados por câncer são resultantes das metástases ocorridas (CHEN; HANN; WU, 2011; KAWADA; TAKETO, 2011).

Ademais, a heterogeneidade de fenótipos celulares é observada também em células tronco tumorais, que por influência da estrutura do microambiente tumoral (**Figura 3**) possuem a capacidade de auto renovação, iniciação e migração celular (CHOUAIB et al., 2014), podendo ainda exibir plasticidade pela transição reversível entre os estados células-tronco e não-tronco, onde, essa plasticidade fenotípica favorece a proliferação dessas células alteradas, uma vez que o sistema imunológico não consegue identificar tais alternâncias, favorecendo assim, a adaptação do tumor a um ambiente seletivo, gerando subpopulações tumorais mais especializadas, e tornando-as mais resistentes às terapias antitumorais (KRESO; DICK, 2014; MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012; PLAKS; KONG; WERB, 2015).



**Figura 3.** Condição do microambiente tumoral (Modificado de CHOUAIB et al., 2014).

Os diferentes tipos de cânceres podem ser agrupados em seis categorias principais: carcinoma, sarcoma, mieloma, linfoma, leucemia e tipos mistos. Os carcinomas se originam de células epiteliais de revestimento externo e interno, os sarcomas são originários dos tecidos conjuntivos como ossos, tendões, cartilagem, músculo e gordura. Mieloma é a nomenclatura dada ao câncer originado dos plasmócitos da medula óssea (WEINBERG, 2008). Os cânceres derivados de células dos tecidos linfáticos denominam-se linfomas. Os cânceres que se desenvolvem no tecido hematopoiético medular são chamados de leucemias, e por fim, a denominação de tipos mistos se refere aos cânceres que apresentam categorias histológicas distintas em uma mesma neoplasia (ALBERTS, et al., 2010; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2018). Essa diversidade de neoplasias surge de acordo com a variação de células humanas, o que propicia o surgimento de inúmeros cânceres (PETERS; GONZALEZ, 2018).

Desta forma, o conhecimento acerca dos fatores que influenciam a cancerogênese ainda não está completamente elucidado, mas os estudos apontam que as alterações genéticas e epigenéticas caracterizam o fenótipo maligno das células cancerígenas. Entre essas alterações estão correlacionadas com falhas na execução dos mecanismos de morte celular, dentre as quais, destacam-se as vias apoptóticas (LÓPEZ-LÁZARO, 2018).

Isto posto, destaca-se que o percentual de óbito se relaciona diretamente com os aspectos socioeconômicos e políticos, sendo a estruturação do sistema de saúde essencial para medidas preventivas, com diagnóstico precoce e preciso, com o tratamento adequado para as populações

de baixas e médias rendas. Essas questões são de extrema importância para reduzir as taxas de mortalidade retratadas até então (BARBOSA et al., 2015; CONG et al., 2020).

## 1.2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR

A morte celular é uma resposta fundamental na formação e na manutenção da homeostase de um organismo vivo. Além disso, a regulação da morte celular desempenha um papel central sobre o metabolismo, em respostas a danos ao DNA e no desenvolvimento de células de defesa, sendo o desequilíbrio deste processo correlacionado com várias doenças, incluindo o câncer (TANG et al., 2019).

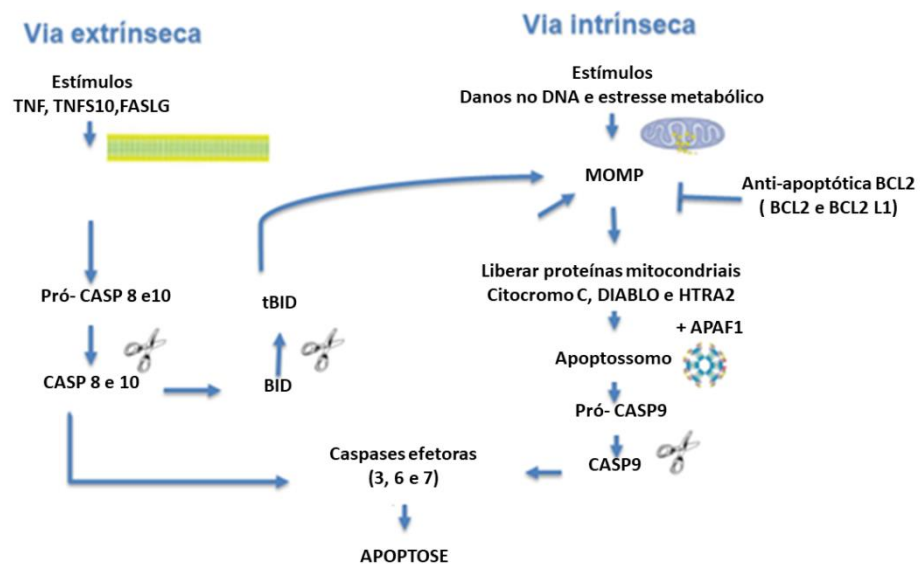
Um dos tipos de morte celular mais bem estudado é a morte por apoptose. O termo apoptose foi cunhado por Jonh Kerr e colaboradores em meados da década de 1960. A palavra apoptose significa “o ato de cair” como caem as pétalas das flores e as folhas das árvores, e foi escolhida porque sugere perdas (a morte celular, no caso) benéficas, necessárias ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo (FUCHS; STELLER, 2015; LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964). Com o estabelecimento da microscopia eletrônica na década de 1970, foi possível diferenciar melhor os tipos de morte ocorridos nas células, agrupando características morfológicas que definem, por exemplo, quando um processo é por apoptose ou necrose (FUCHS; STELLER, 2015; KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

Inúmeros mecanismos de morte celular foram descritos no trabalho de Galluzzi e colaboradores (2018), e um número crescente de novas formas de morte celular não-apoptótica foram identificadas e estão cada vez mais implicadas em várias patologias humanas, dentre as quais, a piroptose, morte celular netótica, autose, ferroptose e necroptose. Contudo, os principais tipos de morte celular melhor elucidadas são a apoptose, necrose e morte celular autofágica (GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose é um processo de morte celular programada que ocorre por meio de vias altamente reguladas. Quando esse processo é ativado, é desencadeado uma cascata de sinalizações indicando que aquela célula precisa morrer. Tal mecanismo é central para vários processos biológicos e pode ser ativado em resposta a estímulos específicos como mecanismo de defesa, reações imunológicas ou a várias formas de injúria ou estresse celular, garantindo assim o equilíbrio homeostático entre as taxas de proliferação e morte celular (HASSAN et al., 2014). Esse mecanismo de morte é controlado pelas proteínas da família BCL-2, que possui

componentes pró-apoptóticos (BAX, BAK) e anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-W, BCL-XL, BFL1, MCL1) (MAIORAL et al., 2013). Tais proteínas participam de uma cascata de sinalização que promovem uma posterior ativação das caspases, um grupo de proteases, que são responsáveis pela degradação de componentes celulares, tornando possível a ação de células fagocitárias, evitando, dessa forma, o processo inflamatório (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

A apoptose é um processo de morte ativo que não causa inflamação, mediada por estímulos internos ou externos, que podem ocorrer por meio de duas vias características (**Figura 4**), a via extrínseca (citoplasmática) e a via intrínseca, esta última sendo ainda subdividida em via mitocondrial ou mediada pelo retículo endoplasmático (PEIXOTO; DE OLIVEIRA GALVÃO; BATISTUZZO DE MEDEIROS, 2017).



**Figura 4.** Esquema representativo das vias apoptóticas extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) – (Modificado de TANG et al., 2019).

A via extrínseca ocorre por sinalização externa, com a ativação de receptores de morte na superfície da membrana celular, sendo estes pertencentes à família dos receptores de fator de necrose tumoral, sendo o receptor FAS, um dos mais importantes indutores de apoptose. Quando os receptores de morte, presentes na membrana plasmática (FAS, TNFRSF10A, TRAIL e TNFRSF1A) interagem com seus ligantes (Fas-L, TNFRSF10 e TNF) promove o recrutamento de uma molécula adaptadora (FADD) que resulta na clivagem das pro-caspases 8 e 10 tornando-as ativas, que em seguida ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7 (XIAO et al., 2019). A via extrínseca pode ainda ativar a via intrínseca quando a caspase 8 cliva o BID (um membro

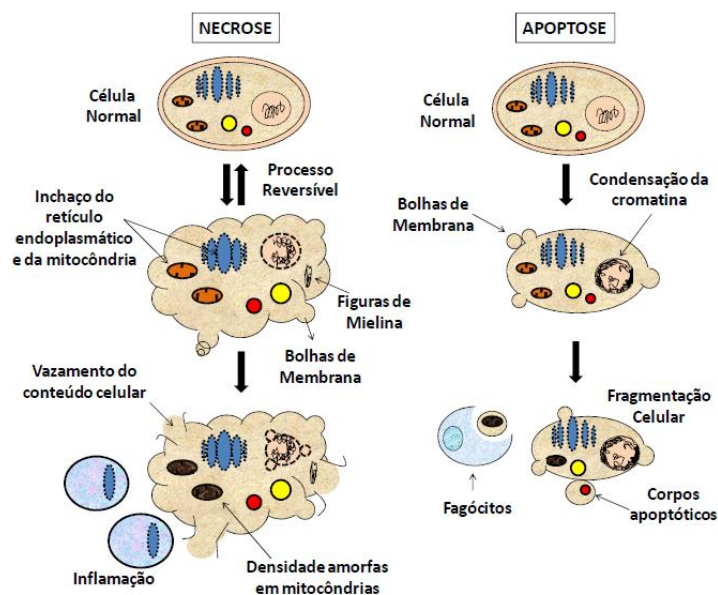
pró-apoptótico da família BCL-2), presente no citoplasma, originando sua forma ativa (tBID), e que ao sofrer translocação para as mitocôndrias, tBID interage com as proteínas pro-apoptóticas (BAX, BID), resultando na permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), o que propicia a liberação de citocromo C e posterior ativação da caspase 9 (KALKAVAN; GREEN, 2017; TANG et al., 2019; XIAO et al., 2019).

Já a via intrínseca ocorre pela ação de diversos fatores que advêm de eventos intracelulares, tais como: hipóxia, concentrações elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$ , hormônios, radiação, toxinas, e aumentos nos níveis constitutivos de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (ASHKENAZI, 2008; CHIPUK; BOUCHIER-HAYES; GREEN, 2006; OBENG, 2020). Esses processos desencadeiam a liberação de proteínas pró- apoptóticas, como exemplo, a liberação do citocromo C no citosol que se liga à Apaf-1 e a pró-caspase 9 formando um complexo denotado como “apoptossomo”, promovendo a ativação catalítica da caspase 9, que posteriormente cliva e ativa a caspase 3 efetora, resultando em futura clivagem de alvos celulares levando a célula a morte de forma ordenada (HASSAN et al., 2014; SAELENS et al., 2004; XU et al., 2015).

Em contrapartida, a via intrínseca ativada pelo retículo endoplasmático ocorre quando há excesso de ERO's, níveis diminuídos de glicose, infecções virais, entre outros. O estresse reticular, faz com que as ligações dissulfeto sejam inibidas, sendo este fator prejudicial ao dobramento de proteínas na organela. Como consequência, essas proteínas mal enoveladas vão se acumulando no lúmen do retículo endoplasmático, induzindo apoptose, através da ativação da caspase 12 e da promoção da permeabilização da membrana mitocondrial (ROZPEDEK et al., 2016).

Apesar das vias apoptóticas serem conduzidas por componentes bioquímicos distintos, elas convergem a uma via comum de execução, e acarretam as alterações morfológicas bem marcantes, incluindo a retração celular (picnose), o que ocasiona a perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, condensação da cromatina e fragmentação do DNA. A seguir são formados prolongamentos de membrana celular contendo as organelas, que se alongam e rompem dando origem aos corpos apoptóticos que logo serão fagocitados por macrófagos. Além disso, apresentam alterações bioquímicas, como a externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, fragmentação específica do DNA através da atividade de endonucleases liberadas e a ativação de caspases (SU et al., 2019).

O mecanismo de morte celular por necrose (**Figura 5**) se diferencia da apoptose por ser um tipo de morte celular descrita como “acidental” sem controle genético, ocorrendo devido aos danos físicos (altas temperaturas, radiação) e químicos no ambiente celular (quimioterapia, drogas ilícitas, agrotóxicos) (VANDEN BERGHE et al., 2013). As células necróticas apresentam características morfológicas como o aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática, degeneração de organelas e perda da integridade da membrana com consequente ruptura celular (ZIEGLER; GROSCURTH, 200). Esse processo passivo de morte celular gera danos às células circunvizinhas acarretando uma reação inflamatória no local (PORTUGAL; BATALLER; MANSILLA, 2009; TAN et al., 2014).



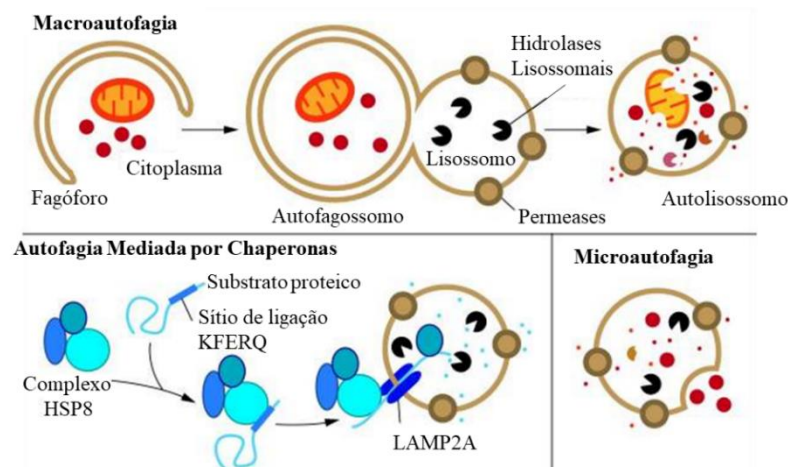
**Figura 5.** Diferença entre a morte celular por apoptose e por necrose (TERRA, 2016).

Já a autofagia, se caracteriza como uma via conservada geneticamente capaz de controlar a degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas, para manutenção da homeostase celular em condições adversas como privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas. No entanto, em certas condições patológicas, a persistência da autofagia pode induzir morte celular, deflagrando um processo de morte silencioso, sem ativar resposta inflamatória (CHEN et al., 2014).

A morte celular autofágica tem sido classificada como morte celular programada tipo II, pois ocorrem por mecanismo não-apoptótico, uma vez que as células apresentam características morfológicas e bioquímicas diferente dos processos apoptóticos, com ativação de um sistema lisossomal (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). Este mecanismo tem como

importante função a degradação e reciclagem de componentes celulares desnecessários ou não funcionais para a célula (SHINTANI; KLIONSKY, 2004).

São três os tipos de morte celular autofágica: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas (**Figura 6**). Na macroautofagia, o alvo a ser eliminado é envolvido por projeções de membrana citoplasmática, mitocondrial ou reticular, originando um autofagossoma que se une ao lisossomo originando o autofagolisossomo e então há degradação do conteúdo do vacúolo por meio das enzimas lisossomais (PARZYCH; KLIONSKY, 2014). A autofagia mediada por chaperonas ocorre com a translocação de proteínas para o lisossoma, através da interação com o receptor LAMP-2A presente na membrana lisossomal, resultando no desdobramento e degradação da proteína (LEVINE; MIZUSHIMA; VIRGIN, 2011). Já a microautofagia, por outro lado, corresponde à incorporação do conteúdo citoplasmático aos lisossomos por meios da invaginação da membrana desta organela (YANG; KLIONSKY, 2010).



**Figura 6.** Representação esquemática dos tipos de autofagia: Macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (Modificado de PARZYCH; KLIONSKY, 2014).

Disto isto, devido ao processo apoptótico não desencadear uma resposta inflamatória no organismo, fármacos que regulam esta via de morte das células tumorais são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas e constitui-se uma importante estratégia terapêutica na prática clínica para o tratamento de neoplasias.

### 1.3. TRATAMENTO DE NEOPLASIAS

As principais terapêuticas do câncer atualmente envolvem a aplicação da radioterapia, cirurgia e a quimioterapia, como métodos elegíveis aos pacientes com doenças localizadas ou quando o câncer é sensível a um determinado tratamento (INCA, 2022; WANG et al., 2019).

Um método bastante eficaz como tratamento local de cânceres que ainda não se disseminaram é a radioterapia, que tem como objetivo promover uma extensa lesão no DNA das células neoplásicas, inviabilizando sua divisão e sobrevivência (GRUTTERS et al., 2010). Essa modalidade terapêutica utiliza feixes de radiações em células classificadas como malignas, impedindo possíveis multiplicações por mitose e/ou induzindo a morte celular (ORTH et al., 2014).

Como uma outra vertente de tratamentos, o procedimento cirúrgico tem a capacidade de erradicação de tumores locais aumentando a sobrevida dos pacientes (MAJEWSKI et al., 2012). A cirurgia só ocorre quando a localização do tumor é anatomicamente favorável para que seja removido. No entanto, em muitos tipos de cânceres, nos quais as células estão disseminadas sistemicamente, apenas esse procedimento não é suficiente, nestes casos há a necessidade de uma associação de terapias para a contenção da doença (ALBERTS; WILSON; HUNT, 2008).

O tratamento quimioterápico consiste na administração de um ou uma combinação de medicamentos que têm ação citotóxica frente as células tumorais, capaz de matar as células ou inibir sua proliferação. Com isso, o tratamento pode ser, curativo ou paliativo (DEVITA; CHU, 2008; NYGREN, 2009). Os compostos antineoplásicos são classificados de acordo com a sua interação com o DNA. Sendo organizados em diferentes categorias, dentre as quais os alquilantes, os antimetabólicos, os antibióticos antineoplásicos e os inibidores mitóticos (FUCHS; WANMACHER; FERREIRA, 2006; GUICHARD et al., 2017; RAPOSO; PILLER, 2018).

Os agentes antineoplásicos classificados como antimetabólicos atuam na fase de síntese de DNA do ciclo celular. Essa ação consiste na inibição da biossíntese de componentes essenciais para a duplicação do material genético, desta forma, impede o metabolismo celular normal e, como resultado, a proliferação celular (GUICHARD et al., 2017).

Os antibióticos antineoplásicos possuem um mecanismo de ação que consiste na produção de radicais livres reativos, pela incorporação de excesso de elétrons em seus anéis insaturados, que vão interagir com o DNA e a síntese será inibida. Alguns antibióticos possuem



outros grupos funcionais, conferindo assim, diferentes propriedades como a alquilação, a inibição enzimática e a intercalação ao DNA (DE ALMEIDA et al., 2005; FUCHS; WANMACHER; FERREIRA, 2006).

Os inibidores mitóticos são agentes que atuam na fase da divisão celular, ocorre a paralisação da mitose atuando na tubulina, proteína que forma os microtúbulos, prejudicando a formação ou a desmontagem do fuso. Por conseguinte, a fase de metáfase é interrompida, uma vez que, a migração dos cromossomos fica impedida, culminando na interrupção da divisão celular. Assim, esses compostos bloqueiam a divisão do núcleo e promovem morte celular (FUCHS; WANMACHER; FERREIRA, 2006; GUICHARD et al., 2017).

Os agentes alquilantes são compostos orgânicos que consistem na capacidade de substituir um átomo de hidrogênio por um radical alquil em outra molécula. Compostos dessa natureza se ligam ao DNA e impedem a separação dos filamentos na dupla hélice e, conseqüentemente, a replicação do material genético. Promovendo assim, lesões no DNA e inviabilizando a proliferação celular (DILRUBA; KALAYDA, 2016).

Os primeiros quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer foram às mostardas nitrogenadas, pertencente a classe dos agentes alquilantes. Os complexos de platina inicialmente foram classificados como agentes alquilantes, porém atualmente sabe-se que as ligações entre o centro platínico e as bases nitrogenadas são de natureza coordenativa, o que descaracteriza a classificação alquilante, levando esta classe de compostos a uma nova categoria de quimioterápicos antineoplásicos. A cisplatina, a oxaliplatina e a carboplatina são exemplos de fármacos coordenativos (complexos de coordenação), amplamente utilizado no tratamento oncológico, com aprovação global de uso (SILVA; SILVA; BELIAN, 2018, DE ALMEIDA et al., 2005; DE VOS, 1978). Ainda, a Lobaplatina e Nedaplatina compõem essa classe, porém esses fármacos estão disponíveis apenas em alguns países como a China e o Japão, respectivamente (DILRUBA; KALAYDA, 2016).

Embora a quimioterapia seja um pilar importante da medicina oncológica, essa forma de tratamento apresenta limitações farmacológicas relacionadas aos efeitos adversos físicos e psicológicos causados. Além disso, a resistência intrínseca de alguns tumores a determinadas drogas utilizadas durante o tratamento, também têm sido apontadas como uma das principais causas de insucesso terapêutico e óbitos. Dessa forma, os estudos de novos compostos que possam gerar o menor impacto possível ao paciente tem sido um fator de suma importância para a busca de novos fármacos oncológicos (MILLER et al., 2019; WEAVER et al., 2012).

#### 1.4. METALOFÁRMACOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

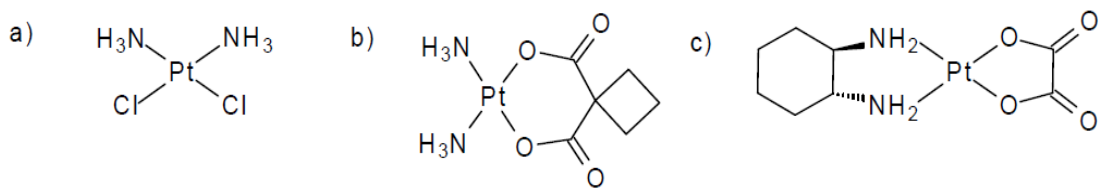
Elementos metálicos exercem importantes papéis relacionados a processos biológicos (MEDICI et al., 2015). É sabido que inúmeras atividades são exercidas por elementos inorgânicos, tais fatores, têm estimulado o desenvolvimento de fármacos à base de metais (MALDONADO et al., 2022; NIKOLAOU; DA SILVA, 2018).

Compostos contendo metais já são empregados como fármacos na medicina há cerca de 5.000 anos. O cobre, por exemplo, foi utilizado para esterilização de ferimentos pelos egípcios, assim como o ouro e o ferro também foram empregados na fabricação de medicamentos para úlceras e dores reumáticas, e o zinco, utilizado em processos de cicatrização desde a antiguidade até os dias de hoje (MEDICI et al., 2015; ORVIG; ABRAMS, 1999).

O envolvimento de compostos inorgânicos em tratamentos quimioterápicos do câncer tem sido objeto de estudo nas últimas três ou quatro décadas, principalmente aqueles contendo metais, a utilização desses compostos como fármacos cancerígenos foi muito limitado até a demonstração da atividade anticancerígena de complexos contendo platina por Rosenberg e colaboradores no final dos anos 60 (ROSENBERG et al., 1969).

A descoberta inicial da cisplatina, *cis*- [PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] ocorreu em 1845 por Michele Peyrone (MUHAMMAD; GUO, 2014). Em 1893, sua estrutura foi elucidada por Alfred Werner e, somente na década de 1960, Rosenberg e colaboradores descobriram ao acaso a atividade citotóxica desse composto, relatando as propriedades biológicas da droga na inibição sobre a divisão celular em cultura de bactéria *Escherichia coli* investigando efeitos de campos elétricos de determinados metais no processo de proliferação celular (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011; GHOSH, 2019; KÖBERLE; SCHOCH, 2021; RENSHAW; THOMSON, 1967; ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965).

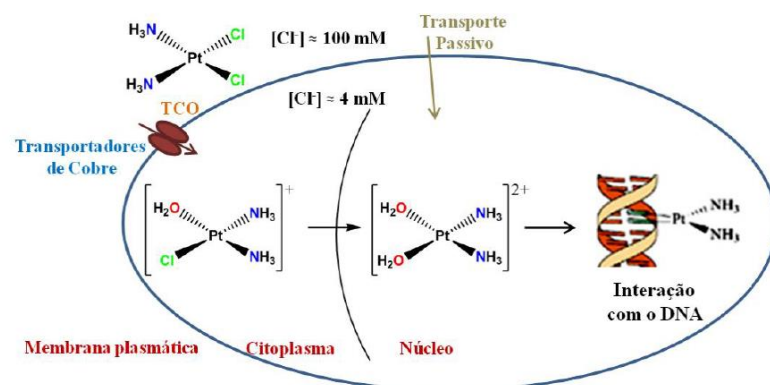
De fato, a descoberta de Rosenberg e o sucesso clínico da cisplatina e seus análogos (**Figura 7**) impulsionou a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos à base de metais (GHOSH, 2019; KÖBERLE; SCHOCH, 2021). Atualmente, a cisplatina é um dos fármacos mais utilizado amplamente para tratamento de diversos tipos de cânceres sólidos como o testicular, de ovário, câncer de bexiga, de pulmão, cervical, de cabeça e pescoço, câncer gástrico e muitos outros (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011; GHOSH, 2019).



**Figura 7.** Estrutura da cisplatina (a) e seus análogos carboplatina (b) e oxiplatina (c) (GHOSH, 2019).

Diversos trabalhos se dedicaram a investigar o mecanismo de ação da cisplatina e de seus compostos correlatos no organismo (FONTES ET AL., 2005), sendo hoje, amplamente reconhecido que essa droga exerce atividade anticancerígena por diversos mecanismos, sendo que o mais aceitável é a configuração de uma lesão a nível molecular pela interação com bases purinas no DNA, seguida pela ativação de várias vias de transdução de sinal, que finalmente levam à morte celular por apoptose ou necrose (GHOSH, 2019; LIPPARD, 1987; REEDIJK, 1992).

Evidências demonstram que a provável entrada da cisplatina na célula ocorrem por meio de duas vias principais: a difusão passiva (HALL et al., 2008; SPRECKELMEYER; ORVIG; CASINI, 2014) e a absorção facilitada por proteínas de transporte, incluindo as proteínas responsáveis pelo transporte de cobre (BURGER et al., 2011; SPRECKELMEYER; ORVIG; CASINI, 2014; WANG et al., 2012). Dentro da célula, a concentração de cloreto é de 4 mol/L, o que resulta na hidrólise da cisplatina. Os íons cloreto são então substituídos por moléculas de água, gerando espécies aquosas positivamente carregadas que podem reagir com sítios nucleofílicos de algumas macromoléculas intracelulares, formando adutos em proteínas, RNA e DNA (**Figura 8**). Esses adutos por sua vez, bloqueiam a replicação e a transcrição do DNA induzindo morte celular através de mecanismos de apoptose ou necrose (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011).



**Figura 8.** Representação esquemática da entrada da cisplatina na célula e sua posterior ligação com o DNA no núcleo (NEVES; VARGAS, 2011).

Os compostos baseados em platina disponíveis para tratamento do câncer possuem alto potencial farmacológico, porém muitos são os seus efeitos adversos em relação ao uso da droga, dentre os quais, destacam-se os problemas gastrointestinais, toxicidade hematológica, a nefrotoxicidade, a neurotoxicidade e a citotoxicidade, isso provavelmente está associado a platina não ser um metal essencial do organismo (HSIEH et al., 2018). Outro grande desafio inerente à cisplatina e seus análogos, é a quimiorresistência adquirida por alguns tumores a esse medicamento. A resistência pode ocorrer por diversos mecanismos, incluindo aumento do efluxo da droga, a inativação do fármaco por reação com glutathione e a reparação mais rápida de lesões de DNA. Tais fatores limitam sua aplicação e eficácia (GHOSH, 2019).

A descoberta do potencial terapêutico de complexos com outros centros metálicos além da platina vem demonstrando importantes resultados, alguns dos quais encontram-se em fase de ensaios clínicos. Outros compostos contendo cobre (Cu), ferro (Fe), cobalto (Co), paládio (Pd), ouro e zinco (Zn) também ganham destaque por apresentarem atuação antineoplásica promissora (CHEN; DESMARAIS; COSTA, 2019; MORCELLI et al., 2016; MOREIRA et al., 2019; NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017) Diante do exposto, torna-se necessário a pesquisa de outras moléculas que apresentem menor grau de citotoxicidade e maior seletividade na busca de novas terapias e métodos de prevenção para o tratamento do câncer.

## **1.5. COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE**

Estudos têm demonstrado que a presença de metais é necessária para muitos processos biológicos. Metais como cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), níquel (Ni) e magnésio (Mg) atuam em inúmeros processos do funcionamento no corpo incluindo, cofatores estruturais e catalíticos de metaloenzimas, envolvimento na respiração celular, biossíntese de neurotransmissores, produção de matriz colágena, defesa antioxidante, no metabolismo do ferro, dentre outras atividades. Por outro lado, alguns íons metálicos estão associados à distúrbios fisiológicos, doenças e nos processos de envelhecimento (HORN; BARRIENTOS, 2008; KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013; MAHAPATRA et al., 2019).

O cobre é um elemento traço essencial, uma vez que é considerado um dos metais endógenos mais importante para as funções biológicas do organismo (ALLEN et al., 2018), sendo facilmente captado e absorvido por células animais onde vai desempenhar papéis importantes como cofatores enzimáticos e catalizadores de reações citotóxicas (LU et al., 2019;

NG et al., 2014; SKROTT; CVEK, 2012; ZHANG et al., 2017). O íon cobre participa ainda da composição de determinadas metaloproteínas, como exemplo: a hemoglobina, responsável pela realização de transporte de oxigênio no sangue por ter o ferro presente em seu grupo heme; a superóxido dismutase, que pode apresentar em sua conformação cobre (Cu), zinco (Zn) ou manganês (Mn), atuando também como antioxidante; as anidrases carbônicas que atuam no transporte de CO<sub>2</sub>; e a cobalamina ou vitamina B12 que possui ligação ao íon de cobalto (Co) e atua no metabolismo de ácidos graxos, aminoácidos, síntese de metionina e manutenção da síntese de DNA (BILGINER et al., 2020; NIKOLAOU; DA SILVA, 2018; RHODES; DENAULT; VARACALLO, 2021; STONE; BASIT; MOHIUDDIN, 2021).

O estudo de compostos contendo metais como rutênio (Ru), gálio (Ga), ferro (Fe), paládio (Pd), ouro (Au), zinco (Zn), titânio (Ti), cobre (Cu) e cobalto (Co) tem progredido devido ao seu potencial antineoplásico promissor, e por muitas vezes promover menor citotoxicidade e maior atividade do que os compostos baseados em platina (BORGES, 2013; HORN et al., 2013; MACIEL et al., 2020; MORCELLI et al., 2016; TERRA et al., 2021).

A síntese de compostos de cobre atuando como agentes anticâncer, com base em ensaios *in vitro* e *in vivo* tem sido constantemente relatados e numerosos estudos mostram que muitos desses derivados exibem atividade citotóxica proeminente, geralmente relacionada à capacidade de ligar e clivar DNA das células cancerígenas e regulação da apoptose (BORGES et al., 2016; MANDEGANI et al., 2016; YANG et al., 2018). Além disso, este íon também tem apresentado propriedades terapêuticas como: ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória (BOULSOURANI et al., 2017; SHOBHA DEVI et al., 2018). Além de ser crescente o número de pesquisas investigando o potencial anticâncer do cobre, assim como de outros compostos com centros metálicos (MEDICI et al., 2015; SANTINI et al., 2014; SHOBHA DEVI et al., 2018).

Seguindo esta vertente, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido trabalhos com resultados preliminares promissores, relatando a síntese, a caracterização e a investigação da atividade biológica de diferentes compostos, dentre os quais, com centro de ferro (III) (HORN et al., 2013), cobre (II) (BORGES et al., 2016; FERNANDES et al., 2015; MACIEL et al., 2020; TERRA et al., 2021), cobalto (II) (MORCELLI et al., 2016) e platina (II) (MOREIRA et al., 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer é atualmente uma das principais causas de morte no mundo. Em 2021, cerca de 20 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer e 10 milhões foram a óbito devido a esta doença. Segundo a OMS, o número de novos casos tende a aumentar nas próximas décadas, as estimativas de mortalidade apontam que o câncer se tornará a principal causa de mortes até o ano de 2030. A maioria dos cânceres podem ser tratados, quando diagnosticados no estágio inicial, entretanto, a alta taxa de mortalidade está relacionada principalmente, com a demora de obtenção do diagnóstico da doença e a disponibilidade limitada de procedimentos curativos e paliativos no sistema público de saúde (TSUKAZAN et al., 2018; WHO, 2022).

Embora a pesquisa de novos métodos de tratamento que minimizem os impactos acarretados pelo câncer esteja ocorrendo em grande escala, ainda são necessários fármacos com maior eficácia e com menor efeito colateral, a fim de garantir a cura e/ou sobrevida dos pacientes.

A descoberta da propriedade antineoplásica da cisplatina tem estimulado várias pesquisas para o desenvolvimento de novos compostos de coordenação. Inúmeras estudos apontam que os complexos baseados em metais endógenos como o ferro, zinco e o cobre tem se apresentado com uma classe promissora de antitumorais, e acredita-se que eles sejam mais seletivos e menos tóxicos ao organismo em comparação aos metais não essenciais (KÖBERLE; SCHOCH, 2021; NEVES; VARGAS, 2011; SANTINI et al., 2014).

Nesse sentido, o grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia do Reconhecer, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, chefiado pelo Dr. Milton Kanashiro vem avaliando a atividade biológica de complexos metálicos com o intuito de desenvolver moléculas com atividade antineoplásica. Esses esforços têm sido relatados em várias publicações do grupo (MACIEL et al., 2020; MOREIRA et al., 2019; TERRA et al., 2021), dentre os quais alguns já possuem depósito de patentes. Deste modo, neste trabalho investigamos o potencial citotóxico de um complexo de platina (II), um complexo de cobre (II) tendo como ligante uma tiossemicarbazona inéditos na literatura.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Analisar a atividade citotóxica e o mecanismo de ação, *in vitro* dos compostos de coordenação de cobre (II), platina (II) e do ligante, frente a diferentes linhagens de células neoplásicas humanas.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos de cobre (II), platina (II) e do respectivo ligante frente as linhagens celulares de origem neoplásicas pelo ensaio de MTT; H460 e A549 (carcinoma de pulmão), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), PC3 (carcinoma de próstata), U937 (linfoma histiocítico), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e THP-1 (leucemia monocítica aguda);
- Determinar a concentração inibidora de 50% (IC<sub>50</sub>) dos compostos nas linhagens testadas a fim de se avaliar o potencial citotóxico;
- Selecionar a linhagem mais sensível ao tratamento com os compostos e investigar o processo de morte celular induzida através do ensaio de sub-G1 por citometria de fluxo;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial das células tratadas com o composto de cobre (H31), sendo este o composto mais ativo;
- Verificar a produção de ERO's nas células tratadas com o composto de cobre (H31).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. CULTIVO CELULAR

As seguintes linhagens celulares de câncer humano foram utilizadas neste estudo: H460 e A549 (carcinomas de pulmão), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), PC3 (carcinoma de próstata), U937 (linfoma histiocítico), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e THP-1 (leucemia monocítica aguda). As linhagens MDA-MB231, A549, PC3 são procedentes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e as demais linhagens citadas foram adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC) EUA.

A manutenção das células foi realizada em meio D-MEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium), suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (GIBCO, BRL) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Todas as culturas celulares foram incubadas em estufa (Forma Scientific, Inc, Modelo 3159 S/N 33808-427) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera umidificada. A manutenção do cultivo aconteceu a cada 2 dias.

### 4.2. DILUIÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS

Os compostos de cobre (II) (H31), platina (II) (H39) e o ligante (H36) foram sintetizados e cedidos pela Dr<sup>a</sup>. Josane Alves Lessa (Instituto Federal Fluminense – IFF Fluminense Campus Itaperuna). Todos os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), estocados na concentração de 10 mmol/L e mantido a -20 °C.

### 4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO MTT

Para avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos compostos e do ligante, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, com base na metabolização do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio (MTT), no qual determinou-se a concentração em que os compostos foram capazes de inviabilizar 50% da população de células de origem neoplásicas.

As células de carcinoma de pulmão H460 foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL/poço) na concentração 2x10<sup>5</sup> células/mL e tratadas com os complexos metálicos. As células foram expostas a diferentes concentrações (0-20 µmol/L) do composto de cobre (II) (H31); 0-200 µmol/L do composto de platina (II) (H39) e 0-2 µmol/L para o ligante (H36). As placas experimentais foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade



controlada. Após este processo, foram adicionados 20 µL de MTT (Sigma, 5,0 mg/mL) para cada 200 µL de cultivo, seguido da posterior incubação das placas por 4 horas. Após esse período, foram retirados 170 µL do sobrenadante de cada poço e, em seguida adicionados 120 µL de uma solução de isopropanol com 0,04% de HCl concentrado para a dissolução dos cristais de formazan produzidos por células viáveis. Posteriormente, a placa foi centrifugada (centrífuga HT®, modelo CN-5400) a 300 x g por 5 minutos e, então retirados 100 µL do sobrenadante de cada poço que foi transferido para uma nova placa de 96 poços. As leituras dos valores de absorvância das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (EPOCHTM, BioTax® Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 570 nm. Como controle negativo as células foram incubadas apenas com o meio de cultura D-MEM F12 e os experimentos foram realizados em triplicata.

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

Para a avaliação do ciclo celular por meio da análise do Sub-G1, as células de carcinoma de pulmão H460 foram semeadas na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL, em placa de 12 poços (500 µL/poço), tratadas com 2x IC<sub>50</sub> (µmol/L) do composto de cobre (II) (H31) e da cisplatina (fármaco padrão usado como controle positivo). As amostras foram incubadas por um período de 48 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi transferido (1mL) para microtubos identificados e centrifugados por 5 minutos a 200 x g. O *pellet* obtido foi lavado 2x com PBS e então adicionado lentamente ao *pellet* 1mL de etanol 70% gelado e as células submetidas a fixação por 30 minutos a 4°C.

Após esta etapa as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições e o *pellet* formado foi lavado com tampão fosfato-citrato (0,2 M, pH=7,8) e centrifugado por 5 minutos a 200 x g. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado foram adicionados 50 µL de RNase A (100µg/mL Sigma, R4875) e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir foi adicionado 400 µL de uma solução contendo iodeto de propídio (PI) (50µg/mL; Sigma, P4170). A fluorescência do conteúdo de DNA celular foi quantificada em citômetro de fluxo (FACS Calibur) em que foram contados 10.000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em sub-G1 foram obtidos através do *software* WinMDI versão 2.9.

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

A linhagem H460 foi tratada e incubada com o complexo de cobre (II) e a cisplatina como descrito no item anterior. Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (1mL) foi transferido para microtubos e centrifugados por 5 minutos a 200 x g. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* foram adicionados 500 µL de solução de JC-1 (25µg/mL, Sigma) diluídos em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL). Em seguida as células foram incubadas por um período de 15 minutos em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 200 x g e lavadas duas vezes com 1mL de meio de cultura D-MEM F12 (GIBCO, BRL). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido ressuspensionado em 500 µL de meio DMEM F12 não suplementado (GIBCO, BRL). A leitura foi realizada de imediato em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur™, modelo 342973). Os gráficos Dot-plot da porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos por meio do *software* WinMDI versão 2.9.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO's EM CÉLULAS H460 TRATADAS COM O COMPLEXO DE COBRE

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) reflete na integridade das mitocôndrias interferindo, portanto, na cadeia respiratória, o que pode ocasionar a morte celular programada. Com o intuito de avaliar se o tratamento com cobre (II) (H31) promove aumento da produção endógena de ERO's foi realizada a análise na presença e na ausência do inibidor de ERO's, utilizando o N-Acetil Cisteína (NAC, 5 mmol/L). A linhagem H460 foi semeada em placas de cultura de 6 poços contendo 500 µL de células/poço na concentração 3x10<sup>5</sup> células/mL. No 1º poço foi adicionado 500 µL do tratamento de cobre (II) (H31) (2x IC<sub>50</sub> = 1,8 µmol/L) + 5 mmol/L de NAC, no 2º poço 500 µL de tratamento de cobre (II) (H31) (2x IC<sub>50</sub> = 1,8 µmol/L) sem a presença do NAC. No 3º poço, foram adicionados 500 µL de células com tratamento da cisplatina (2x IC<sub>50</sub> = 50 µmol/L), e o 4º poço 500 µL de células sem tratamento apenas com meio de cultura D-MEM F12 (controle negativo). As células foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. Após esse período, as células foram marcadas com a sonda fluorescente DCFH-DA (2,5 µmol/L) (Sigma-Aldrich) e realizada a quantificação da fluorescência, referente à presença de ERO's, em citômetro de fluxo (FACS Calibur™, BD Sciences). A aquisição de dados foi determinada registrando 10.000 eventos por

amostras. Os resultados foram expressos como a razão da fluorescência das amostras tratadas e as do controle não tratado.

#### **4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Nos ensaios de citotoxicidade dos compostos foi realizado o teste estatístico *One-way* ANOVA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP para os estudos *in vitro*. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados através da curva de regressão não linear e os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 5.1. As diferenças significativas foram consideradas como \* P < 0,05, \*\* P<0,01, \*\*\*P<0,001.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS NA VIABILIDADE CELULAR

A propriedade citotóxica dos complexos de cobre (II) (H31) e da platina (II) (H39) foram determinadas por meio de ensaio colorimétrico com MTT. Nestes ensaios foram avaliadas as seguintes linhagens celulares de câncer humano H460 e A549 (carcinoma de pulmão), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), PC3 (carcinoma de próstata), U937 (linfoma histiocítico), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e THP-1 (leucemia monocítica aguda). Os valores de concentração inibitória  $IC_{50}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) gerados (**Tabela 1**) mostram que o complexo de cobre (II) H31 apresenta menor atividade citotóxica quando comparado ao ligante H36 e maior atividade comparado à platina (II) H39.

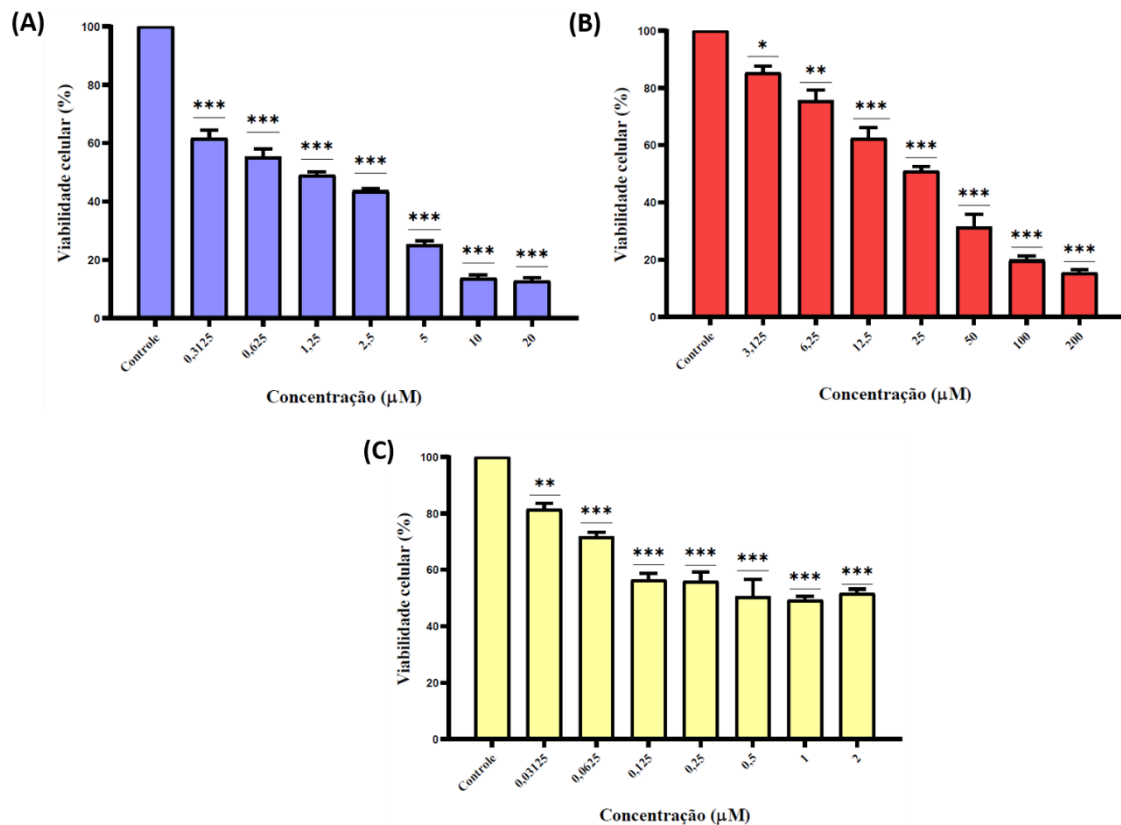
**Tabela 1.** Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) dos complexos cobre H31, Ligante H63 e Platina H39 contra linhagens neoplásicas humanas em 48 h de tratamento.

Linhagem	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )			
	H36 (Ligante)	H31 (Cobre)	H39 (Platina)	(*) Cisplatina
A549	0,4 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,5	56,8 $\pm$ 8,3	ND
H460	1,0 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,3	25,8 $\pm$ 2,6	24,5 $\pm$ 1,1
COLO 205	0,5 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 1,1	72,4 $\pm$ 1,1
MDA-MB-231	0,5 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,3	70,5 $\pm$ 7,6	24,2 $\pm$ 1,0
PC3	0,3 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	54,4 $\pm$ 1,5	14,3 $\pm$ 1,0
MOLT-4	0,03 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	17,04 $\pm$ 6,3	4,6 $\pm$ 4,1
THP-1	0,06 $\pm$ 0,02	1,75 $\pm$ 0,3	1,75 $\pm$ 0,3	14,2 $\pm$ 1,1
U-937	0,3 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 1,8	5,3 $\pm$ 1,1

(--) Não determinada.

(\*) Cisplatina: valor de  $IC_{50}$  reportado por Ribeiro (2020).

A **Figura 9** mostra os gráficos representativos dos testes de MTT realizados para determinar a concentração inibitória do complexo de cobre (II) (H31), do ligante (H36) e da platina (II) (H39) para a linhagem H460. Das linhagens testadas, a H460 (carcinoma de pulmão) foi uma das linhagens que mostrou sensibilidade similar ao tratamento com o composto de cobre (II) H31 e com o ligante H36, sendo por isso escolhida para dar continuidade aos demais experimentos, bem como pelo comportamento agressivo deste tipo de câncer.



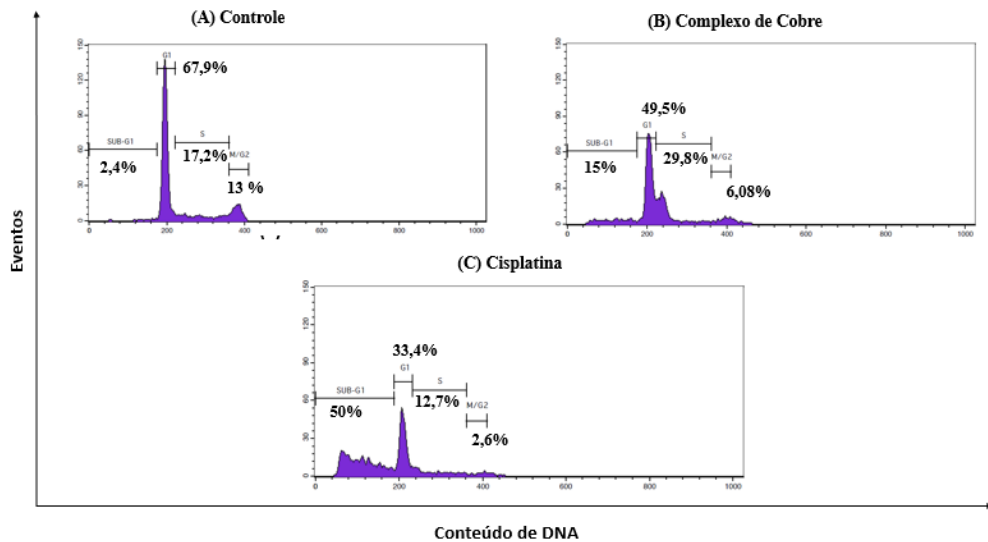
**Figura 9. Viabilidade das células H460 após exposição ao complexo de cobre (A), platina (B) e o ligante (C), por 48 horas.** As curvas de dose-respostas foram obtidas no ensaio com MTT. As diferenças significativas foram consideradas como \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

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

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pelo complexo de cobre (II) (H31) em células tumorais H460, foi realizado o ensaio que analisa a marcação do iodado de prodídeo (PI) para quantificar o conteúdo de DNA da célula após os tratamentos com os complexos. Em estágios tardios da apoptose, o conteúdo de DNA é clivado em fragmentos que podem ser quantificados na região do histograma denominada Sub- G1 (GONG et al., 1994). Isso ocorre devido a propriedade intercalante do PI com DNA após o rompimento das membranas celulares, e que são detectados por citometria de fluxo.

A linhagem H460 foi tratada com o complexo de cobre (II) (H31) e com a cisplatina, na concentração 2x IC<sub>50</sub>, por um período de 48 horas. A amostra com células não tratadas contendo apenas meio de cultura D-MEM F12 (controle negativo) (**Figura 10 A**) mostrou que apenas 2,4 % da população de células encontravam-se na região Sub-G1. Nas figuras relacionadas aos tratamentos com cobre (II) H36 (**Figura 10 B**) e cisplatina (**Figura 10 C**) observou-se um

deslocamento acentuado das populações celulares para a região Sub-G1. O tratamento com 1,8  $\mu\text{mol/L}$  de cobre (II) H31 deslocou 15% das células, enquanto os tratamentos com a 50  $\mu\text{mol/L}$  da cisplatina promoveu o deslocamento de 50% das células para o pico Sub-G1.

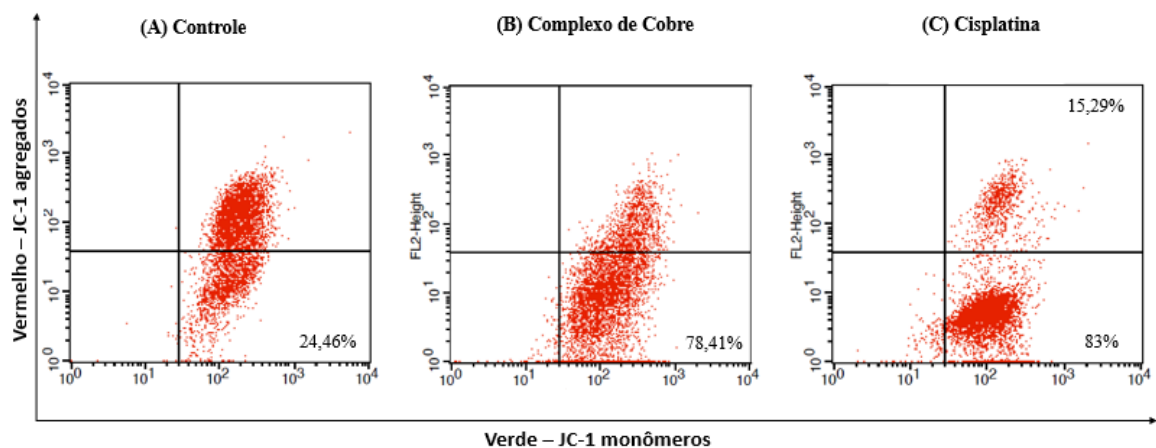


**Figura 10.** Histogramas referentes à análise do ciclo celular da linhagem H460, por citometria de fluxo. Células H460 incubadas por 48 horas e coradas com iodeto de propídio (PI). (A) células não tratadas, incubada com D-MEM F12 (controle); (B) células tratadas com o complexo de cobre (H31) (1,8  $\mu\text{mol/L}$ ); (C) células tratadas com a cisplatina (50  $\mu\text{mol/L}$ ).

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

O método de detecção por JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), indica possíveis alterações do potencial de membrana mitocondrial, uma vez que alterações na transição da permeabilidade mitocondrial é um passo importante na indução de apoptose. Assim, a verificação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) pode indicar se há ativação da via intrínseca da apoptose após um determinado estímulo (ZOROVA et al., 2018). O  $\Delta\Psi\text{m}$  foi avaliada usando a sonda fluorescente catiônica lipofílica JC-1. As células H460 foram tratadas com o complexo de cobre (II) (H31) na concentração 2x  $\text{IC}_{50}$  (1,8  $\mu\text{mol/L}$ ) e a cisplatina (50  $\mu\text{mol/L}$ ) por um período de 48 horas, e quantificadas por citometria de fluxo. A análise dos dados mostra que a população de células não tratadas está predominantemente concentrada no quadrante superior direito (75,16%), essa região corresponde a localização de células com suas mitocôndrias viáveis (**Figura 11 A**). As células tratadas com o cobre (II) (H31) (**Figura 11 B**) apresentam deslocamento nas populações

de células do quadrante superior direito para o quadrante inferior direito. Observa-se que o composto induziu a perda do  $\Delta\Psi_m$  em 78,41 % das células tratadas com o complexo. Já as células tratadas com a cisplatina na concentração 50  $\mu\text{mol/L}$  (**Figura 11 C**) também induziu a perda do potencial de membrana mitocondrial em 83%. Esses dados sugerem que houve despolarização da membrana mitocondrial e fornecem evidências de que o complexo de cobre (II) atua induzindo apoptose nas células de câncer pulmonar H460.

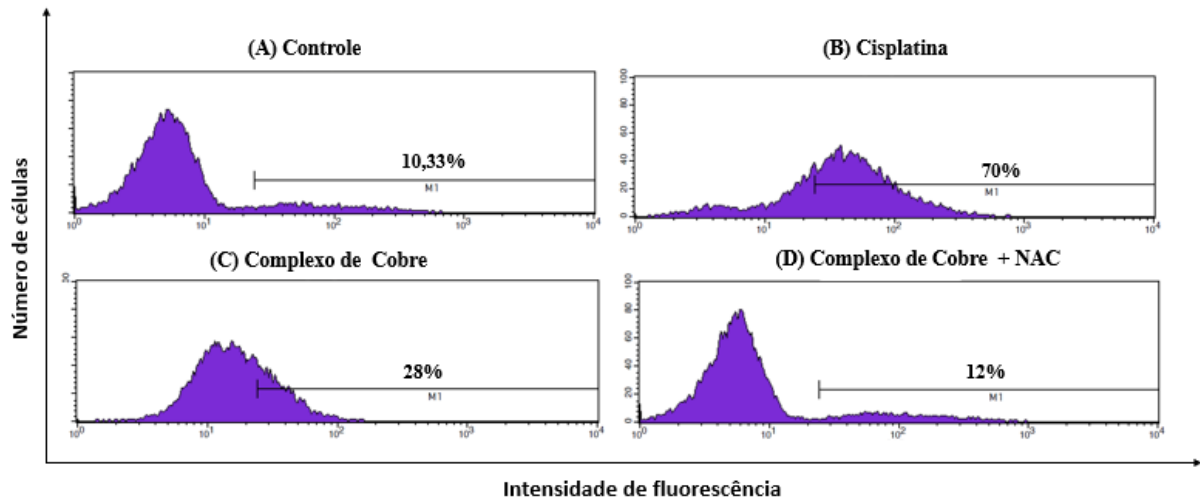


**Figura 11. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.** Células H460 incubadas por 48 horas e coradas com JC-1. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cobre (H31) (1,8  $\mu\text{mol/L}$ ) e (C) células tratadas com cisplatina (50  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO'S EM CÉLULAS H460 TRATADAS COM COMPLEXO DE COBRE

Uma vez demonstrado que o complexo de cobre (II) (H31) induz perda do  $\Delta\Psi_m$ , fez-se pertinente ampliar o conhecimento sobre a sua ação no que se refere à geração de ERO's. As células H460 foram tratadas por 48 horas com o composto de cobre (II) H31 e com a cisplatina, e então a produção de ERO's foi analisada com a sonda DCFH-DA e a emissão de fluorescência quantificada por citometria de fluxo. As concentrações dos tratamentos tanto de cobre (II) (H31) como da cisplatina foram as mesmas utilizadas nos ensaios anteriores, 1,8  $\mu\text{mol/L}$  e 50  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente. Foi utilizado também o inibidor de ERO's, o antioxidante NAC (5 mmol/L). A **Figura 12 A**, que representa as células sem tratamento, mostra que 10,33% das células H460 apresentam produção constitutiva de ERO's. Quando as células foram incubadas com a cisplatina e com o complexo de cobre (II), observa-se um aumento substancial de células com intensidade de fluorescência referente à geração de ERO's em 70% e 28% (**Figuras 12 B e 12 C**), respectivamente. Já o tratamento simultâneo das células H460 com o complexo de cobre

(II) e o antioxidante NAC bloqueou a geração de ERO's e observa-se um deslocamento drástico da população celular, cerca de 12% (**Figura 12 D**) em direção ao pico onde a intensidade de fluorescência é menor, sugerindo que a produção de ERO's também está envolvida na atividade antineoplásica apresentada por este complexo.



**Figura 12.** Análise da geração de ERO's por citometria de fluxo. A linhagem H460 foi incubada por 48 horas e marcada com a sonda DCFH-DA. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com cobre (II) ( $1,8 \mu\text{mol/L}$ ); (C) células tratadas com cisplatina ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) e (D) amostra pré-tratada por 2 h com  $5 \text{ mmol/L}$  de NAC antes da adição do complexo de cobre (II).



## 6. DISCUSSÃO

O tratamento do câncer envolve principalmente uma combinação entre intervenção cirúrgica, radioterapia e terapia medicamentosa sistêmica por meio de quimioterápicos (GALLUZZI et al., 2018; HALL et al., 2017). Devido aos elevados números de casos, muitas pesquisas vêm sendo realizadas em prol de desenvolvimento de novos agentes com atividade antineoplásica (HABALA; VALENTOVÁ, 2020; SANTINI et al., 2014). Neste sentido, fármacos que promovam um tratamento mais eficaz e com efeitos colaterais menos severos que os apresentados pelos de uso clínico atualmente, são fortes candidatos a agentes antitumorais.

Com tal intuito, o grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia do Reconhecer, coordenado pelo professor Milton Masahiko Kanashiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, vem avaliando tanto *in vitro* como *in vivo*, a atividade biológica de vários complexos metálicos com a finalidade de desenvolver moléculas com potencial antineoplásico. Compostos de coordenação com centro de ferro (III), cobalto (II), platina (II) e cobre (II) apresentaram resultados promissores (HORN et al., 2013; MACIEL et al., 2020; MOREIRA et al., 2019; TERRA et al., 2021). Sendo assim, faz-se pertinente a continuidade dessas pesquisas a fim de se determinar o potencial farmacológico de novos complexos e a possibilidade de desenvolvimento de moléculas antineoplásicas.

Este trabalho avaliou os efeitos citotóxicos de dois novos compostos de coordenação de cobre (II) (H31), platina (II) (H39) e o ligante orgânico contendo uma tiossemicarbazona (H36). O potencial citotóxico desses compostos foi confrontado com a cisplatina frente a um painel de 7 linhagens neoplásicas humanas: H460 e A549 (carcinoma de pulmão), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), PC3 (carcinoma de próstata), U937 (linfoma histiocítico), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e THP-1 (leucemia monocítica aguda), através do ensaio colorimétrico MTT. Como apresentado na Tabela 1, os resultados demonstraram que esses complexos, principalmente o de cobre (II) (H31) e o ligante (H31) sozinho, apresentaram propriedades citotóxicas acentuada contra as células de origem neoplásica, sendo que o complexo de cobre (II) (H31) foi marcadamente mais eficaz do que a cisplatina sobre todas as linhagens testadas. Ressalta-se ainda, que os resultados obtidos sobre as linhagens utilizadas não ultrapassaram o valor de  $IC_{50}$  de 2  $\mu\text{mol/L}$ . Ainda que os resultados obtidos sobre as linhagens MOLT-4, PC3 e U937 tenham apresentado valores de  $IC_{50}$  menores, a linhagem H460 (carcinoma de pulmão) foi selecionada para este trabalho por também apresentar elevada sensibilidade ao tratamento com o complexo de cobre (II) (H31), com uma  $IC_{50}$  de 0,9  $\mu\text{mol/L}$

contra 25  $\mu\text{mol/L}$  da cisplatina, bem como pelo comportamento agressivo e metastático da doença.

Salienta-se ainda que a atividade antitumoral com outros compostos de cobre (II) já foi relatada pelo nosso grupo. Fernandes e colaboradores (2015) demonstraram a atividade citotóxica de quatro complexos de cobre (II). O complexo contendo o grupo  $\alpha$ -naftol em seu ligante apresentou maior atividade do que a cisplatina frente à linhagem leucêmica U937 (8,2 vs 16,25  $\mu\text{mol/L}$ ). Além disso, no ensaio *in vivo*, o complexo apresentou uma  $\text{DL}_{50}$  de 55 mg/kg contra 14,5 mg/kg da cisplatina, evidenciando que o composto é quase quatro vezes menos tóxico do que o metalofármaco de referência. Maciel e colaboradores (2020) descreveram a propriedade antitumoral *in vitro* e *vivo* de um complexo de cobre (II) em 5 diferentes linhagens cancerígenas, sendo a linhagem de carcinoma de pulmão (H460) a mais sensível ao tratamento. Este complexo apresentou uma notável supressão do crescimento tumoral em lesões heterotópicas de células H460 em camundongos Balb/c *nude*, tanto em comparação do tratamento com a cisplatina, quanto com animais não tratados. Recentemente, foi relatado por Terra e colaboradores (2021) sobre a atividade farmacológica de 3 complexos de cobre (II) com diferentes ligantes. O complexo  $[\text{Cu}(\text{BPAH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  apresentou capacidade de induzir apoptose com comprometimento mitocondrial, além de apresentar seletividade para a linhagem cancerígena H460 em relação às células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Sendo assim, nossos dados estão de acordo com relatos descritos na literatura, que consideram os complexos de cobre (II) promissores no desenvolvimento de novos tratamentos para várias neoplasias malignas (KOŇARIKOVÁ et al., 2016).

Diante dos valores obtidos no teste de citotoxicidade, a pesquisa teve continuidade com a investigação do mecanismo de ação do complexo de cobre (II) (H31) na linhagem de carcinoma de pulmão (H460), uma vez que o composto apresentou uma boa atuação.

A investigação do processo de morte celular foi realizada através da análise do ciclo celular, que por meio da marcação com iodeto de propídio (PI) é possível quantificar a fragmentação do DNA na região denominada de Sub-G1, tal processo é característico da morte celular apoptótica (TANG et al., 2019). Esse evento de fragmentação é promovido pela ativação de endonucleases nos estágios finais do processo apoptótico (KAJSTURA et al., 2007). Os resultados apontaram que o composto de cobre (II) (H31) promove fragmentação do DNA na linhagem H460, ao deslocar a população celular para a região Sub-G1 em 15% quando tratadas com 2x  $\text{IC}_{50}$  por 48 horas (Figura 10 B). Desse modo, a indução de apoptose pelo complexo

H31 pode ser corroborada por estudos anteriores que obtiveram resultados semelhantes ao testar outros complexos de cobre (II) nas linhagens celulares de câncer de pulmão (H460), leucemia (THP-1) e linfoma (U937), respectivamente (AZEREDO et al., 2021; BORGES et al., 2016; FERNANDES et al., 2015).

Assim sendo, esses resultados são animadores já que a indução de apoptose é uma das principais considerações no desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos, dada a conexão conhecida entre o câncer e esse tipo de morte celular (PORTUGAL; BATALLER; MANSILLA, 2009).

Dessa forma, a capacidade do complexo de cobre (II) H31 de induzir morte celular por apoptose em células H460 foi, adicionalmente, investigada quanto a alterações no potencial de membrana mitocondrial e pela capacidade de induzir aumento na produção dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO's). A manutenção desse potencial é um evento essencial na viabilidade celular, pois a geração da maioria das moléculas de ATP, que fornecem energia para as funções básicas das células, depende da integridade da função desta organela (TANG et al., 2019; WONG, 2011). O colapso do potencial de membrana mitocondrial, desse modo, compreende um evento inicial da via intrínseca da apoptose (ZOROVA et al., 2018).

A perda da função mitocondrial foi avaliada usando a sonda fluorescente catiônica lipofílica JC-1. Após 48 horas de tratamento com o composto de cobre (II) H31 nas células H460, foi possível observar a perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM) em cerca de 78%, apresentando valores próximos da cisplatina, que também apresentou despolarização do PMM em 83 % da população celular (Figura 11 B e C), confirmando assim, que a atuação de ambos os tratamentos resulta em disfunção desta organela. Resultados semelhantes foram obtidos por Dhivya e colaboradores (2015) ao tratar células de câncer de mama (MDA-MD-231) com um composto de cobre (II) indicando a indução da apoptose através da via mitocondrial. Em outro estudo, Fernandes e colaboradores (2015), demonstraram ainda que células leucêmicas U937 quando tratadas com o composto de cobre (II), além de sofrerem perda do PMM, induziu também a liberação do citocromo c para o citoplasma e ativação de caspases 3, 6, 8 e 9, sugerindo que ambas as vias (extrínseca e intrínseca) de apoptose são ativadas. Ademais, compostos com outros centros metálicos de ferro (III), platina (II) e cobalto (II) também possuem capacidade de induzir alterações mitocondriais em diferentes células humanas de origem tumoral (HORN et al., 2013; MORCELLI et al., 2016).

Diante dos resultados promissores obtidos nos ensaios anteriores com o complexo de cobre (II) H31, fez-se pertinente ampliar o conhecimento sobre a sua ação no que se refere à geração de ERO's, e se essa propriedade seria também responsável pela atividade antineoplásica apresentada. Para determinar o nível constitutivo de ERO's presente em células H460 foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas sem e com a presença do antioxidante NAC por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, as células foram marcadas com a sonda fluorescente DCFH-DA. Nossos resultados demonstram que o complexo de cobre (II) se mostrou capaz de promover o aumento na produção de ERO's após o tratamento com 2x o IC<sub>50</sub> do complexo, aumentando em 28% da quantidade de células no pico onde se concentra maior intensidade de fluorescência, quando comparada com a amostra não tratada (Figura 12 A e C). Contudo, quando as células foram tratadas com 1,8 µmol/L do complexo de cobre (II) H31 e com pré-tratamento com NAC (5 mmol/L), houve uma diminuição das porcentagens (cerca de 12%) de células com marcação para presença de ERO's (Figura 12 D). Isso sugere que o pré-tratamento com o antioxidante promoveu uma diminuição nos níveis da produção de ERO's quando comparado ao tratamento isolado com o complexo de cobre (II) H31, sugerindo, dessa forma, que a produção de ERO's também está envolvida na atividade antineoplásica apresentada pelo complexo.

Resultados semelhantes foram obtidos para a linhagem de câncer de estômago (MGC80-3) após serem tratadas com os complexos de cobre (II) [Cu(L)C<sub>12</sub>]<sub>2</sub> e contra leucemia mieloide aguda (KG1α e Kasumi-1 AML) após tratamento com a combinação de um complexo de cobre (II) e disulfiram (DS/Cu), respectivamente (XU et al., 2017; YANG et al., 2018). Da mesma forma, Ruiz e colaboradores (2019), relataram sobre a atividade do complexo [PtCl(8-O-quinolina)], que aumentou a produção de ERO's em uma resposta dose dependente em tumores de osteossarcoma humano resistentes à cisplatina. Corroborando com nossos achados, Chan e colaboradores (2019), ao investigar a ação de um complexo de ferro, na presença do antioxidante NAC em células de câncer humano de língua (SCC-9) observaram que há uma pronunciada supressão do efeito citotóxico do complexo em estudo.

É importante enfatizar que compostos de coordenação com diferentes centros metálicos estão em crescente desenvolvimento na pesquisa de novos agentes anticâncer. Investigações com complexo de cobre (II), tornam-se atraentes, principalmente porque apresentam propriedades adequadas para aplicações biológicas, uma vez que o cobre <sup>2+</sup> é um oligoelemento crucial para a maioria dos organismos vivos, importante para a função de várias enzimas que envolvem reações de oxirredução. São inúmeros os exemplos na literatura de ligantes

complexados ao cobre (II), gerando compostos com elevada atividade contra diversos tipos de neoplasias (DENOYER et al., 2015; NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017; TAN et al., 2014; XIE; CAI; PENG, 2018).

Por conseguinte, a heterogenia das neoplasias é condição inquestionável da necessidade de estratégias inovadoras para contornar deficiências recorrentes nos tratamentos disponíveis atualmente. Desse modo, os dados acima mencionados demonstram que o composto de cobre (II) (H31) apresenta atividade relevante frente as células de carcinoma de pulmão H460, reduzindo de maneira significativa a sua viabilidade celular e induzindo morte celular apoptótica, sendo, por isso, promissor e instigante para a realização de estudos complementares, a fim de melhor elucidar a eficácia e o mecanismo de ação promovido por este novo complexo.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Este estudo demonstrou a atividade citotóxica *in vitro* de dois novos complexos inéditos na literatura, sendo um de cobre (II), denominado H31 e um complexo de platina (II) (H39) e o ligante orgânico (H36) contendo uma tiossemicarbazona;
- ✓ O complexo de cobre (II) H31 e o ligante (H31), sendo este testado isoladamente foram mais ativos que o complexo de platina (II) H39, frente a todas as células de origem neoplásica humanas.
- ✓ Os resultados demonstraram ainda que o complexo de cobre (II) (H31) foi marcadamente mais eficaz do que a cisplatina sobre todas as linhagens testadas.
- ✓ O complexo de cobre (II) H31 induziu fragmentação do DNA sugestiva de morte celular apoptótica em células H460 com ativação da via intrínseca;
- ✓ A análise com a sonda DCFH-DA sugere que o composto de cobre (II) H31 induz o aumento da produção de ERO's através da sua ação nas mitocôndrias.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.; AHSAN, H. Ras-Mediated Activation of NF- $\kappa$ B and DNA Damage Response in Carcinogenesis. <https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1721523>, v. 38, n. 4, p. 185–208, 20 abr. 2020.

ALBERTS, BRUCE.; WILSON, JOHN.; HUNT, TIM. Molecular biology of the cell. 2008.

ALLEN, L. H. et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. suppl\_4, p. 1995S-2027S, 1 dez. 2018.

ARFFMAN, M. et al. The impact of severe mental illness on mortality of lung cancer in Finland in 1990-2014. **European Journal of Public Health**, v. 28, n. suppl\_4, 1 nov. 2018.

ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. **Nature Reviews Drug Discovery** 2008 7:12, v. 7, n. 12, p. 1001–1012, 7 nov. 2008.

AZEREDO, N. F. B. et al. Effect of the hydroxamate group in the antitumoral activity and toxicity toward normal cells of new copper(II) complexes. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 34, n. 2, p. 229–244, 1 abr. 2021.

BARBOSA, I. R. et al. Cancer mortality in Brazil: Temporal Trends and Predictions for the Year 2030. **Medicine**, v. 94, n. 16, 6 abr. 2015.

BILGINER, S. et al. Novel sulphonamides incorporating triazene moieties show powerful carbonic anhydrase I and II inhibitory properties. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 325, 1 jan. 2020.

BORGES, F. V. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE COMPLEXOS DE COBRE E ZINCO FRENTE A CÉLULAS LEUCÊMICAS E MELANÔMICAS. 2013.

BORGES, L. J. H. et al. In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 128–140, 10 nov. 2016.

BOULSOURANI, Z. et al. Synthesis, structure elucidation and biological evaluation of triple bridged dinuclear copper(II) complexes as anticancer and antioxidant/anti-inflammatory agents. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 76, p. 1026–1040, 1 jul. 2017.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.

BURGER, H. et al. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 1, p. 22–34, 1 fev. 2011.

CHAN, L. P. et al. Tris(8-Hydroxyquinoline)iron induces apoptotic cell death via oxidative stress and by activating death receptor signaling pathway in human head and neck carcinoma

cells. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 63, 1 out. 2019.

CHEN, L.; HANN, B.; WU, L. Experimental models to study lymphatic and blood vascular metastasis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 103, n. 6, p. 475–483, 1 maio 2011.

CHEN, Q. Y.; DESMARAIS, T.; COSTA, M. Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 59, p. 537–554, 6 jan. 2019.

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

CHIPUK, J. E.; BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell Death & Differentiation** 2006 **13:8**, v. 13, n. 8, p. 1396–1402, 19 maio 2006.

CHOUAIB, S. et al. Tumor Plasticity Interferes with Anti-Tumor Immunity. **Critical Reviews & Trade; in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 91–102, 2014.

CONG, L. et al. Deep Learning Model as a New Trend in Computer-aided Diagnosis of Tumor Pathology for Lung Cancer. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 12, p. 3615–3622, 2020.

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

DE VOS, D. Platinum complexes as anticancer agent. **Chemisch Weekblad**, v. 74, n. OCT, p. 713, 1978.

DENOYER, D. et al. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer.” **Metallomics : integrated biometal science**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, 1 nov. 2015.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 1 nov. 2008.

DHIVYA, R. et al. In vitro antiproliferative and apoptosis-inducing properties of a mononuclear copper(II) complex with dppz ligand, in two genotypically different breast cancer cell lines. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 28, n. 5, p. 929–945, 22 out. 2015.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 2016 **77:6**, v. 77, n. 6, p. 1103–1124, 17 fev. 2016.

FERNANDES, C. et al. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 153, p. 68–87, 1 dez. 2015.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers** 2011, **Vol. 3, Pages 1351-1371**, v. 3, n. 1, p. 1351–1371, 15 mar. 2011a.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers** 2011, **Vol. 3, Pages 1351-1371**, v. 3, n. 1, p. 1351–1371, 15 mar. 2011b.



FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A Química Inorgânica na terapia do câncer. v. 6, p. 13–18, 2005.

FUCHS, F. D.; WANMACHER, L.;; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 616–617, dez. 2006.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2015 16:6, v. 16, n. 6, p. 329–344, 20 maio 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation** 2018 25:3, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 jan. 2018.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, 1 jul. 2019a.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, 1 jul. 2019b.

GONG, J. P.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314–319, 1 maio 1994.

GRUTTERS, J. P. C. et al. Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. **Radiotherapy and Oncology**, v. 95, n. 1, p. 32–40, 1 abr. 2010.

GUICHARD, N. et al. Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. **Analyst**, v. 142, n. 13, p. 2273–2321, 26 jun. 2017.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer. <https://doi.org/10.4161/rna.20481>, v. 9, n. 6, p. 703–719, 2012.

HABALA, L.; VALENTOVÁ, J. Metal complexes in medicine and pharmacy - the past and the present III. **Ceska a Slovenska Farmacie : Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti**, v. 69, n. 3, p. 121–129, 1 jan. 2020.

HALL, A. L. et al. Estimating National-Level Exposure to Antineoplastic Agents in the Workplace: CAREX Canada Findings and Future Research Needs. **Annals of work exposures and health**, v. 61, n. 6, p. 656–668, 1 jul. 2017.

HALL, M. D. et al. The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy\*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.080907.180426>, v. 48, p. 495–535, 9 jan. 2008.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New DimensionsHallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014b.

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

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

HORN, D.; BARRIENTOS, A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. **IUBMB life**, v. 60, n. 7, p. 421–429, 2008.

HSIEH, M. T. et al. Synthesis and antitumor activity of bis(hydroxymethyl)propionate analogs of pterostilbene in cisplatin-resistant human oral cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 14, p. 3909–3916, 7 ago. 2018.

HUANG, J. et al. A Prospective Study of Serum Vitamin E and 28-Year Risk of Lung Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, n. 2, p. 191–199, 1 fev. 2020.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 17 maio. 2022.

INCA. **Tratamento do câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Acesso em: 6 maio. 2022.

KAIM, W. ; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. v. 2, 2013.

KAJSTURA, M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry. Part A : the Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 71, n. 3, p. 125–131, 1 mar. 2007.

KALKAVAN, H.; GREEN, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death & Differentiation** 2018 25:1, v. 25, n. 1, p. 46–55, 20 out. 2017.

KAWADA, K.; TAKETO, M. M. Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression. **Cancer Research**, v. 71, n. 4, p. 1214–1218, 15 fev. 2011.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer** 1972 26:4, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.

KÖBERLE, B.; SCHOCH, S. Platinum Complexes in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. **Cancers** 2021, Vol. 13, Page 2073, v. 13, n. 9, p. 2073, 25 abr. 2021.

KOŇARIKOVÁ, K. et al. Autophagy in MCF-7 cancer cells induced by copper complexes. **Pharmacological reports : PR**, v. 68, n. 6, p. 1221–1224, 1 dez. 2016.

- KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell stem cell**, v. 14, n. 3, p. 275–291, 6 mar. 2014.
- KUMAR, D. et al. Synthesis of novel 1,2,4-oxadiazoles and analogues as potential anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 7, p. 3085–3092, jul. 2011.
- LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature** **2011 469:7330**, v. 469, n. 7330, p. 323–335, 20 jan. 2011.
- LIPPARD, S. J. Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 731–742, 1 jan. 1987.
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 4, p. 643–649, 1 ago. 1964.
- LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Caspase-independent cell death? **Oncogene** **2004 23:16**, v. 23, n. 16, p. 2766–2773, 12 abr. 2004.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 123, p. 95–113, 1 mar. 2018.
- LU, X. et al. Discovery of  $\beta$ -carboline copper(II) complexes as Mcl-1 inhibitor and in vitro and in vivo activity in cancer models. **European journal of medicinal chemistry**, v. 181, 1 nov. 2019.
- 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. 111166, 1 set. 2020a.
- 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, 1 set. 2020b.
- MAHAPATRA, D. K. et al. Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 174, p. 142–158, 15 jul. 2019.
- MAJEWSKI, J. M. et al. Qualidade de vida em mulheres submetidas à mastectomia comparada com aquelas que se submeteram à cirurgia conservadora: Uma revisão de literatura. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 17, n. 3, p. 707–716, mar. 2012.
- MALDONADO, Y. D. et al. New silver(I) phosphino complexes: Evaluation of their potential as prospective agents against Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 227, p. 111683, 1 fev. 2022.
- MANDEGANI, Z. et al. Synthesis, characterization, DNA binding, cleavage activity, cytotoxicity and molecular docking of new nano water-soluble  $[M(5-CH_2PPh_3-3,4-salpyr)](ClO_4)_2$  (M = Ni, Zn) complexes. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 15, p. 6592–6611, 12 abr. 2016.
- MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nature Reviews Cancer** **2012 12:5**, v. 12, n. 5, p. 323–334, 19 abr. 2012.

- MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 1 fev. 2015.
- MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 1 set. 2019.
- 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, 1 ago. 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, 1 maio 2019.
- MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 144–153, 1 abr. 2014.
- NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy &ndash; an update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 599–616, 3 mar. 2017.
- NEVES, A. P. ; VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer . p. 196–209, 2011.
- NG, C. H. et al. Selective anticancer copper(II)-mixed ligand complexes: targeting of ROS and proteasomes. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 6, n. 4, p. 892–906, 2014.
- NIKOLAOU, S.; DA SILVA, C. F. N. CONSIDERAÇÕES SOBRE TEXTOS QUE TRATAM DO DESENVOLVIMENTO DE METALOFÁRMACOS DE RUTÊNIO. **Quim. Nova**, v. 41, n. 7, p. 833–838, 2018a.
- NIKOLAOU, S.; DA SILVA, C. F. N. CONSIDERAÇÕES SOBRE TEXTOS QUE TRATAM DO DESENVOLVIMENTO DE METALOFÁRMACOS DE RUTÊNIO. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 833–838, 1 jul. 2018b.
- NYGREN, P. What is cancer chemotherapy? <http://dx.doi.org/10.1080/02841860151116204>, v. 40, n. 2–3, p. 166–174, 2009.
- OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 23 out. 2020.
- ORTH, M. et al. Current concepts in clinical radiation oncology. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 53, n. 1, p. 1–29, 20 out. 2014.
- ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2202–2203, 1999.
- PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 3, p. 460, 20 jan. 2014.
- PEIXOTO, M. S.; DE OLIVEIRA GALVÃO, M. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Cell death pathways of particulate matter toxicity. **Chemosphere**, v. 188, p. 32–48, 1 dez. 2017.
- PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 165, n. 2, p. 272–276, 1 out. 2018.

- PLAKS, V.; KONG, N.; WERB, Z. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 225–238, 5 mar. 2015.
- PORTUGAL, J.; BATALLER, M.; MANSILLA, S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. **Tumori**, v. 95, n. 4, p. 409–421, 29 jan. 2009.
- PUGAZHENDHI, A. et al. Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1–2, p. 104–111, 25 mar. 2018.
- RAPOSO, A. E.; PILLER, S. C. Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle. **Cell Division** **2018** **13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 20 mar. 2018.
- REEDIJK, J. The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds. **Inorganica Chimica Acta**, v. 198–200, n. C, p. 873–881, 1 ago. 1992.
- RENSHAW, E.; THOMSON, A. J. Tracer studies to locate the site of platinum ions within filamentous and inhibited cells of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 94, n. 6, p. 1915–1918, 1967.
- RHODES, C. E.; DENAULT, D.; VARACALLO, M. Physiology, Oxygen Transport. **StatPearls**, 19 nov. 2021.
- ROSENBERG, B. et al. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. **Nature** **1969** **222:5191**, v. 222, n. 5191, p. 385–386, 1969.
- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature** **1965** **205:4972**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1 fev. 1965.
- ROZPEDEK, W. et al. The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. **Current Molecular Medicine**, v. 16, n. 6, p. 533–544, 5 jun. 2016.
- RUIZ, M. C. et al. In vitro and in vivo anticancer effects of two quinoline-platinum(II) complexes on human osteosarcoma models. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 681–692, 8 abr. 2019.
- SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene** **2004** **23:16**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 12 abr. 2004.
- SANTINI, C. et al. Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815–862, 8 jan. 2014.
- SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 990–995, 5 nov. 2004.
- SHOBHA DEVI, C. et al. Recent Advances in Copper Intercalators as Anticancer Agents. **Journal of fluorescence**, v. 28, n. 5, p. 1195–1205, 1 set. 2018.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 1 jan. 2019.
- SILVA, D.; SILVA, R. G. ;; BELIAN, W. E. ; Quimioterápicos Antineoplásicos à Base de Platina Sob a Luz da Biologia Evolutiva Antineoplástica Chemotherapics Platinum-Based Under the Light of Evolutionary Biology. **Rev. Virtual Quim**, v. 10, n. 5, p. 1140–1167, 2018.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2018 **20:3**, v. 20, n. 3, p. 175–193, 17 jan. 2019.

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

SKROTT, Z.; CVEK, B. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 12, p. 1184–1192, 10 set. 2012.

SPRECKELMEYER, S.; ORVIG, C.; CASINI, A. Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metallodrugs: An Overview beyond Cisplatin. **Molecules** 2014, **Vol. 19**, Pages **15584-15610**, v. 19, n. 10, p. 15584–15610, 29 set. 2014.

STONE, W. L.; BASIT, H.; MOHIUDDIN, S. S. Biochemistry, Antioxidants. **StatPearls**, 9 maio 2021.

SU, L. J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

TAN, C. P. et al. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 6, n. 5, p. 978–995, 2014a.

TAN, C. P. et al. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 978–995, 23 abr. 2014b.

TANG, D. et al. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research** 2019 **29:5**, v. 29, n. 5, p. 347–364, 4 abr. 2019.

TERRA, W. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE II COM LIGANTES N,O-DOADORES WAGNER DA SILVA TERRA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ AGOSTO-2016. 2016.

TERRA, W. DA S. et al. Antitumor activity via apoptotic cell death pathway of water soluble copper(II) complexes: effect of the diamino unit on selectivity against lung cancer NCI-H460 cell line. **BioMetals**, v. 34, n. 3, p. 661–674, 1 jun. 2021.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 347, n. 6217, p. 78–81, 2 jan. 2015.

TSUKAZAN, M. T. R. et al. Management of lung nodules in Brazil-assessment of realities, beliefs and attitudes: a study by the Brazilian Society of Thoracic Surgery (SBCT), the Brazilian Thoracic Society (SBPT) and the Brazilian College of Radiology (CBR). **Journal of thoracic disease**, v. 10, n. 5, p. 2849–2856, 1 maio 2018.

VANDEN BERGHE, T. et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117–129, 1 jun. 2013.

WANG, S. et al. A Review on Curability of Cancers: More Efforts for Novel Therapeutic Options Are Needed. **Cancers** 2019, Vol. 11, Page 1782, v. 11, n. 11, p. 1782, 13 nov. 2019.

WANG, X. et al. Activation of carboplatin and nedaplatin by the N-terminus of human copper transporter 1 (hCTR1). **Chemical Science**, v. 3, n. 11, p. 3206–3215, 1 out. 2012.

WEAVER, K. E. et al. Mental and physical health-related quality of life among U.S. cancer survivors: population estimates from the 2010 National Health Interview Survey. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 21, n. 11, p. 2108–2117, nov. 2012.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre : [s.n.].

WHO. **WHO | World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em: 17 maio. 2022.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 30, n. 1, 2011.

XIAO, W. Y. et al. Paclitaxel Induce Apoptosis of Giant Cells Tumor of Bone via TP53INP1 Signaling. **Orthopaedic Surgery**, v. 11, n. 1, p. 126–134, 1 fev. 2019.

XIE, F.; CAI, H.; PENG, F. Anti-prostate cancer activity of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazide copper complexes in vivo by bioluminescence imaging. **Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 949–956, 1 ago. 2018.

XU, B. et al. Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- $\kappa$ B and Nrf2. **Cell death & disease**, v. 8, n. 5, p. e2797, 18 maio 2017.

XU, W. et al. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 30017–30034, 31 ago. 2015.

YANG, Q. Y. et al. Syntheses, Crystal Structures, and Antitumor Activities of Copper(II) and Nickel(II) Complexes with 2-((2-(Pyridin-2-yl)hydrazono)methyl)quinolin-8-ol. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, 1 jul. 2018.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 124–131, 1 abr. 2010.

ZHANG, Z. et al. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 1, p. 3–11, 1 jan. 2017.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 124–128, jun. 2004.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 1 jul. 2018.