

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito antitumoral *in vitro* de complexos de cobre(II) em células tumorais de colo de útero

Camila Vieira Verardo

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito antitumoral *in vitro* de complexos de cobre(II) em células tumorais de colo de útero

Camila Vieira Verardo

Prof. Dr. Rone Cardoso

Profa. Dra. Veridiana Melo Rodrigues Ávila

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito antitumoral *in vitro* de complexos de cobre(II) em células tumorais de colo de útero

Camila Vieira Verardo

Prof. Dr. Rone Cardoso  
Instituto de Genética e Bioquímica

Profa. Dra. Veridiana Melo Rodrigues Ávila  
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito antitumoral *in vitro* de complexos de cobre(II) em células tumorais de colo de útero

Camila Vieira Verardo

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_/\_\_/\_\_ Nota: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Rone Cardoso

Uberlândia, de de

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Zenaide Vieira e Geraldo Verardo, por todo amor incondicional, carinho, dedicação, parceria, respeito e por me proporcionarem a oportunidade de realizar o sonho de cursar a Biotecnologia.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, por guiar meu caminho e pelas oportunidades oferecidas e por me ajudar a conduzir minha vida com perseverança e coragem para superar as dificuldades do caminho.

Aos meus amados pais, Zenaide Vieira e Geraldo Verardo, por terem me lapidado e direcionado a construir meu caminho e por me mostrarem o quanto é bom amar quem nos ama na mesma intensidade.

Ao Prof. Dr. Rone Cardoso, pelo auxílio durante a elaboração desse trabalho, a disponibilidade de tempo a mim atribuída, pela humildade, mostrando sempre estar disposto à discussão científica e a sugestões. Por ter acreditado em mim e por me incentivar à sempre buscar novos conhecimentos.

À Prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela co-orientação, pelo aprendizado, pela disponibilidade e por ter contribuído significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.

A equipe do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox) pelos ensinamentos profissionais e pelo apoio a continuar trabalhando mesmo nos momentos de dificuldade.

Aos amigos que conquistei em Uberlândia Jéssica Oliveira, Leticia Guerra, Pedro Henrique Machado, João Vitor Leite, Asaph Diniz, Clésio Purcina, Géssyca Ferreira e Gabriela Ruy obrigada por todo carinho, companheirismo, respeito, diversão e aprendizado durante esses anos de graduação na UFU.

Aos meus amigos distantes por me incentivarem e torcerem muito por essa conquista. Em especial ao Victor Hugo Brait e a Ana Caroline Reis pelo companheirismo diário, mesmo com outras ocupações e preocupações.

## RESUMO

O câncer de colo de útero é frequente na população feminina. Estimativas apontaram que para o ano de 2016, haveria uma incidência de 7,9% de novos casos de câncer de colo de útero no Brasil. Pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos medicamentos antitumorais tornam-se relevantes a medida que os tratamentos convencionais apresentam efeitos adversos graves. Para tanto, os complexos metálicos vêm sendo estudados como alternativas promissoras na terapia do câncer. Neste trabalho, foram avaliados três complexos de cobre(II) com ácido quináldico, sendo associados aos ligantes fenantrolina (C7), bipyridina (C8) e ácido quináldico (C9), e seus ligantes isolados em linhagens celulares de câncer de colo de útero e células endoteliais de veia umbilical humana. Foi analisado a capacidade citotóxica dos complexos e dos ligantes e, para os complexos que apresentaram melhor toxicidade celular foram conduzidos os ensaios de antiproliferação celular, mecanismo de morte e inibição da adesão da linhagem tumoral testada. O complexo C9 não apresentou efeitos significativos de citotoxicidade. Os complexos C7 e C8 apresentaram citotoxicidade significativa apenas nas células tumorais e, para o ensaio de antiproliferação celular, ambos foram capazes de inibir a proliferação dessas células. Ainda sobre o complexo C7 observou-se capacidade de morte celular por apoptose e de inibir a adesão das células tumorais. Os compostos químicos isolados não apresentaram atividades citotóxicas relevantes.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Câncer: aspectos gerais .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Características da doença .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Câncer de colo de útero .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Diagnóstico e tratamentos contra o câncer .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Complexos metálicos usados no tratamento contra o câncer .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Complexos de cobre no tratamento contra o câncer .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Complexos de cobre .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Cultura de células .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Avaliação de citotoxicidade .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Ensaio de antiproliferação celular pela técnica de Cytoselect .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5. Ensaio de apoptose celular .....</b>	<b>18</b>
<b>3.6. Ensaio de adesão celular por meio da técnica colorimétrica de MTT .....</b>	<b>18</b>
<b>3.7. Métodos estatísticos para plotagem dos gráficos .....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>33</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Câncer: aspectos gerais

A palavra “câncer” origina-se do grego *karkínos*, cujo significado é “caranguejo” (INCA, 2017). Assim, a terminologia “câncer” é utilizada para designar um conjunto de doenças as quais estão relacionadas com uma desordem celular no seu crescimento e desenvolvimento, portanto, associada a perda de mecanismos normais de controle celulares que administram a proliferação e diferenciação das células (KATZUNG *et al.*, 2014).

A grande maioria dos casos recorrentes da doença estão associados ao estilo de vida, sexo, idade, raça, pré-disposição genética, além de riscos ambientais e fatores comportamentais (KATZUNG *et al.*, 2014). A alimentação apresenta uma influência direta sobre o câncer em desenvolvimento, como, por exemplo, a ingestão de quantidades significativas de aflatoxina (substância tóxica e cancerígena produzida por fungos; recorrente em países da Ásia e da África) e a obesidade associada à baixa prática de exercícios físicos (sendo muito observados em países desenvolvidos, como Europa e América do Norte). Além disso, existem ainda, outros hábitos que atuam positivamente para a ocorrência do câncer e que estão relacionados com a exposição excessiva ao sol e à ambientes poluídos (como o solo, o ar e água), assim como ao consumo de álcool e drogas e alguns medicamentos. Ainda, é possível que o câncer esteja associado com alguns agentes infecciosos tal como o vírus da Hepatite B (HBV), que pode provocar câncer no fígado. Adicionalmente, outras inflamações crônicas que acarretam danos no DNA e em tecidos podem alterar características genéticas estando, portanto, relacionadas com o desenvolvimento de certos tipos de cânceres (STEWART; WILD, 2014).

De acordo com Rang *et al.* (2016), o câncer é considerado como a segunda maior causa de mortes em países desenvolvidos e ocorre principalmente na idade adulta. O Instituto Nacional de Câncer mostra que, em um projeto denominado de “Globocan” realizado pela *International Agency for Research on Cancer* (Iarc), da Organização Mundial da Saúde (OMS),

em 2012 mais de 60% dos 14 milhões de novos casos da doença e 70% dos 8 milhões de mortes causadas pelas consequências do câncer, ocorrem em países desenvolvidos. Além disso, o mesmo projeto aponta que é possível observar a incidência de alguns tipos de câncer em países em desenvolvimento que se assemelha aos países desenvolvidos (INCA; 2016).

De acordo com o INCA (2016), os cânceres com maiores taxas de incidência no mundo são: pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão); sendo que, desses, há uma maior ocorrência de câncer de pulmão (16,7%), próstata (15%) nos homens e, nas mulheres, há uma frequência de câncer de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%). Ainda de acordo com órgão em questão, quando partimos para uma análise nacional dos casos da doença, tem-se que, para o biênio de 2016-2017, estimou-se uma ocorrência de 600 mil novos casos, em que os mais comuns na população masculina serão: próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%); já na população feminina: mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%). A figura 1 reafirma esses dados apresentando as incidências para o ano de 2016 dos casos de ocorrência de câncer tanto em homens quanto em mulheres, com exceção do melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Côlon e Reto	17.620	8,6%
Côlon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

**Figura 1.** Incidência de casos de câncer no ano de 2016 no Brasil, com exceção do melanoma (Fonte: INCA, 2016).

## 1.2. Características da doença

As células do nosso corpo portam-se de maneira harmônica, enviando, recebendo e interpretando informações advindas do seu entorno por meio de sinais que indicam seu

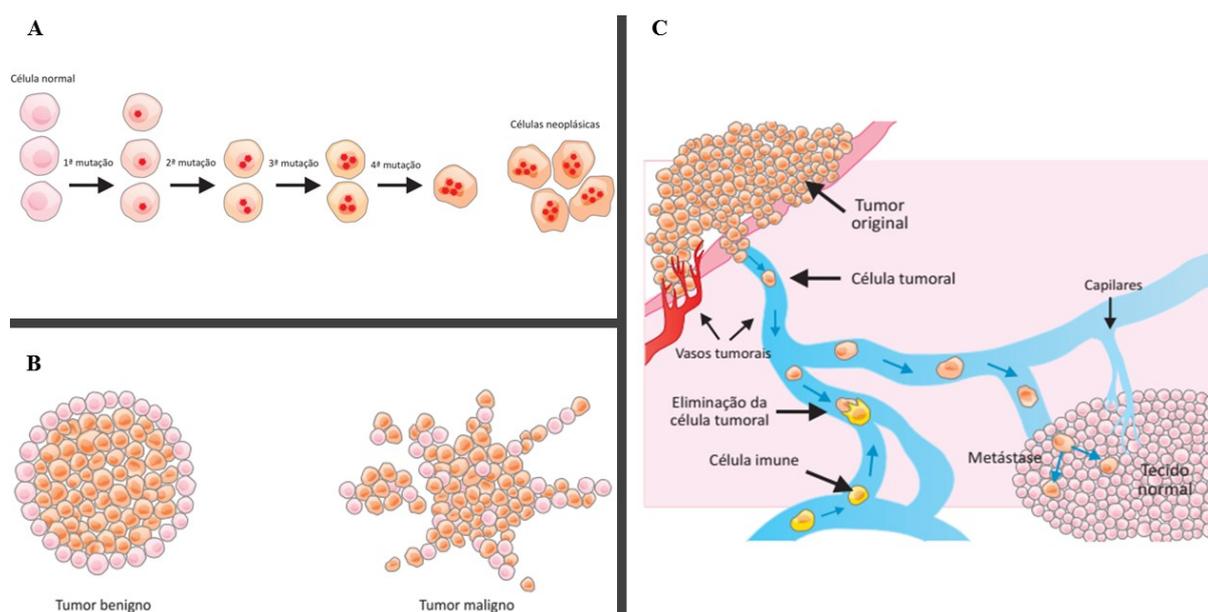
comportamento. Quaisquer alterações moleculares nesse modo de organização geram problemas para o funcionamento do organismo como um todo (ALBERTS *et al.*, 2010).

Durante muito tempo foi questionado pela comunidade científica quais as características representativas das células de câncer que as tornavam diferentes das células normais dos organismos. As respostas para tais questões foram sanadas com o advento do estudo da genética (STEWART; WILD, 2014). De forma geral, o corpo humano possui cerca de  $10^4$  células, sendo que, uma quantidade significativa delas (bilhões) podem sofrer mutações genéticas que podem produzir vantagens seletivas para algumas células em relação as demais. Determinadas mutações podem incluir um melhor crescimento e desenvolvimento celular, possibilitando assim uma maior sobrevivência dessas células. Tais eventos são os princípios básicos para formação de um câncer (ALBERTS *et al.*, 2010). A figura 2-A ilustra como uma sucessão de mutações, que geram alterações no DNA, podem levar a formação de células neoplásicas.

O número de mutações que um indivíduo pode sofrer, está relacionado com a idade do mesmo, isto é, quanto mais velho o paciente, maior é a ocorrência de mutações celulares, uma vez que, diversas funções celulares diminuem progressivamente com a idade, as células remanescentes reduzem a capacidade de reparar as lesões cromossômicas, viabilizando assim o desenvolvimento de células tumorais. Ciclos repetidos de mutações produzidos como consequência da competição e seleção natural, podem, por uma eventualidade, levar a formação de uma massa celular anormal, formando os chamados “tumores” (VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

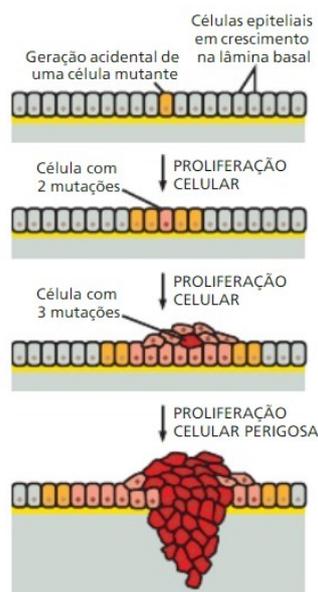
A proliferação celular contínua devido a exposição persistente de agentes carcinógenos é denominada de tumorigênese ou oncogênese (WELCH *et al.*, 2000). Um tumor é considerado como benigno quando o crescimento celular acontece de forma lenta e em uma única massa de células. Ao contrário, um tumor é considerado maligno quando neoplasias (“novo crescimento”) são capazes de atingir células em sua proximidade atuando de modo mais agressivo e com alta capacidade de disseminação pelo organismo (SANTOS *et al.*, 2011)

(figura 2-B). De acordo com Vogelstein et al. (2013), a propensão das células tumorais à invasão, propicia o seu desprendimento dos tecidos e, como consequência, acabam entrando na corrente sanguínea ou vasos linfáticos formando tumores secundários que são, comumente, denominados de “metástase” (figura 2-C). Além disso, a capacidade que as neoplasias possuem de invadir suas proximidades dificulta os procedimentos cirúrgicos de remoção das mesmas, impossibilitando sua erradicação (SANTOS *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Características que envolvem a origem e desenvolvimento de um tumor; **A)** Como a ocorrência de uma mutação pode levar à formação de células cancerosas - neoplásicas, isto é, quando uma célula anormal cresce e se desenvolve de maneira anormal dando origem a um tumor; **B)** Diferença entre os tipos de tumores: benigno (não invade células adjacentes) e maligno (capacidade de invasão de outras células); **C)** Capacidade de células tumorais malignas de se desprenderem da massa tumoral inicial e adentrarem na corrente sanguínea ou linfática, causando um processo chamado de metástase (Fonte: modificado de INCA, 2016).

Uma outra característica dos tumores consiste no fato de que a proliferação de clones mutados os quais aceleram a evolução do tumor, promovem um aumento na população de células que podem sofrer novas mutações genéticas e epigenéticas (figura 3). O aumento dessa diversidade genética promovida pela proliferação das células cancerosas consiste em mais um fator que dificulta a erradicação do câncer nesse estágio de evolução (ALBERTS *et al.*, 2017).



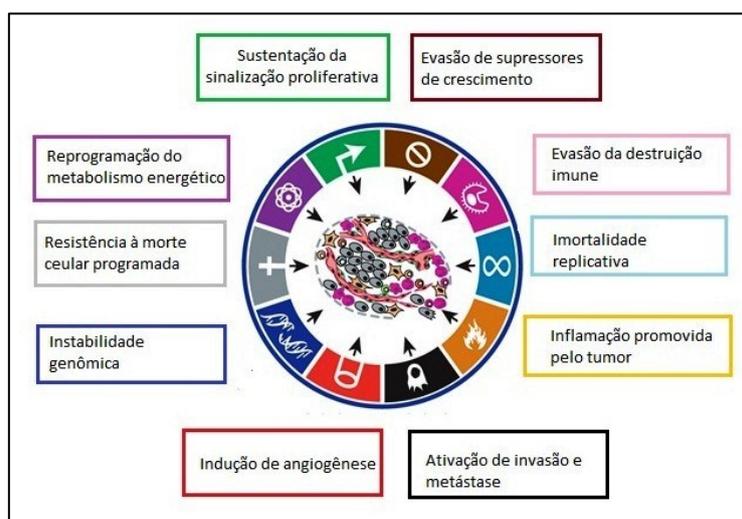
**Figura 3.** Proliferação das células cancerosas e mutações sucessivas (Fonte: adaptado de ALBERTS et al. 2017).

Os tumores, na maioria dos casos, são monoclonais, isto é, cada tumor origina-se de uma única célula, sendo que as células cancerosas são resultado de um processo evolutivo, que envolve gerações sucessivas com comportamentos anormais (STEWART; KLEIHUES, 2003). Desta forma, uma única mutação não é capaz de tornar uma célula normal em uma cancerosa (VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

Os cânceres podem ser classificados de acordo com o tipo de tecido e tipos celulares dos quais descendem. Desta forma, os tumores malignos incluem os sarcomas, que são tumores malignos heterogêneos derivados de células e tecidos mesenquimais (D'ANGELO *et al.*, 2014), os carcinomas, provenientes de células epiteliais (CARVALHO, 2010), e os demais que não se enquadram nessas classificações incluem as leucemias e linfomas, que emanam de leucócitos ou células hematopoiéticas. Quando se trata de tumores benignos, há, também, uma classificação para cada tipo (ALBERTS *et al.*, 2017): os adenomas, que acontecem nas glândulas, os lipomas, que apresentam sua origem nos tecidos gordurosos, e os miomas, provenientes do tecido muscular liso (INCA, 2016).

Ainda é importante considerar uma outra explanação sobre o câncer que são conhecidos como “Hallmarks of Cancer”, ou seja, de acordo com Hanahan e Weinberg (2015), existem dez

(10) capacidades biológicas adquiridas pelas células durante o desenvolvimento de um tumor humano. A figura 4 ilustra tais características, que de maneira geral incluem: (1) manter a sinalização proliferativa das células cancerosas, (2) evadir dos supressores de crescimento, (3) resistir a morte células, (4) escapar da destruição celular promovida pelo sistema imunológico, (5) promover imortalidade replicativa, (6) induzir a angiogênese, (7) ativar a invasão e metástase, (8) reprogramar o metabolismo energético, (9) capacidade de induzir processo inflamatório e (10) instabilidade genômica (HANAHAN; WEINBERG, 2015).



**Figura 4.** “Hallmarks of Cancer” ou características do câncer (Fonte: modificado de HANAHAN; WEINBERG, 2015).

### 1.3. Câncer de colo de útero

O câncer de colo de útero, também conhecido como “câncer cervical” (MENDONÇA *et al.*, 2010) que apresenta como agente etiológico da doença o Papilomavírus Humano (HPV), especialmente o HPV-16 e o HPV-18, adquirido, comumente, no início da vida sexual da mulher (RODRIGUES *et al.*, 2016). O HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais recorrente no mundo (INCA, 2016). As infecções persistentes pelo HPV podem gerar alterações intraepiteliais progressivas que podem evoluir para lesões que caso não sejam diagnosticadas e tratadas no início, evoluem para o câncer do colo do útero. Porém, apenas a infecção por HPV não consiste em uma causa suficiente para que se desenvolva o câncer em questão, já que é

necessário que a infecção ocorra de maneira persistente, além de estar associada com outros fatores tais como o estilo de vida, tabagismo, imunossupressão entre outros (INCA, 2016).

Para o ano de 2016 foram esperados cerca de 16.340 novos casos de câncer de colo de útero no Brasil: 23,97/100 mil casos na Região Norte, 20,72/100 mil na região Centro-Oeste, 15,17 /100 mil na Região Sul e de 11,30/100 mil casos na Região Sudeste. Desta forma, a doença consiste em um importante problema de saúde pública (INCA, 2016).

Henrietta Lacks teve uma importância muito grande para os estudos relacionados com o câncer do colo de útero. Ela nasceu no ano de 1920, e aos 30 anos recebeu o diagnóstico de câncer de colo de útero (LUCEY *et al.*, 2009; GUEDES, 2013). Sem muito sucesso em seu tratamento acabou vindo a óbito no ano de 1951, em decorrência da doença que, já em estado avançado, se espalhou para outros órgãos do corpo. Porém, durante seu tratamento no Hospital Johns Hopkins, tecidos correspondentes à região do câncer foram retirados, sem o consentimento da paciente, e enviados para o Dr. Gey, que colecionava tecidos de procedimentos cirúrgicos para estudo junto aos seus parceiros. Um dos cientistas que trabalhavam no laboratório junto com o Dr. Gey conseguiu cultivar as células de Henrietta Lacks em cultura, tornando-as a primeira linhagem celular de câncer imortalizada em cultura de células. As células em questão foram nomeadas de “HeLa” em homenagem a “**Henrietta Lacks**” (LUCEY *et al.*, 2009). Por muitas décadas a origem das células foi mantida em segredo, referente ao período em que tiveram uma notoriedade na comunidade científica. Desde então tem crescido a quantidade de estudos que envolvem esse tipo celular tanto para produção de novos medicamentos quanto para o desenvolvimento de novas tecnologias (GUEDES, 2013).

#### **1.4. Diagnóstico e tratamentos contra o câncer**

O diagnóstico do câncer está relacionado com a avaliação do histórico clínico associada a análise detalhada de exames físicos com visualização direta da área infectada quando possível, aplicando-se técnicas adequadas de acordo com o tipo de câncer em análise (INCA, 2016).

Quando há o diagnóstico precoce de um indivíduo com câncer, existe uma maior probabilidade de cura dos pacientes (KATZUNG *et al.*, 2014).

Os tratamentos convencionais contra o câncer consistem em radioterapia, quimioterapia, cirurgias (ALMEIDA, 2005). A primeira consiste em um tratamento local que utiliza equipamentos que permitem irradiar a região atingida pela doença cujo agente terapêutico é a radiação ionizante tornando o local de incidência eletricamente instável, promovendo assim a morte ou perda da capacidade replicativa do material genético celular (JHAM; FREIRE, 2006). No entanto, tal tratamento tem sido cada vez menos usado por gerar efeitos colaterais tardios e sérios para o paciente (INCA, 2016).

A quimioterapia consiste em uma forma de tratamento sistêmico do câncer baseada na administração de fármacos quimioterápicos que atuam em células cancerosas que já se espalharam pelo organismo do paciente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010). Os agentes antineoplásicos mais aplicados nesse tipo de tratamento são os alquilantes, que interagem com o DNA (ALMEIDA, 2005) induzindo a morte celular ou diminuindo o processo de divisão das células (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010). Ainda sobre os fármacos alquilantes, tem-se como mecanismo de ação a transferência do grupo alquila para os constituintes celulares, gerando, assim a principal ação de morte celular. Um dos maiores problemas de se utilizar esse tratamento é que eles também são carcinogênicos, podendo provocar neoplasias secundárias e toxicidade sistêmica (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A poliquimioterapia tem sido amplamente empregada, já que os fármacos usados em tratamentos monoterápicos em doses clínicas, foram, comprovadamente ineficazes contra os cânceres. Os poliquimioterápicos apresentam uma alta atividade nas células cancerosas dentro da faixa de toxicidade que é tolerada pelo paciente dentro da dosagem recomendada. Além disso, eles proporcionam uma maior interação com as células alvo dos tratamentos e podem

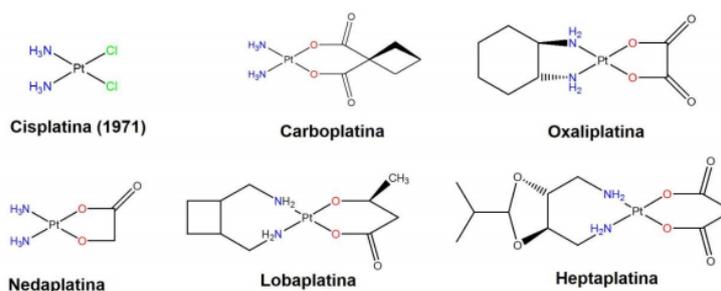
adicionalmente diminuir ou retardar a resistência celular aos fármacos (KATZUNG *et al.*, 2014).

A cirurgia oncológica remove tumores sólidos e é indicada para diagnóstico, profilaxia, reconstrução, inserção de dispositivos terapêuticos ou de suporte, entre outros. No entanto, apesar de ser eficaz no tratamento de tumores locais, constitui-se como uma solução paliativa (BAXEVANIS *et al.*, 2009). Com o surgimento de novos tratamentos, a cirurgia tem sido utilizada com menor frequência e, em alguns casos, é associada com outros recursos terapêuticos (LUSTOSA *et al.*, 2012).

### **1.5. Complexos metálicos usados no tratamento contra o câncer**

A atividade antineoplásica dos complexos metálicos vem sendo muito estudada nas últimas décadas. A atividade biológica dos compostos de platina foi descoberta por Rosenberg e seus colaboradores no ano de 1965 após avaliarem o efeito do campo elétrico sobre o crescimento celular. A atuação desses complexos está relacionada com a inibição da divisão celular (ALMEIDA *et al.*, 2014; SOUZA, 2017). Com base nessa descoberta, testou-se a atividade antitumoral do composto “*cis*-diaminodicloroplatina” ou *cis*[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], comumente denominada de “cisplatina”, foi avaliada em ratos brancos Swiss e subsequentemente, em tumores de colo de útero, bexiga, cabeça e pescoço, câncer esofágico, ovariano e de pulmonar (ALMEIDA *et al.*, 2014) e atualmente seus derivados têm sido muito usados no tratamento contra diversos cânceres (FONTES *et al.*, 2005).

De acordo com Almeida *et al.* (2014), existem seis compostos derivados da platina que são largamente utilizados como antineoplásticos: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina (disponível apenas em alguns países), nedaplatina, loplantina e heptaplatina, os três últimos estão acessíveis apenas no Japão, China e Coreia, respectivamente (figura 5).

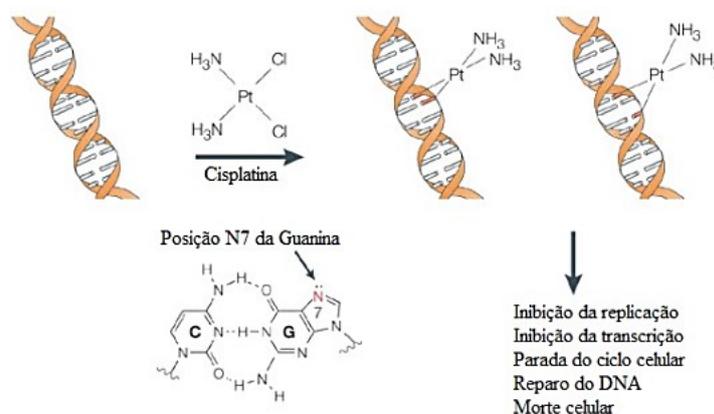


**Figura 5.** Estrutura química de fármacos derivados da platina aprovados para uso clínico (Fonte: CARVALHO, 2015).

A entrada desses compostos nas células alvo atua como uma etapa decisiva para promoção do efeito desejado, antitumoral, e muitas vezes é facilitado devido a presença de transportadores celulares de cobre, que internalizam o medicamento através da proteína CTR1, por endocitose. Após a internalização do composto de interesse na célula, há a formação de metabólitos ativos que seguem três direções diferentes de atuação intracelular: são distribuídos nos compartimentos celulares, transportados para dentro do núcleo, interagindo com o DNA da célula, ou por extrusão celular regulando a homeostase do cobre (ALMEIDA, 2014). A ligação dos compostos de platina com o DNA ocorre preferencialmente nos átomos de nitrogênio presentes na guanina, mais estável por interagir com o hidrogênio presente no grupo NH<sub>3</sub>, ou adenina, proporcionando uma alteração na estrutura do material genético (figura 6), que é, muitas vezes, irreparável, conferindo a capacidade antitumoral da cisplatina, visto que, há um impedimento da divisão celular, que é crucial na continuidade do crescimento e desenvolvimento do câncer (FONTES *et al.*, 2005).

No entanto, assim como os demais antineoplásicos anteriormente citados, os derivados da platina apresentam alta nefrotoxicidade, além de provocar anorexia, ototoxicidade, neurotoxicidade e desenvolvimento de resistência aos mesmo (ALMEIDA, 2014). Além disso, a efetividade dos compostos de platina e seus derivados tem sido dificultada pela complexação da platina com proteínas e peptídeos (CARVALHO, 2015), o que impede a utilização desses tipos farmacológicos (ALMEIDA, 2014). No entanto, de acordo com Carvalho (2015), tais limitações impulsionaram estudos que permitiram desenvolver novos complexos análogos

contendo novos ligantes que podem conferir um maior espectro de atividade antitumoral e diminuir ou evitar os efeitos adversos provocados pelos compostos provenientes da platina.



**Figura 6.** Interação dos compostos de platina com o material genético, DNA, da célula cancerosa (Fonte: ALMEIDA, 2014).

### 1.6. Complexos de cobre no tratamento contra o câncer

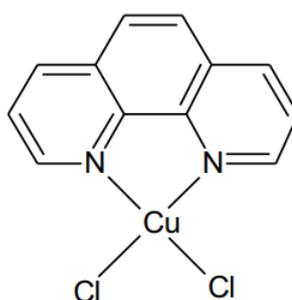
O cobre é um dos poucos metais que são encontrados puros na natureza e sua aplicação normalmente está relacionada com a capacidade de interconversão do  $\text{Cu}^{+1}$  (estado reduzido) entre seus estados de oxidação  $\text{Cu}^{+2}$  (CAVALCANTE, 2016) e  $\text{Cu}^{+3}$ , no entanto existem poucos exemplos deste (GONÇALVES, 2016). Tal metal configura-se, também, como um oligoelemento essencial muito importante para o funcionamento do organismo, atuando na composição e atividade tanto de enzimas quanto das demais proteínas (OLIVEIRA, 2016). As formas  $\text{Cu}^{+1}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  ligam-se fortemente a moléculas biológicas (GONÇALVES, 2016) apresentando ações relacionadas com transporte de elétrons, metabolismo energético, ativação do oxigênio, respiração e síntese de DNA nas células (GUERRA, 2016).

Além da importância biológica, o  $\text{Cu}^{+2}$  é capaz de formar complexos que têm sido cada vez mais estudados por apresentar diferentes conformações estruturais e gerar reatividades relacionadas com a formação de espécies reativas de oxigênio, promovendo estresse oxidativo nas células e danos nas biomoléculas (DNA, açúcares e proteínas). Os complexos de cobre são uma alternativa aos compostos derivados de platina usados como antineoplásicos, já que ao atuar como um elemento essencial para o funcionamento sistêmico, existem mecanismos

naturais do organismo que são capazes de absorver, distribuir e eliminar esse metal (OLIVEIRA, 2016).

Nos complexos de  $\text{Cu}^{+2}$ , os números de coordenação variam de quatro a seis, obtendo-se geometrias quadrática e tetraédrica, bipiramidal trigonal e pirâmide de base quadrada; já os compostos hexacoordenados possuem geometria octaédrica (OLIVEIRA, 2016). Portanto, a existência de uma variedade de arranjos possíveis, permite obter uma gama de ligantes que podem ser usados como drogas ativas fracamente tóxicas, o que proporciona outra característica a esse elemento como a capacidade de atuar como agente antiproliferativo, já que é conhecida desde 1969, sua alta compatibilidade de ligação com o DNA, assim como a cisplatina (GONÇALVES, 2016).

Evidências científicas mostram que os complexos de cobre apresentam atividades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e sobretudo antitumoral (CHANDRALEKA, 2011). Há ainda diversos estudos que demonstram a capacidade dos complexos de cobre em clivarem a molécula de DNA. Com base nessas informações, vários complexos de cobre foram e estão sendo sintetizados e testados como drogas antitumorais. Podemos citar como exemplo o complexo cobre-fenantrolina  $[\text{Cu}(1-10\text{-phen})_2]^{+2}$  (figura 7).

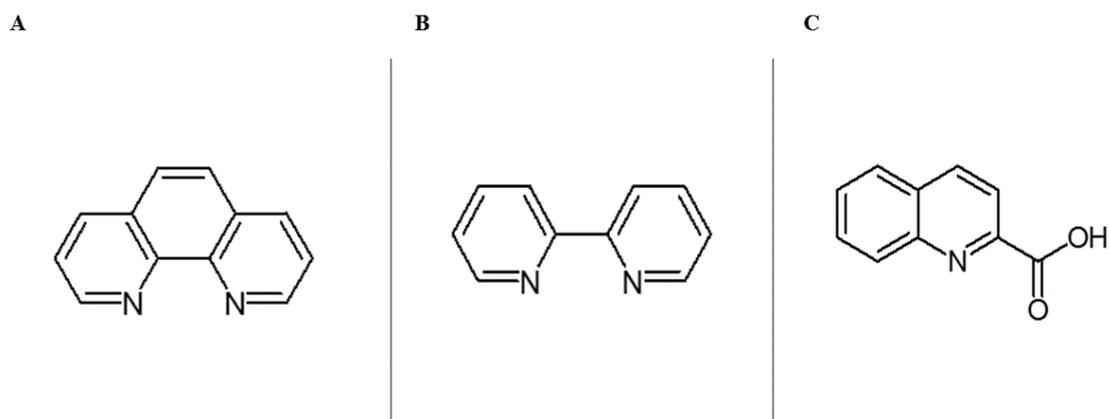


**Figura 7.** Estrutura química do complexo usado como precursores de novos complexos com atividade antineoplásica (Fonte: OLIVEIRA, 2016).

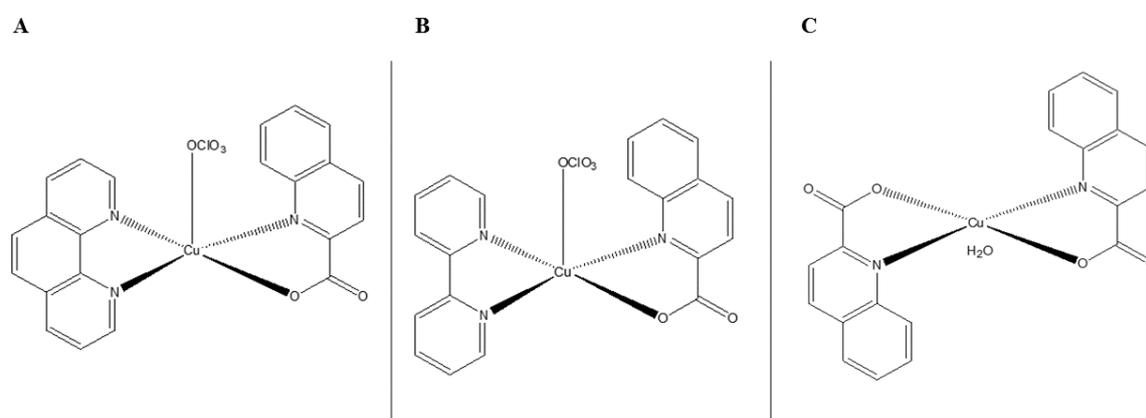
A 1,10-fenantrolina é um composto heterocíclico policondensado da classe dos agentes quelantes pertencente à família dos ligantes  $\alpha,\alpha'$ -diiminas. Complexos de cobre associados aos ligantes de fenantrolina são capazes de induzir apoptose em células cancerosas de fígado.

Com isso, novas pesquisas se projetaram para explorar melhor esse potencial de associação de ligantes ao cobre (SEGURA, 2014; OLIVEIRA, 2016;). O ligante N-heterocíclico 2,2'-bipiridina é comumente usado em complexos metálicos devido sua alta estabilidade, poder quelante, capacidade de interação com o DNA alvo (DONNICI *et al.*, 2002; PAZINATO, 2014). Quando associado a complexos de cobre, a bipiridina também apresenta atividade antifúngica e citotóxica em células tumorais, aumentando o interesse da associação desse ligante com complexos metálicos (PEREIRA, 2015). O ácido quináldico (também utilizado como ligante na formação de complexos com capacidade antitumoral) ocorre de maneira natural no organismo sendo um análogo do metabólito de triptofano, o ácido quinurênico; porém a sua origem, síntese e metabolismo não foram totalmente elucidados. A similaridade entre o ácido quináldico e o ácido quinurênico permite ao ácido quináldico a capacidade antiproliferativa e de alteração morfológica nas células; tal afirmação foi observada em células de cólon e de câncer renal por meio da inibição da síntese do DNA (LANGNER *et al.*, 2013; LANGNER *et al.*, 2015).

Neste sentido, um estudo anterior não publicado, foram sintetizados, no ano de 2017, três novos compostos caracterizados como complexos de cobre pelo professor doutor Wendell Guerra, no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Estes complexos foram sintetizados a partir do cobre onde novos ligantes foram adicionados. São eles: fenantrolina + ácido quináldico; bipiridina + ácido quináldico e ácido quináldico, originando, respectivamente, os complexos C7, C8 e C9. A figura 8 apresenta a estrutura química dos ligantes e a figura 9 retrata os complexos sintetizados.



**Figura 8.** Ligantes utilizados na sintetização dos complexos: **A)** fenantrolina (phen); **B)** bipyridina (bipy) e **C)** ácido quináldico (QNA) (Fonte: ALMEIDA; GUERRA, 2017).



**Figura 9.** Estrutura dos complexos sintetizados: A) Complexo de Cobre C7 (cobre(II) + fenantrolina + ácido quináldico); B) Complexo de Cobre C8 (cobre(II) + bipyridina + ácido quináldico) e C) Complexo de Cobre C9 (cobre(II) + ácido quináldico) (Fonte: ALMEIDA; GUERRA, 2017).

Mediante ao potencial antitumoral de alguns complexos de cobre já descritos na literatura, esse trabalho foi realizado com o intuito de investigar a atividade dos complexos C7 ([Cu(phen)(QNA)ClO<sub>4</sub>]), C8 ([Cu(bipy)(QNA)ClO<sub>4</sub>]) e C9 ([Cu(QNA)<sub>2</sub>]H<sub>2</sub>O) e seu respectivos ligantes (fenantrolina, bipyridina e ácido quináldico) em linhagens celulares tumorais e não tumorais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

No presente trabalho objetivou-se verificar a atividade antitumoral *in vitro* dos complexos de cobre [Cu(phen)(QNA)ClO<sub>4</sub>] – C7, [Cu(bipy)(QNA)ClO<sub>4</sub>] – C8, [Cu(QNA)<sub>2</sub>]H<sub>2</sub>O – C9 e seus respectivos ligantes.

### 2.2. Objetivos específicos

- Verificar a atividade citotóxica por ensaio de MTT dos complexos C7, C8 e C9 e seus ligantes em linhagens celulares de câncer de colo de útero (HeLa) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC);
- Determinar a concentração inibitória de 50% da viabilidade das células testadas das células testadas;
- Avaliar a atividade antiproliferativa através do método de CytoSelect™ dos complexos que apresentarem melhor atividade citotóxica para a linhagem celular tumoral HeLa;
- Determinar o mecanismo de morte células pelo método de Anexina V;
- Investigar a ação dos complexos frente ao processo de adesão das células por meio do ensaio colorimétrico de MTT.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Complexos de cobre

Os complexos de cobre(II) e os ligantes utilizados no presente trabalho foram sintetizados e caracterizados pelo professor Wendell Guerra do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Os complexos de cobre(II) testados foram: [Cu(phen)(QNA)ClO<sub>4</sub>] – C7, [Cu(bipy)(QNA)ClO<sub>4</sub>] – C8, [Cu(QNA)<sub>2</sub>]H<sub>2</sub>O – C9; os ligantes avaliados foram: fenantrolina (phen), bipyridina (bipy) e ácido quináldico (QNA).

Para a realização dos experimentos os complexos e os ligantes foram dissolvidos em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para obtenção de uma solução estoque (10mM) que foi

armazenada em temperatura ambiente. Durante os experimentos, novas diluições foram preparadas em meio de cultura onde a concentração do DMSO não excedeu 0,1%.

### **3.2. Cultura de células**

Duas linhagens celulares foram utilizadas, uma tumoral (HeLa), proveniente de células de colo de útero, e uma não tumoral (HUVEC), derivada de células endoteliais de veia umbilical humana. Ambos tipos celulares já eram trabalhados e cultivados no Laboratório de Bioquímica e Toxinas animais (LaBiTox) da Universidade Federal de Uberlândia.

As duas linhagens de células foram cultivadas em frascos de cultura celular (25 cm<sup>2</sup>) contendo meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK), suplementado com 2mM de piruvato de sódio, 1mM MEM, 60µg/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e 10% de soro fetal bovino – (SFB) (Cultilab, Campinas, Brazil). As células foram mantidas em uma estufa (Thermo Scientific) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.3. Avaliação da citotoxicidade**

As células HeLa e HUVEC (3x10<sup>4</sup> células/poço) foram plaqueadas em placas estéreis de 96 poços junto ao meio RPMI-1640 completo (10% de SFB) e em seguida incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Posteriormente à incubação, o sobrenadante foi retirado e, em seguida, foi adicionado o meio RPMI-1640 completo (10% de SFB) na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações (25µM, 12,5µM, 6,25µM, 3,125µM, 1,56µM, 0,78µM, 0,39µM) dos complexos C7, C8 e C9, e seus ligantes. As células foram então incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada através do método colorimétrico baseado na oxidação mitocondrial, a solução de (3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) (MTT) a 5mg/mL e 20µL em cada poço da placa. Desta forma, após o tratamento as células foram incubadas com a solução de MTT durante 3 horas com posterior adição de SDS (*Sodium Docecyl Sulfate*) –

HCl (0,01M) com o volume de 100 $\mu$ L por poço. As microplacas foram então incubadas *overnight* em estufa de 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> e em seguida a absorbância foi mensurada em 570nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems). Adicionalmente, as concentrações inibitórias para 50% das células (IC<sub>50</sub>) foram determinadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e dois experimentos independentes foram conduzidos.

### **3.4. Ensaio antiproliferativo celular pela técnica de CytoSelect**

A análise de antiproliferação das células tumorais (HeLa) foi realizada utilizando-se o kit de reagentes “CBA-253: CytoSelect™ Cell Proliferation Assay Reagent (Colorimetric)” (Cell Biolabs, INC.). Para tanto, foram selecionadas três concentrações do complexo C7 (5,6 $\mu$ M, 2,8  $\mu$ M e 1,4  $\mu$ M) e C8 (47,6  $\mu$ M, 23,8  $\mu$ M e 11,9 $\mu$ M), cujas determinações foram baseadas no cálculo do IC<sub>50</sub> (que correspondem, respectivamente, a 2xIC<sub>50</sub>; IC<sub>50</sub> e ½ x IC<sub>50</sub>).

Em uma placa estéril de 96 poços, foram plaqueadas 100 $\mu$ L das células em 26 poços ajustadas a uma concentração de 3x10<sup>4</sup> células por poço em meio RPMI-1640 completo (10% de SFB) e, em seguida, as células foram incubadas na estufa nas condições de 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Após o período de incubação, as mesmas foram tratadas com os complexos C7 e C8 nas concentrações mencionadas acima. Além disso, algumas células receberam apenas meio RPMI sem SBF (controle negativo), e as outras receberam o meio RPMI com 10% de SBF (controle positivo). Aos tratamentos foram adicionados 10 $\mu$ L do reagente (CytoSelect™ Cell Proliferation Assay Reagent) antes de se completar 24 horas; depois de 4 horas a fluorescência foi mensurada em comprimento de onda de 560nm de excitação e 600nm de emissão no fluorímetro Perkin Elmer. O mesmo procedimento de adição do reagente e leitura de fluorescência foi realizado para o período de 48 horas e 72 horas.

### **3.5. Ensaio de apoptose celular**

As células HeLa ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em uma placa estéril de 24 poços com meio de cultura RPMI-1640 completo (10% de SBF) e, em seguida, foram incubadas em estufa nas condições de  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Subsequentemente, as células foram tratadas com complexo de cobre C7 nas concentrações equivalentes ao  $\text{IC}_{50}$  (2,8  $\mu\text{M}$ ) e  $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$  (1,4 $\mu\text{M}$ ), em seguida, foram incubadas em estufa nas condições de  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  durante 24 horas.

Após a incubação, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos e, posteriormente, lavadas em tampão PBS (*Phosphate Buffer Salin*) 1x seguida por outra centrifugação nas mesmas condições. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em 5 $\mu\text{L}$  de solução tampão de ligação de Anexina V (Kit I de Detecção de Apoptose PE Anexina V - FITC), seguidos da adição da 5 $\mu\text{L}$  de Anexina V e do PI iodeto de propídeo (PI). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, evitando-se a luminosidade. Em seguida, as amostras foram analisadas no citômetro (BD) nos canais FITC e PerCP. Os dados obtidos foram analisados a partir do software FlowJo (FlowJo v. 7.6.3; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### **3.6. Ensaio de adesão celular por meio da técnica colorimétrica de MTT**

As células HeLa ( $3 \times 10^4$  células) foram incubadas com meio RPMI-1640 completo (10% de SFB) em microtubos (1,5 mL) em tratamento com o complexo C7 nas concentrações equivalentes a  $2 \times \text{IC}_{50}$  (5,6 $\mu\text{M}$ )  $\text{IC}_{50}$  (2,8 $\mu\text{M}$ ) e  $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$  (1,4 $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  durante 30 minutos (o controle negativo de adesão celular foi incubado apenas com o meio RPMI-1640 completo – 10% de SFB). Após o período de incubação as células foram plaqueadas em placas estéreis contendo 96 poços e incubadas á  $37^\circ\text{C}$  - 5%  $\text{CO}_2$  durante 3 horas. Após este período as células foram lavadas com tampão PBS 1x e em seguida foi adicionado o meio RPMI-1640 completo (10% de SFB). Em sequência foi adicionado 20 $\mu\text{L}$  da solução de

MTT (5mg/mL) e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C - 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi adicionado o SDS (*Sodium Docecyl Sulfate*) – HCl (0,01M) com o volume de 100µL por poço para solubilização dos cristais e a placa foi incubada overnight. Por fim, a absorbância foi lida em 570nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems).

### **3.7. Métodos estatísticos para plotagem dos gráficos**

A determinação da concentração inibitória para 50% a viabilidade celular (IC<sub>50</sub>), foi calculada através da regressão linear, de uma curva dose-resposta (Concentração da Amostra vs Viabilidade Celular), realizada com 95% de confiabilidade. A equação da reta “ $y = a + bx$ ” forneceu os valores IC<sub>50</sub>, sendo que “y” corresponde a absorbância obtida pela leitura do espectrofotômetro e “x” à concentração dos complexos e ligantes analisados; tais resultados foram obtidos através do software Excel 2013.

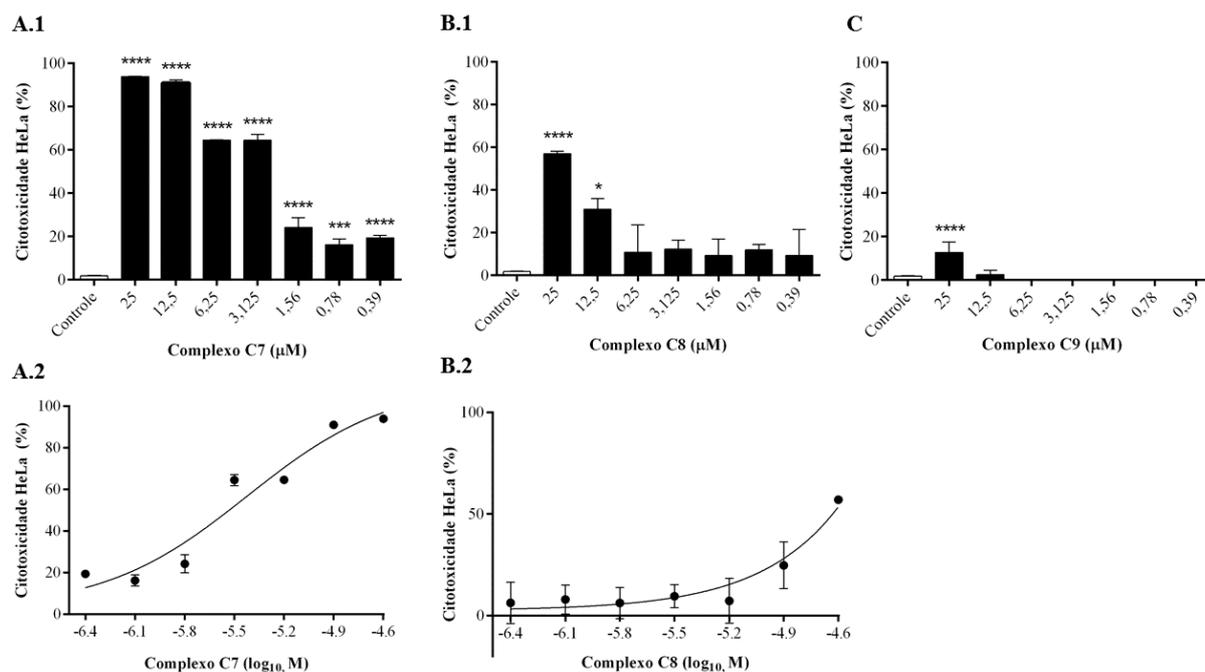
Além disso, foram plotados dois tipos de gráficos: o logarítmico, que relaciona o percentual de citotoxicidade em função do logaritmo das concentrações testadas e o de barras, cuja citotoxicidade foi expressa em função das concentrações utilizadas; o primeiro foi calculado a partir de uma regressão não linear, e o segundo foi expresso como média ± erro padrão da média. Para todos os gráficos plotados utilizou-se o programa GraphPad Prism 6.0. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste one-way ANOVA.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A investigação por novos agentes quimioterápicos os quais possam ser utilizados no tratamento contra o câncer se faz presente nos últimos anos. Desta forma, podemos evidenciar os complexos metálicos, já que eles vêm sendo alvos de estudos por muitos pesquisadores. A cisplatina e seus derivados apresentam muitos efeitos adversos que dificultam sua aplicação para a finalidade em questão, estimulando estudos a utilizarem outros metais em substituição a

platina. Nessa perspectiva, podem ser destacados os complexos de cobre(II) os quais configuram-se como potenciais agentes antitumorais *in vitro* e *in vivo* (FERREIRA *et al.*, 2016; LIANG, 2017). A relevância dos complexos de cobre relaciona-se com a capacidade de atuarem como compostos bioativos, isto é, sua ativação ocorre em regiões redutoras no organismo onde há pouca presença tanto de oxigênio e quanto de vascularização e que podem atuar diretamente no local do tumor (FONSECA, 2014).

O presente trabalho avaliou a citotoxicidade dos complexos contra as células HeLa e HUVEC utilizando-se a técnica de MTT. Na célula tumoral, os complexos C7, C8 e C9 apresentam um efeito citotóxico dose-dependente, isto é, à medida que as concentrações dos mesmos diminuíram, houve também, uma queda na capacidade antitumoral dos mesmos (figura 10). Sendo assim, em comparação com o controle negativo, a maior ação antitumoral do complexo C7 foi observado nas concentrações de 25 $\mu$ M, 12,5 $\mu$ M, 6,25 $\mu$ M e 3,125 $\mu$ M, promovendo uma citotoxicidade de 93,89%, 90,97%, 64,52% e 64,48%, respectivamente. Nas demais concentrações (1,56 $\mu$ M, 0,78 $\mu$ M e 0,39 $\mu$ M) não foi possível observar citotoxicidade igual ou próxima a 50% (24,24%, 16,22% e 19,37%) (figura 10-A.1). Quanto ao complexo C8, a maior atividade citotóxica observada é relativa a concentração de 25 $\mu$ M, apresentando uma porcentagem de 57,03% de toxicidade nas células. As demais concentrações (12,5 $\mu$ M, 6,25 $\mu$ M, 1,56 $\mu$ M, 0,78 $\mu$ M e 0,39 $\mu$ M) apresentaram 31,04%, 10,89%, 12,28%, 9,33%, 11,93% e 9,41% de citotoxicidade, respectivamente (figura 10-B.1). A curva em escala logarítmica confirma que, quanto menor a dose dos complexos C7 e C8, menor é a toxicidade para as células tumorais (figura 10-A.2 e 10-B.2). Para o complexo C9 observa-se uma atividade citotóxica abaixo de 50%. Assim, as concentrações que apresentaram citotoxicidade (em  $\mu$ M) de 25 e 12,5 foram de 12,69% e 2,45%, respectivamente.

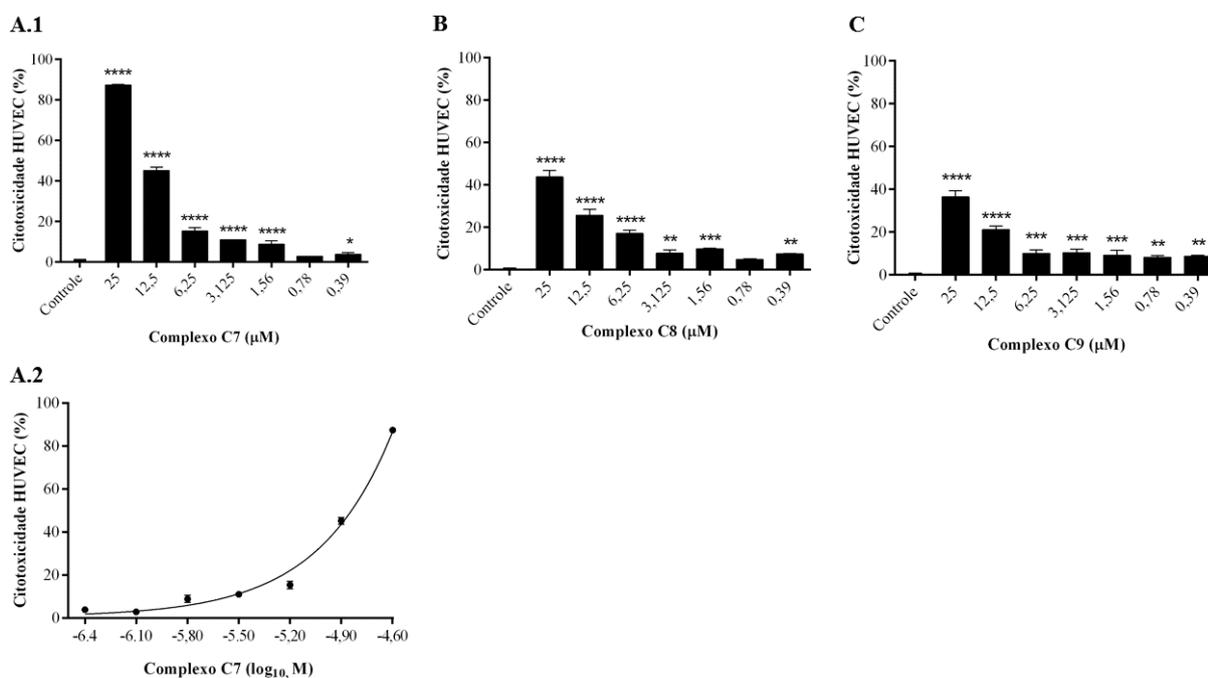


**Figura 10.** Ensaio de citotoxicidade por meio da técnica colorimétrica de MTT na linhagem celular tumoral (HeLa) em diferentes concentrações dos complexos de cobre(II); **A.1)** Gráfico demonstrativo da ação do composto C7 (escala em M, para melhor visualização do comportamento da curva); **A.2)** Gráfico em escala logarítmica referente a curva dose-resposta após o tratamento com o complexo C7; **B.1)** Gráfico demonstrativo da ação do composto C8; **B.2)** Gráfico em escala logarítmica referente a curva dose-resposta após o tratamento com o complexo C8 (escala em M, para melhor visualização do comportamento da curva); **C)** Gráfico demonstrativo da ação do composto C9. Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 25μM, 12,5μM, 6,25μM, 1,56μM, 0,78μM e 0,39μM; valores de significância estatística  $p < 0,0001$  em relação ao controle.

Adicionalmente, a citotoxicidade dos complexos também foi avaliada em uma linhagem celular não tumoral (HUVEC), visto que uma condição ideal de tratamento seria de toxicidade seletiva para as células tumorais e não para as normais. Assim, analisando-se a figura 11-A.1 podemos perceber o mesmo comportamento dose-dependente observado nas células tumorais. O complexo C7 apresentou certa toxicidade na linhagem de células HUVEC, entretanto há uma maior evidência desse comportamento na maior concentração (25μM) com 87,35% de citotoxicidade (a toxicidade produzida nas células HeLa nesta concentração foi um pouco maior quando comparada com as células não tumorais). Com relação as demais concentrações, houve uma toxicidade abaixo de 50% nas células normais: as concentrações (em μM) de 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 e 0,39 apresentaram citotoxicidades de 45,22%, 15,35%, 11,04%, 8,87%,

2,86% e 3,90%, respectivamente. Estes dados mostram que as concentrações inferiores a 25  $\mu\text{M}$  nas células não tumorais apresentam uma especificidade maior para as células tumorais HeLa.

Para o complexo C8 não foi observado uma citotoxicidade maior ou igual a 50% (figura 11-B). Assim, as concentrações (em  $\mu\text{M}$ ) de 25, 12,5, 6,25, 1,56, 0,78 e 0,39, apresentaram, respectivamente, uma citotoxicidade de: 43,80%, 25,71%, 17,10%, 7,83%, 9,86%, 4,89%, 7,44%. Quanto ao complexo C9, não houve inibição do crescimento celular com uma citotoxicidade igual ou acima da 50%. As porcentagens de toxicidade celular nas concentrações (em  $\mu\text{M}$ ) 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 e 0,39 foram, respectivamente de: 36,46%, 21,15% e 10,02%, 10,37%, 9,16%, 8,19% e 8,65% (figura 11-C).



**Figura 11.** Ensaio de citotoxicidade utilizando a técnica colorimétrica de MTT na linhagem celular não tumoral (HUVEC) em diferentes concentrações dos complexos de cobre(II); **A.1**) para testar a ação do composto C7; **A.2**) Gráfico em escala logarítmica referente a curva dose-resposta após o tratamento com o complexo C7 (escala em M, para melhor visualização do comportamento da curva); **B**) Gráfico demonstrativo da ação do composto C8; **C**) Gráfico demonstrativo da ação do composto C9. Os compostos foram tratados nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 1,56  $\mu\text{M}$ , 0,78  $\mu\text{M}$  e 0,39  $\mu\text{M}$ ; valores de significância estatística  $p < 0,0001$  em relação ao controle.

Outras duas análises realizadas para o complexo C7 e C8 foram a construção da curva em escala logarítmica obtida através do cálculo do  $\text{IC}_{50}$  (figura 10-A.2 e figura 11-A.2) e o

índice de seletividade, que mede o quanto o composto é ativo contra as células tumorais sem causar danos nas células normais. Os demais compostos avaliados não tiveram o IC<sub>50</sub> calculado porque não houveram concentrações citotóxicas iguais ou acima de 50% (\*) (tabela 1).

**Tabela 1.** Concentração que inibe 50% da viabilidade das células testadas (IC<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS)

Complexo	Linhagem Celular	Valor do IC <sub>50</sub>	Índice de Seletividade
C7	HeLa	2,79μM	8,53
	HUVEC	23,79μM	
C8	HeLa	14,43μM	*

Diante dessas informações, é notável que o complexo C7 apresenta um maior potencial citotóxico nas células tumorais do que nas não tumorais. O complexo C8 é citotóxico apenas na maior concentração testada na linhagem de células HeLa; na linhagem de células HUVEC há uma toxicidade celular baixa, como demonstrado anteriormente. Quanto ao complexo C9 é possível notar uma citotoxicidade muito baixa nas células tumorais, porém, já nas não tumorais foi observada um potencial mais tóxico para as células. Portanto, o perfil desse composto não se mostra favorável para o presente estudo, inviabilizando outros testes que possam avaliar o seu potencial antitumoral.

O comportamento antitumoral observado para o complexo C7 pode ser justificado pela sua estrutura química (apresentada na figura 9-A), com planaridade e a presença da fenantrolina, promovendo uma maior quantidade de anéis aromáticos, aumentando a lipofilicidade do complexo, ou seja, tornando-o mais hidrofóbico e, como consequência, promovendo uma maior facilidade em conseguir atravessar a membrana plasmática da célula, já que a membrana plasmática das células é primordialmente constituída por uma bicamada lipídica, tornando-a mais hidrofóbica. Os complexos C8 e C9 são constituídos por anéis aromáticos, mas há a presença de átomos de oxigênio em suas extremidades (figura 9-B e 9-C, respectivamente), que lhes conferem maior capacidade de interação com a água, tornando-os mais hidrofílicos e com maior resistência à entrarem nas células. Os complexos de cobre além

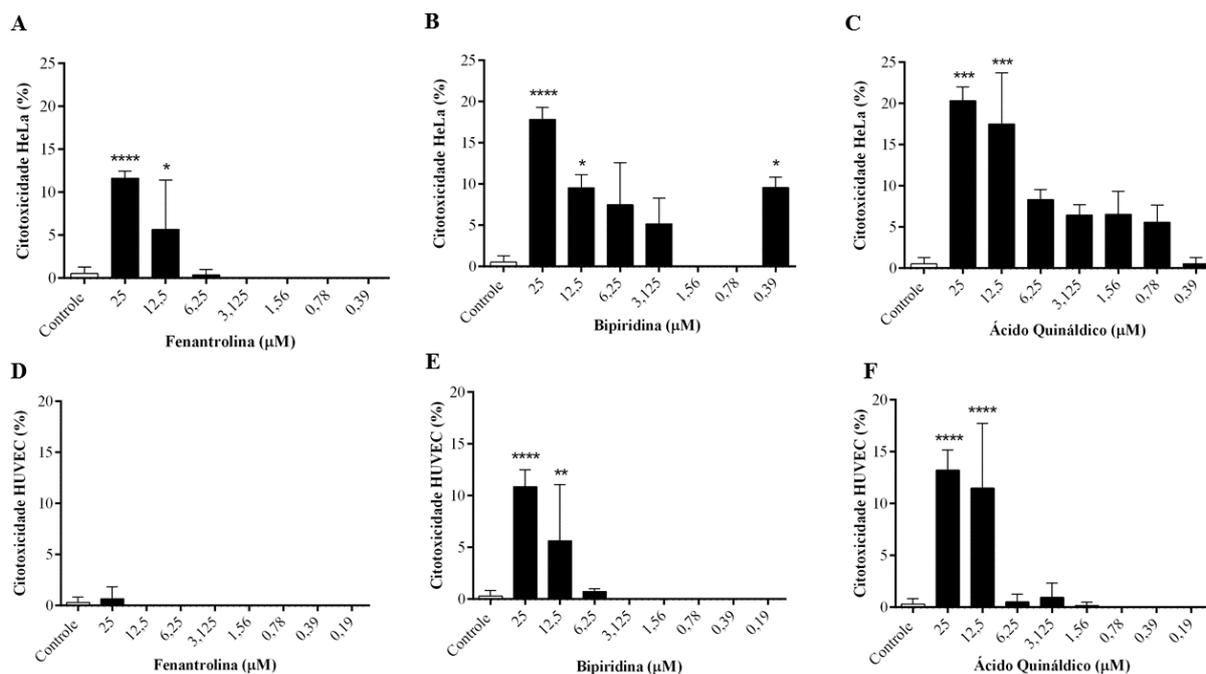
de interagirem com o DNA celular apresentam a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) após a redução do cobre e causando danos no material genético da célula (SANTINI *et al.*, 2014).

A comparação dos resultados relativos a citotoxicidade com outros complexos de cobre(II) descritos na literatura torna-se difícil a medida em que os estudos se dão em diferentes linhagens celulares (GLIŠIĆ *et al.*, 2017). Mesmo assim, a baixa citotoxicidade dos complexos C7 e C8 nas células não tumorais (HUVEC) em relação com as tumorais (HeLa) é semelhante ao observado por Teixeira *et al.* (2017) que, utilizando complexos de rutênio associado a um ligante perfluorado de bipyridina, apresentou maior toxicidade celular nas linhagens derivadas de câncer cólon retal (RKO e Sw480) e não exibiu um efeito significativo citotóxico na linhagem controle (NCM 460). Em outro estudo, realizado por Glišić *et al.* (2017), foi observado que, através de ensaio de citotoxicidade por meio da técnica de MTT e utilizando complexos de cobre(II) associado a terpiridina ( $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]$  e  $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]$ ) em células de câncer de pulmão (linhagem celular A549) e em células de fibroblastos pulmonares saudáveis (linhagem MRC5), houve diferença na toxicidade celular das duas linhagens, mostrando-se ligeiramente mais seletivo nas linhagens tumorais.

As concentrações testadas capazes de inibir 50% da viabilidade das linhagens celulares, tornam o complexo C7 um potencial agente antineoplásico a ser aplicado no futuro; o complexo C8 apresentou um menor potencial. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos nesse trabalho para os complexos C7 e C8 são apoiados aos relatados por Matos *et al.* (2017) utilizando um complexo de cobre(II) associado a fenantrolina ( $[\text{Cu}(\text{BTAC1})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ ), cuja citotoxicidade dose dependente apresentando os valores do  $\text{IC}_{50}$  de 14,92 e 19,215  $\mu\text{M}$  nas linhagens celulares tumoral Ehrlich e não tumoral NIH-3T3 (fibroblasto). Os estudos realizados por Ferreira *et al.* (2016) utilizando um complexo de cobre(II) ligado a 1,10-fenantrolina e a adenina apresentaram o valor do  $\text{IC}_{50}$  de  $0.87 \pm 0.06 \mu\text{M}$  nas células HeLa, estando próximos aos avaliados no presente trabalho para

o complexo C7. Quanto ao IS obtido (tabela 1), tem-se que o complexo C7 é seletivo para as células tumorais e seu  $IC_{50}$  é menor que o IS, potencializando a possibilidade de exploração do composto em questão.

Nas avaliações da citotoxicidade com os ligantes fenantrolina, biperidina e ácido quináldico, em ambas linhagens utilizando-se a técnica de MTT, observou-se um comportamento dose-dependente (excetuando-se a concentração de  $0,39\mu\text{M}$  apresentada na figura 12-B, cuja citotoxicidade foi maior que as concentrações de  $1,56$  e  $0,78\mu\text{M}$ ), assim como os complexos anteriormente avaliados. Sendo assim, em comparação com o controle negativo, as concentrações da fenantrolina que apresentaram toxicidade celular nas células tumorais foram de  $25\mu\text{M}$ ,  $12,5\mu\text{M}$  e  $6,25\mu\text{M}$ , com, respectivamente, 9,93%, 5,64% e 0,36% (figura 12-A). Ainda sobre o mesmo ligante, tem-se que a maior concentração testada na linhagem não tumoral foi a única que apresentou citotoxicidade (não significativa) em comparação com o controle negativo: 0,67% (figura 12-D). Quanto ao ligante biperidina tem-se que, nas células tumorais, as concentrações que apresentaram alguma citotoxicidade (baixa) foram de  $25\mu\text{M}$ ,  $12,5\mu\text{M}$ ,  $6,25\mu\text{M}$ ,  $1,56\mu\text{M}$  com: 17,84%, 9,55%, 7,49% e 5,18% (figura 12-B). Analisando o mesmo ligante nas células não tumorais (figura 12-E) tem-se que as concentrações com toxicidade celular (baixa) foram  $25\mu\text{M}$ ,  $12,5\mu\text{M}$  e  $6,25\mu\text{M}$  com 10,87%, 5,64% e 0,73%, respectivamente. Por fim, o ligante ácido quináldico exibiu citotoxicidade nas células tumorais nas concentrações (em  $\mu\text{M}$ ) de 25, 12,5, 6,25, 1,56, 0,78 e 0,39 que apresentaram, respectivamente, as taxas de: 20,33%, 17,50%, 8,32%, 6,44%, 6,56% e 5,60% (figura 12-C). Avaliando o mesmo ligante nas linhagens não tumorais, é possível obter as porcentagens de citotoxicidade de 13,22%, 11,50%, 0,52%, 0,97% e 0,18% nas mesmas concentrações avaliadas anteriormente (figura 12-F).

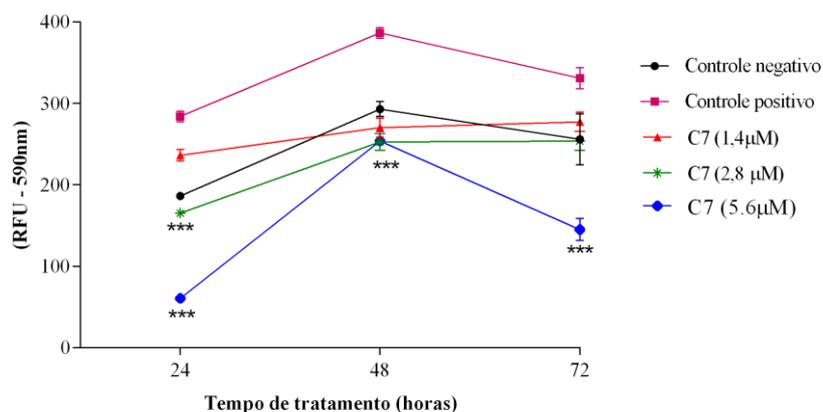


**Figura 12.** Ensaio de citotoxicidade utilizando a técnica colorimétrica de MTT para testar a ação dos ligantes em diferentes concentrações (25µM, 12,5µM, 6,25µM, 1,56µM, 0,78µM e 0,39µM): **A e D**) fenantrolina em diferentes concentrações; **B e E**) bipiridina em diferentes concentrações; **C e F**) ácido quináldico em diferentes concentrações. A linhagem celular utilizada em **A, B e C** foi tumoral (HeLa) e em **D, E e F** foi usada a linhagem de celular não tumoral (HUVEC); valores de significância estatística  $p < 0,0001$  em relação ao controle.

Diante dos resultados expostos é admissível a baixa contribuição dos ligantes isolados na morte celular das linhagens avaliadas. Por conseguinte, é plausível que somente os ligantes conjugados com o cobre através de ligação coordenada covalente (BEDOWR, 2017) formando os complexos são capazes de atuar como agentes antineoplásicos. Portanto, os maiores percentuais citotóxicos avaliados com os complexos deve-se as propriedades eletrônicas da associação da fenantrolina com o complexo de cobre(II) (FERREIRA *et al.*, 2016) e presença de ligantes heterogêneos cíclicos com nitrogênio como átomo doador, tal como, 1, 10-fenantrolina, promovem uma maior atividade para o cobre(II) (BORTOLOTTI, 2011).

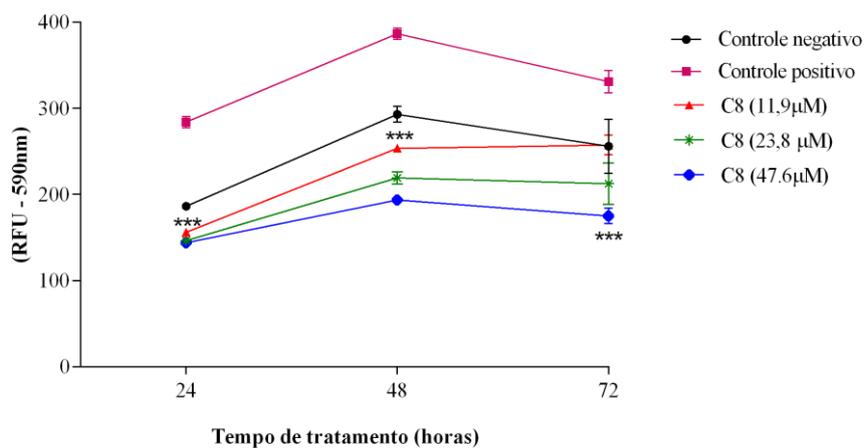
Os ensaios antiproliferativos celulares apontaram que os complexos C7 e C8 interferem no processo de proliferação das células tumorais, especialmente nas primeiras 24 horas de tratamento. Para o primeiro complexo, tomando como referência o controle negativo, é possível analisar que a concentração de 5,6µM inibiu totalmente a proliferação das células HeLa com 24, 48 e 72 horas de tratamento; já a concentração de 2,8µM inibiu a proliferação celular apenas

nos períodos de 24 e 48 horas. A concentração de  $1,4\mu\text{M}$  só apresentou capacidade antiproliferativa das células tumorais no período de 48 horas (figura 13).



**Figura 13.** Ensaio de antiproliferação celular em diferentes concentrações ( $1,4\mu\text{M}$ ;  $2,8\mu\text{M}$ ;  $5,6\mu\text{M}$ ) do complexo de cobre(II) C7 em linhagens celulares tumorais (HeLa); os dados apresentam a média  $\pm$  SD; \*\*\*  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo.

O ensaio de antiproliferação das células tumorais utilizando o complexo C8 como tratamento nas concentrações de  $11,9\mu\text{M}$ ,  $23,8\mu\text{M}$  e  $47,6\mu\text{M}$  mostrou que, nos períodos de 24 e 48 horas do experimento, todas as concentrações atuaram com comportamentos abaixo do controle negativo, indicando atividade antiproliferativa. Para o período de 72 horas, apenas as concentrações de  $47,6\mu\text{M}$  e  $23,8\mu\text{M}$  influenciaram na proliferação celular em relação ao controle negativo (figura 14).



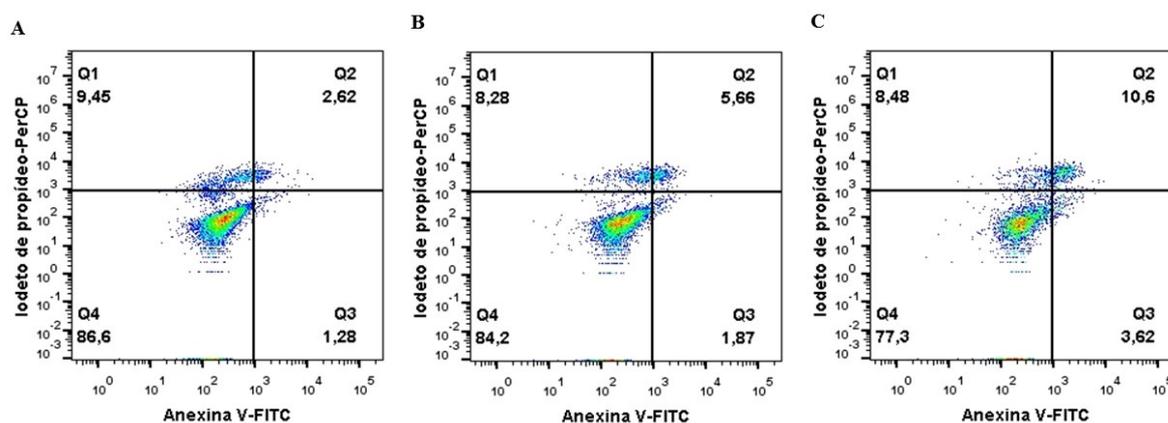
**Figura 14.** Ensaio de proliferação celular em diferentes concentrações ( $11,9\mu\text{M}$ ;  $23,8\mu\text{M}$ ;  $47,6\mu\text{M}$ ) do complexo de cobre(II) C8 em linhagens celulares não tumorais (HeLa); os dados apresentam a média  $\pm$  SD; \*\*\*  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo.

A atuação antiproliferativa dos complexos C7 e C8 avaliadas no presente trabalho, assemelha-se pelos resultados de Teixeira et al. (2017), que conseguiu observar a inibição da proliferação celular *in vivo* utilizando complexo de rutênio associado a um ligante perfluorado de bipyridina. Em contrapartida, Popolin (2016) realizando tratamentos com complexos de rutênio nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 (células tumorais de mama), não observou a inibição da proliferação celular usando uma concentração  $IC_{50} > 200\mu M$ . Tais afirmações apoiam o potencial antitumoral dos complexos C7 e C8 avaliados no presente trabalho, já que foram capazes de inibir a proliferação das células HeLa usando baixas concentrações a partir do cálculo do  $IC_{50}$ . Além disso, Liu et al. (2008) testou o efeito anti-proliferativo da cisplatina em células da linhagem tumoral HeLa por citometria de fluxo e Hoechst33258 e, em ambas metodologias, foram observadas a capacidade de inibição da proliferação dessas células tumorais, assim como o complexo C7 e C8 na mesma linhagem celular avaliados no presente trabalho. Além disso, o complexo C7 apresenta o ligante 1,10-fenantrolina, que possui a capacidade de interação com o DNA celular, induzindo mecanismos oxidativos que promovem alterações irreversíveis impedindo a capacidade de replicação das células (SILVA *et al.*, 2011).

O ensaio de determinação do mecanismo de morte celular da linhagem tumoral (HeLa) com o complexo C7 utilizou a técnica de citometria de fluxo em que a anexina (marcador) liga-se a fosfatidilserina (fosfolípido) externalizada pela célula quando a mesma entra em processo de apoptose inicial, já que há uma deformação da membrana plasmática celular. O iodeto de propídeo é um marcador nuclear fluorescente utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas, assim, intercala-se no DNA, desde que a membrana celular esteja permeável, isto é, tenha perdido sua integridade. Os gráficos apresentados na figura 15 estão divididos em quadrantes que apresentam as porcentagens de: Q1 – morte celular por necrose; Q2 – morte celular por apoptose tardia; Q3 – apoptose inicial e Q4 – células viáveis.

Comparando-se o controle negativo (células sem tratamento com dupla marcação: anexina e iodeto de propídeo) (Figura 15-A) e o complexo C7 nas concentrações de 1,4 $\mu$ M (figura 15-B) e 2,8 $\mu$ M (figura 15-C), entende-se que houve um maior índice de apoptose tardia (5,66% e 10,60%, respectivamente). Quando comparado os quadrantes Q3 dos tratamentos com o complexo C7 e o controle, é possível notar que não houve alteração significativa para a concentração de 1,4 $\mu$ M; já para a concentração de 2,8 $\mu$ M observa-se uma maior diferença comparando-se com o mesmo referencial, assim, o composto em questão pode estar provocando apoptose inicial nas células tumorais. Analisando o quadrante Q1, tem-se que no controle negativo há uma taxa de 9,45% de necrose e nos tratamentos (1,4 $\mu$ M e 2,8 $\mu$ M) de 8,28% e 8,48%, respectivamente, não indicando significância estatísticas.

Resultados semelhantes aos observados para o complexo C7 foram relatados por Santini et al. (2013), que apresentou a capacidade de alguns complexos de cobre associados a análogos do fenol em promoverem a morte celular por apoptose em células de câncer de mama e de próstata.

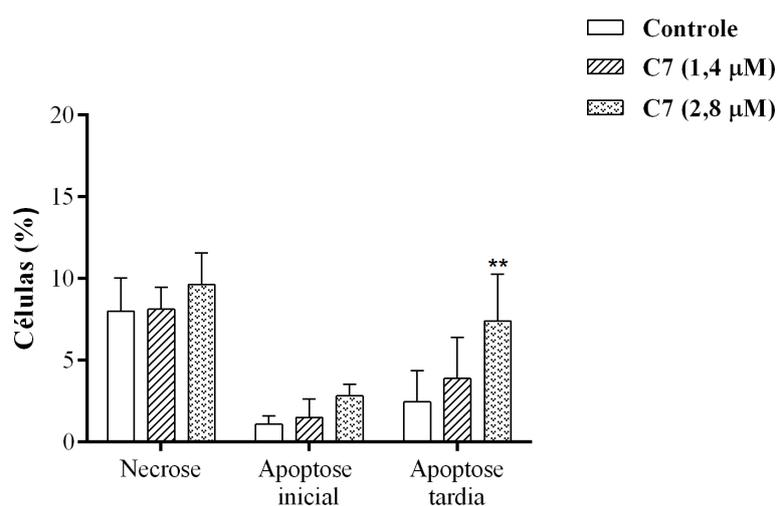


**Figura 15.** Análise relativa ao tipo de morte celular que o complexo C7 provoca nas células tumorais (HeLa) por citometria de fluxo. **A)** Controle para marcação com anexina e iodeto de propídeo; **B)** concentração de 1,4  $\mu$ M e **C)** de 2,8  $\mu$ M do complexo C7.

Reafirmando os resultados apresentados (figura 15) quanto ao teste de apoptose celular para as células tumorais, as concentrações de 2,8 e 1,4 $\mu$ M para o complexo C7 permitiram a avaliação do gráfico das células contadas em função do tipo de morte celular avaliado (figura

16). Para as mortes celulares provocadas por necrose e apoptose inicial observa-se um perfil semelhante ao controle em ambas concentrações; já na apoptose tardia há uma maior quantidade de células apresentando esse mecanismo de morte.

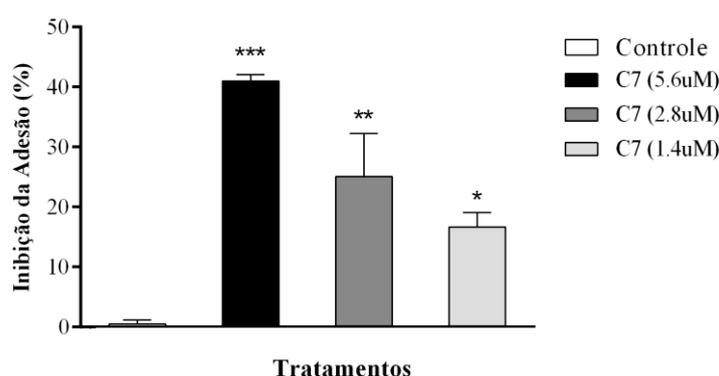
A apoptose é um mecanismo de defesa celular quando há alguma alteração do seu material genético ou influência de agentes patogênicos (POPOLIN, 2016). Alguns trabalhos analisaram a capacidade de complexos metálicos, como alguns análogos da cisplatina (dicloro(4,40-bis[methoxi]-2,20-bipiridina)platina e dicloro(4,40-bis[3-methoxi-n-propil]-2,20-bipiridina)platina) (VO *et al.* 2010), em causar morte celular por apoptose na linhagem MDA-MB-435. Faria (2015) apresentou resultados semelhantes aos do complexo C7 para o mecanismo de morte celular, em que um novo protótipo sintetizado utilizando o complexo de rutênio *cis*-[RuCl(BzCN)(phen)(dppb)]PF<sub>6</sub> foi capaz promover apoptose tardia em células da linhagem S180 utilizando a técnica de Anexina V/PI. Além do mais, a propensão do complexo C7 em provocar a morte das células tumorais é comparável com o observado por Espinal-Enríquez *et al.* (2015) em complexos de cobre Cas II-gly, porém com metodologia diferente da utilizada no presente trabalho.



**Figura 16.** Gráfico de apoptose vs necrose através da técnica de citometria de fluxo nas células tumorais (HeLa) com diferentes concentrações (2,8µM e 1,4µM) comparadas com o controle negativo do complexo C7; \*\* p < 0,001.

Entre os complexos de cobre(II) em fase de investigação clínica tem-se as Casiopeínas<sup>®</sup>, cuja fórmula geral é dada por  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$  ou  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$ , em que N-N pode ser o ligante 1,10-fenantrolina ou 2,2'-bipiridina substituídas, o O-O representa o acetilcetonato ou o salicilaldeído e o O-N refere-se a um aminoácido ou peptídeo. Estudos mostraram que as Casiopeínas<sup>®</sup> são capazes de inibir a proliferação das células provocando morte celular por apoptose; há ainda que nas células da linhagem HeLa, as mesmas provocam uma liberação significativa de fatores apoptóticos, levando à ativação de caspases celulares e morte celular por apoptose; tal mecanismo pode ser mediado por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio, toxicidade mitocondrial ou pela interação desses complexos com o DNA da célula alvo (FONSECA, 2014; PLATAS-SILVA, 2015).

O ensaio de adesão celular, que foi realizado com o complexo C7, mostrou a capacidade de alteração da adesão das células tumorais (HeLa) quando tratados com as concentrações de 5,6 $\mu\text{M}$ , 2,8  $\mu\text{M}$  e 1,4 $\mu\text{M}$ , apresentando, respectivamente, 40,98%, 29,34% e 16,64% de inibição da adesão. Desta maneira, fica sugerido que poderia haver um potencial do composto em questão em diminuir ou evitar a ocorrência de metástase no organismo.



**Figura 17.** Gráfico da porcentagem de células tumorais (HeLa) aderidas após tratamento com o complexo C7 em diferentes concentrações (5,6 $\mu\text{M}$ ; 2,8 $\mu\text{M}$  e 1,4 $\mu\text{M}$ ); as significâncias estatísticas se deram em relação ao controle; valores de significância estatística para  $p < 0,001$  em relação ao controle.

As células tumorais interagem com diferentes componentes da matriz extracelular durante o processo de metástase (POPOLIN, 2016). Diante dessas informações, dados

referentes a inibição da adesão das células tumorais (HeLa) pelo complexo de cobre(II) C7 se assemelham com o estudo realizado por Popolin (2016) nas linhagens MDA-MB-231 (câncer de mama), em que se observou uma inibição de 35% e 51% da adesão dessas células nas concentrações de 20 e 40 $\mu$ M tendo como tratamento o complexo de rutênio.

Ainda é importante ressaltar que as células tumorais apresentam como moléculas fundamentais para o seu desenvolvimento as chamadas metaloproteases, enzimas proteolíticas relacionadas com os processos de invasão e metástase de células cancerosas. Na presença dessas metaloproteases há degradação da lâmina basal, o que contribui para o processo de invasão de células normais através das células neoplásicas (RIBEIRO *et al.*, 2008). Diante desse fato, tem-se que o composto 1,10-fenantrolina, utilizado como ligante para a formação do complexo C7 avaliado no presente trabalho, é um inibidor de metaloproteases (COMINATTI, 2004). Portanto, há uma provável atuação desse complexo na inibição da ocorrência de metástase nas células tumorais HeLa analisadas.

Novamente é admissível a potencialidade do complexo de cobre(II) C7 em atuar como agente antitumoral, já que apresenta resultados muito semelhantes aos observados na literatura em relação ao tratamento de células tumorais com complexos metálicos.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse presente trabalho, conclui-se que os complexos C7 e C8 exibem ação citotóxica para a linhagem tumoral (HeLa) e na linhagem não tumoral (HUVEC) foi verificada uma toxicidade celular muito baixa. Quanto ao complexo C9 houve uma ação citotóxica pequena nas células HeLa, enquanto que nas células HUVEC apresentou uma maior atividade, o que impossibilitou a continuidade dos estudos antitumorais para tal complexo, já que o interesse se encontra no tratamento contra o câncer de modo que as células normais do organismo sejam pouco afetadas.

Além disso, os complexos C7 e C8 apresentaram ação de antiproliferação celular (HeLa). Já o complexo C7 provavelmente apresenta como mecanismo de morte celular a apoptose tardia. Além disso, é capaz de atuar na inibição da adesão das células HeLa. Os ligantes estudados não apresentam efeitos de citotoxicidade significativos.

Portanto, o complexo C7 apresentou maiores perspectivas de acordo com os ensaios de citotoxicidade, antiproliferação, apoptose e adesão sendo possível utilizar baixas concentrações para obter ação antitumoral desejada, demonstrando ser um bom candidato ao desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido ao grande potencial dos complexos como potenciais agentes antitumorais observado nos resultados, se faz necessário a complementariedade dos mesmos através de outros testes como migração celular, angiogênese, alteração morfológica, teste de genotoxicidade e ensaios *in vivo*, para comprovar a capacidade antitumoral e o mecanismo de ação celular desses dos complexos de cobre avaliados nesse trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. *Biologia Molecular da Célula*. **Artmed**, ed.5, p. 1205-1206. 2010.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Biologia Molecular da Célula**. Artamed, ed.6, p. 1092-1098. 2017.
- ALMEIDA, J. C. et al. Copper(II) complexes with b- diketones and N-donorheterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron** v.89, p.1–8, 2015.

- ALMEIDA, Janaina do Couto; GUERRA, Wendell. **Estrutura dos complexos de cobre**. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia. 2017.
- ALMEIDA, V. L. De 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.
- ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino de et al. Compostos coordenados híbridos de platina no tratamento do câncer. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Recife, v. 3, n. 35, p.337-345, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2010**. Atlanta: American Cancer Society, 2010.
- BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Immunotherapy**, v.58, p.317-324, 2009.
- BEDOWR, Noha Said; YAHYA, Rosiyah Binti; FARHAN, Nesrain. Structural characterization of copper (II) tetradecanoate with 2,2'-bipyridine and 4,4'-bipyridine to study magnetic properties. **Journal os Saudi Chemical Society**. 6 p., 2017.
- BORTOLOTTO, T. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos de cobre(II) derivados de tetraciclinas e 1,10-fenantrolina**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2011.
- CARVALHO, Marcos Alberto. **Síntese e caracterização estrutural de complexos metálicos com ligantes bioativos N,O-doadores e estudo das suas atividades biológicas *in vitro***. Instituto de Química, Universidade de Campinas. p.34-35. 2015.
- CARVALHO, Maria Cristina de Melo Pessanha. **Lesões precursoras do câncer cervicouterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem ginecológica**. Escola Anna Nery. v. 14, p. 617-624. 2010.

CAVALCANTE, Nayara Gabrielle Souza. **Estudo comparativo entre complexos de cobre com ligantes bases de schiff sintetizados a partir da quitosana**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2016.

CHANDRALEKA, S.; RAMYA, K.; CHANDRAMOHAN, G.; DHANASEKARAN, D.; PRIVADHARSHINI, A.; PANNERSELVAM, A. Antimicrobial mechanism of copper (II) 1,10-phenantroline and 2,2'-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.18, n. 6, p. 953-962. 2011.

COMINETTI, Márcia Regina. **Estudo de efeitos de metaloproteínases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica**. Tese (Doutorado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. 209 p. 2004.

D'ANGELO, S. P.; TAP, W.D.; SCHWARTZ, G. K.; CARVAJAL R. D. Sarcoma Immunotherapy: Past Approaches and Future Directions. **Hindawi Publishing Corporation**. v. 2014, 13 p. 2014.

DONNICI, Claudio Luis; OLIVEIRA, Ione Maria Ferreira; TEMBA, Eliane Sílvia Codo; CASTRO, Maurício Rogério. Métodos Sintéticos para preparação de 2,2'-bipiridinas substituídas. **Química Nova**. v. 25, n. 4. 2002.

ESPINAL-ENRÍQUEZ, J.; HERNÁNDEZ-LEMUS, E.; MEJÍA, C; RUIZ-AZUARA, L. Network Analysis Shows Novel Molecular Mechanisms of Action for Copper-Based Chemotherapy. **Frontiers in Physiology**. 6:406. 2015.

FARIA, Raquel Santos. **Busca de novo protótipo a base de rutênio candidato à utilização na terapia antineoplásica**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. 86 p. 2015.

FERREIRA, B. J. M. L. et al. Synthesis, structural characterization , cytotoxic properties and DNA binding of a dinuclear copper(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 161, p. 9 –17, 2016.

FONSECA, Alexandra de Souza. **Síntese, caracterização e avaliação de citotoxicidade de novos ligantes não-simétricos e seus complexos mononucleares, homo e heterobinucleares**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. 71 p. 2014.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Química Nova na Escola**, n.6, p.13-18, 2005.

GONÇALVES, Cristiane Batista. **Síntese, Caracterização e Determinação Estrutural de Complexos de Cobre(II) com Derivados de Hidroxibenzofenonas**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

GUEDES, Cristiano. **Uma mulher negra, suas células e alguns desafios da ética em pesquisa**. Instituto de Ciências Humanas, Universidade de Brasília. v.20, supl., p.1413-1416. 2013.

GLIŠIĆ, B. D. et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA-binding properties of copper(II) complexes with terpyridine. **Polyhedron**, n. Ii, 2017.

GUERRA, Wendell et al. Synthesis, cytotox and antitubercular activities of copper(II) complexes with heterocyclic bases and 3-hydroxypicolinc acid. **Inorganica Chimica Acta**, n. 446, p.87-92, mar. 2016.

HANAHAN, D. E Weinberg, R. A. Chapter 2: Hallmarks of Cancer: An Organizing Principle for Cancer Medicine. **Health Library**. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Organização Mario Jorge Sobreira da Silva. – 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2017. 108 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 126 p. 2016.

JHAM, B. C.; ADDAH, R. DA S. F. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 5, p. 30180–112, 2006.

KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia Básica e Clínica**. Amg, ed. 12, p. 949-953. 2014.

LANGNER, Ewa; WALCZAK, Katarzyna; RAJTAR, Grażyna. Quinaldic acid inhibits proliferation and affects signaling pathways in human colon cancer cells – *in vitro* studies. **Pharmacological Reports**. 2013.

LANGNER, Ewa; WALCZAK, Katarzyna; JELENIEWICZ, Witold; TURSKI, Waldemar A.; RAJTAR, Grażyna. Quinaldic acid inhibits proliferation of colon cancer HT-29 cells in vitro: Effects on signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**. p. 21-27. 2015.

LIANG, Jia-Xin; ZHONG, Hai-Jing; YANG, Guanjun; VELLAISAMY, Kasipandi; MA, Dik-Lung Ma; LEUNG, Chung-Hang. Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity Pt. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. June, p. 0–1, 2017.

LIU, Y.; HING, H.; HANG, X.; SHI, X.; LIANG, F. CHEGNG, G.; LU, U.; MA, D. **Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism**. Huazhong University of Science and Technology. 2008.

LUCEY, B.P., NELSON-REES, W.A., HUTCHINS, G.M. **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination**. Archives of pathology and laboratory, vol 133, 1463 – 1467. 2009.

LUSTOSA, A. M. L.; BARBOSA, C. N. B.; SAMPAIO, C. T. Oncologia Básica. **Fundação Quixote**, ed. 1, p. 221-222. 2012.

MATOS, Matheus Carvalho; OLIVEIRA, Luís Fernando Rocha; POLLONI, Lorena; Silva, Ana Carolina de Seni; ALMEIDA, Janaína do Couto; GUERRA, Wendell; JÚNIOR, Robson

José Oliveira. Avaliação citotóxica in vitro do complexo metálico de cobre derivado do cobre II [Cu(BTAC1)(phen)ClO<sub>4</sub>] em TG180, Raw 264.7 (macrófago), Erlich e NIH-3T3 (fibroblasto). **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e aplicada**. v. 38. 2017.

MENDONÇA, V. G; GUIMARÃES, M. J. B; LIMA FILHO, J. L; MENDONÇA, C. G; MARTINS, D. B. G; CROVELLA, S; ALENCAR, L. C. A. Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 32:476-85. 2010.

OLIVEIRA, Aimée Ataíde. **Síntese e Caracterização de Complexos e Cobre(II) com Ligantes Vanilóides**. 2016. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

PAZINATO, Jaqueline. **Síntese e caracterização de complexos de  $\eta^6$ -arenorutênio(II) e 2,2'-bispiridinarutênio com ligantes baseados em feniletinil-piridina e finalazo-piridina**. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 104 p. 2014.

PEREIRA, Dayane Kelly Sabec. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos sintetizados com ligantes orgânicos**. Dissertação (Mestrado) Ciências aplicadas a Saúde. Universidade Federal de Goiás. 157 p. 2015.

PLATAS-SILVA, Christian; GUERRERO-BELTRÁN, Carlos Enrique; CARRANCÁ, Mariana; CASTILLO, Elena Cristina; BERNAL-RAMÍREZ, Judith; OROPEZA-ALMAZÁN, Yuriana; GONZÁLEZ, Lorena N.; ROJO, Rocío; MARTÍNEZ, Luis Enrique; VALIENTE-BANUET, Juan; RUIZ-AZUARA, Lena; BRAVO-GÓMEZ, María Elena; GARCÍA, Noemí; CARVAJAL, Karla; GARCÍA-RIVAS, Gerardo. Antineoplastic copper coordinated complexes (Casiopeinas) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. *J Bioenerg Biomembr*. **Springer**. 12 p., 2015.

POPOLIN, Cecília Patrícia. **Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama.** Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos. 66 p. 2016.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Farmacologia. **Elsevier**, ed. 8, p. 1569-1570. 2016.

RIBEIRO, Rosi Iara Maciel Azambuja; JÚNIOR, Paulo César Borges; CARDOSO, Sérgio Vitorino; CANDELORI, Ignez; ESPÍNDOLA, Foued Salmen; CASSALI, Geovanni Dantas; LOYOLA, Adriano Mota. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em carcinomas basocelulares. **J Bras Patol Med Lab.** v. 44, n. 2, p. 115-121. 2008.

RODRIGUES, Ciliane Alves et al. Prevenção de câncer de colo do útero: conhecimento de mulheres assistidas em uma unidade básica de saúde da família. **Mostra Interdisciplinar do Curso de Enfermagem**, Centro Universitário Católico de Quixadá, v. 2, n. 1, 3 p., jun. 2016.

SANTINI, Carlo; PALLEI, Maura; GANDIN, Valentina; PORCHIA, Marina; TISATO, Francesco; MARZANO, Cristina. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews.** v. 114, n. 1, p. 815-862, 2013.

SANTOS, Demétria Beatriz Alvarenga; LATTARO, Renusa Campos Costa; ALMEIDA, Denize Alves. Cuidados paliativos de enfermagem ao paciente oncológico terminal: revisão da literatura. **Revista de Iniciação Científica da Libertas.** v.1, n.1 p. 72-84, dez. 2011.

SEGURA, Daniel Fonseca. **Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos de prata(I) contendo ligantes baseados na 1,10-fenantrolina e tiouréia.** Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Paulista. 137 p. 2014.

SOUZA, Ronan Farias Freire. **Compostos de paládio(II) contendo acetofenona oxima ortometalada: síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica.** Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho. 83 p. 2017.

SILVA, P.P.; *et al.* Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. **ACS Publications**, 2011.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014. 632p.

STEWART, Bernard. W.; KLEIHUES, Paul. **World cancer report**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2003. 342p.

TEIXEIRA, R. G. *et al.* Novel ruthenium methylcyclopentadienyl complex bearing a bipyridine perfluorinated ligand showing strong activity towards colorectal cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

VO, V. *et al.* Novel 4,4'-diether-2,2'-bipyridine cisplatin analogues are more effective than cisplatin at inducing apoptosis in cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1163–1170, 2010.

VOLGELSTEIN, Bert; PAPADOPOULOS, Nickolas; VELCULESCU, Victor E.; ZHOU, Shibin; JÚNIOR, Luis A. Diaz; KINZLER, Kenneth W. Cancer genome landscapes. **Science**. v. 339, p. 1546-1558, mar. 2013.

WELCH, Danny R.; STEEG, Patricia S.; RINKER-SCHAEFFER, Carrie W. Molecular biology of breast cancer metastasis: Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. **Breast Cancer Research**. v. 6, p. 408–416. 2000.