

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR/UNESP

RAMON HANDERSON GOMES TELES

**EFEITOS DE COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE NO CÂNCER DE
MAMA TRIPLO NEGATIVO**

SÃO CARLOS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DE COMPLEXOS METÁLICOS DE COBRE NO CÂNCER DE
MAMA TRIPLO NEGATIVO**

Ramon Handerson Gomes Teles

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti

SÃO CARLOS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Ramon Handerson Gomes Teles, realizada em 06/09/2019:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi
UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me apoiaram em tudo, bem como a todos de minha família.

Dedico também à Donária, por seu amor e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Sempre primeiramente à Deus, que me permite viver a cada segundo o milagre da vida, experienciando tantas maravilhas e com tantas bênçãos.

Aos meus pais e familiares, que muito me apoiam nas decisões tomadas ao longo desta curta trajetória de vida acadêmica.

À Donária, que tem uma paciência infinita, que transborda calma, que me acalma e tão bem me acolhe nos momentos de tormenta... Meu amor!

À Angélica e Carol, que transmitiram muito mais que conhecimentos acadêmicos, constituíram em mim uma significativa parcela de construção pessoal, senso crítico, olhar científico, muito humor, compartilhamento de desabafos, cafés...

À minha orientadora, que me acolheu de uma forma que nunca imaginei, que sempre conversou comigo de uma maneira inacreditável, que sempre conduziu as conversas com maestria, lapidando os pensamentos ainda malformados em ideias ‘promissoras’ (palavra preferida dela).

Ao LABEN, por tantos ensinamentos, pelo treinamento cognitivo com conversas transitando em vários temas em curtíssimos intervalos de tempo, pelos compartilhamentos de inúmeras emoções, pelos momentos de guloseimas, pelos incontáveis instantes que se tornam únicos e indescritíveis.

Ao Prof^o Pedro Corbi e Douglas Nakahata, que por meio da parceria estabelecida entre nossos grupos de pesquisas tornou este trabalho possível, agradeço pelo entusiasmo com os resultados, as discussões desenvolvidas e a todo suporte prestado.

À Prof^a Marxa Figueiredo, Cosette Rivera-Cruz, todo o grupo do laboratório, também à Alexandra Albakyan e à Mariana Sperm; todos me proporcionaram uma experiência no exterior ímpar, agradeço cada uma das dicas no projeto, as orientações a cada experimento, as aulas de inglês em cada almoço, todos os risos gerados, as amizades firmadas e reforçadas no *Lavazza time* com o *double espresso* sempre acompanhando os 20 minutos de ‘cafêterapia’.

Aos meus colegas do Ceará, Piauí, São Paulo, Purdue (EUA), Colômbia, e de tantos outros locais que tive a felicidade de conhecer; pelos momentos de discussões, descontrações e mais cafés.

Aos meus companheiros de pesquisa do LAMFIM (UFPI), em especial Yago, Tarcisio e Prof^o Marcelo Filgueiras; também ao Prof^o Cristiano, esse é um local que tenho extremo apreço, cujas pessoas contribuíram infinitamente na minha formação desde o começo da graduação e que espero sempre ter suas amizades.

E a todos que não mencionei, mas fizeram parte de minha trajetória e deste trabalho.

Agradecimento à FAPESP

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, por meio dos processos nº2017/19504-0 e nº2018/17170-0 e com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES

“Aquieta-te, e saibas que Eu sou teu Deus”

Salmo 46, 10

“(…) and be a simple kind of man

Be something you love and understand

And don't forget, son, there is someone up above”

Lynyrd Skynyrd

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum no mundo e pode ser considerado uma doença com bom prognóstico se diagnosticado precocemente e tratado oportunamente. O tratamento do câncer de mama tem como objetivos principais aumentar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida da mulher. Os fármacos utilizados na quimioterapia causam danos ao DNA, tanto das células tumorais, como também das normais. O cisplatina é considerado um dos melhores medicamentos no tratamento de vários tipos de câncer no mundo, contudo apresenta diversos efeitos colaterais. Pesquisas realizando a substituição da platina por outro centro metálico, como o cobre e rutênio, mostram vantagens principalmente na capacidade de diminuir efeitos colaterais. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de complexos de cobre em modelos experimentais *in vitro* em diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais de mama. Para isso, diferentes experimentos *in vitro* foram realizados utilizando as linhagens celulares não-tumoral de mama humana MCF-10A, as células tumorais humanas MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR3, fibroblasto de camundongo L929 e tumoral de camundongo 4t1. Os resultados demonstram que o complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{sdmx})_2(\text{phen})].\text{H}_2\text{O}$ foi o mais eficaz em induzir a toxicidade em células tumorais de mama do subtipo triplo negativo (MDA-MB-231), em comparação com a linhagem não tumoral de mama MCF-10A, que se mostrou ligeiramente mais resistente ao mesmo complexo. Ainda, este foi capaz de diminuir o número e tamanho de colônias, modificar a estrutura do citoesqueleto, e inibir a migração celular. Também foi constatado a importância do transportador de cobre 1, CTR1, por meio de transfecção celular. Após este processo, observou-se aumento da expressão gênica de CTR1 em aproximadamente dez vezes nas células MDA-MB-231 transfectadas, e que o complexo $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ mostrou-se mais citotóxico nestas células em comparação às células não transfectadas, podendo isto ser atribuído à presença de pontos vacantes no cobre por meio da perda dos íons cloretos, o que permite sua interação com o CTR1 e maior captação por meio deste. Em suma, os resultados mostram que os complexos $[\text{Cu}(\text{sdmx})_2(\text{phen})].\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ foram citotóxicos para as células tumorais da linhagem MDA-MB-231 e que o aumento da expressão de CTR1 provocou sensibilização nas células transfectadas frente ao tratamento com o complexo $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$. Mais estudos devem ser realizados com os complexos $[\text{Cu}(\text{sdmx})_2(\text{phen})].\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ visando a compreensão dos mecanismos de ação e a influência do CTR1 neste processo. Além disso, considerar o CTR1 como alvo em células tumorais embasa o desenvolvimento de estratégias que se utilizem do desenho racional de fármacos visando melhorar a eficácia terapêutica, por meio de maior especificidade e consecutiva redução de efeitos colaterais.

Palavras-chave: câncer, câncer de mama, metástase, complexos de cobre

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type in the world and can be considered a disease with good prognosis if diagnosed early and treated timely. The treatment of breast cancer aims to increase survival and improve the quality of life of women. Chemotherapy drugs cause DNA damage to both tumor and normal cells. Cisplatin is considered one of the best drugs in the treatment of various cancers in the world, but it has several side effects. Research into replacing platinum with another metal center, such as copper and ruthenium, shows advantages mainly in its ability to lessen side effects. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the effect of copper complexes in in vitro experimental models on different tumor and non-tumoral breast cell lines. For this, different in vitro experiments were performed using the non-tumor human breast cell lines MCF-10A, the human tumoral cell lines MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR3, mouse fibroblast L929 and mouse tumor 4t1. The results demonstrated that the copper $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ complex was the most effective in inducing toxicity in triple negative subtype breast tumor cells (MDA-MB-231) compared to non-tumoral breast cell line MCF-10A, which was slightly more resistant to the same complex. Furthermore, it was able to decrease the number and size of colonies, modify the structure of the cytoskeleton, and inhibit cell migration. The importance of copper transporter protein 1, CTR1, was also verified by cell transfection, in which after this process, gene expression was increased approximately ten-fold in transfected MDA-MB-231 cells, and that the complex $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ was more cytotoxic in these cells compared to non-transfected cells. This can be attributed to the presence of vacant points in copper through the loss of chloride ions, which allows their interaction with CTR1 and greater uptake through it. In summary, the results show that the $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ complexes were cytotoxic to tumor cell line MDA-MB-231 and that increased expression of CTR1 caused sensitization in transfected cells upon treatment with the $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ complex. Further studies should be performed with the $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ complexes for understanding of the mechanisms of action and the influence of CTR1 in this process. In addition, considering CTR1 as a target in tumor cells supports the development of strategies that use rational drug design to improve therapeutic efficacy through greater specificity and consecutive reduction of side effects.

Keywords: cancer, breast cancer, metastasis, copper complexes

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. METALOFÁRMACOS ANTICÂNCER DE PLATINA APROVADAS PELO FDA (USA).....	19
FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DO ELESCLOMOL	22
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DA CASIOPEÍNA III-IA.....	23
FIGURA 4. (A) ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPLEXO [CU(SDMX) ₂ (PHEN)].H ₂ O. (B) ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPLEXO [CUCL ₂ (-IMPY)].	24
FIGURA 5. (A) ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPLEXO [CU(SDMX) ₂ (PHEN)].H ₂ O. (B) ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPLEXO [CUCL ₂ (-IMPY)].	30
FIGURA 6. MAPA DO VETOR PMCV6-SCL31A1 UTILIZADO PARA A TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS MDA-MB-231 COM A REGIÃO DE INTERESSE INDICADA PELO GENE SLC31A1 (CTR1).	37
FIGURA 7. EFEITO DO COMPLEXO (4) NA MORFOLOGIA NAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MDA-MB-231.....	40
FIGURA 8. EFEITO DO COMPLEXO (4) NA MORFOLOGIA NAS CÉLULAS NÃO TUMORAIS DE MAMA MCF-10A.	41
FIGURA 9. EFEITO DO COMPLEXO (4) SOBRE A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MDA-MB-231.	42
FIGURA 10. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO (4) NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MDA-MB-231.	44
FIGURA 11. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO (4) SOBRE A ORGANIZAÇÃO DOS FEIXES DE ACTINA DO CITOESQUELETO E NO NÚCLEO CELULAR DAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MDA-MB-231.	46
FIGURA 12. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INDUZIDAS PELO COMPOSTO (4) NA LINHAGEM CELULAR TUMORAL DE MAMA MDA-MB-231.	47
FIGURA 13. EFEITO DO COMPOSTO (4) NO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MDA-MB-231.....	47
FIGURA 14. EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE METAIS EM CÉLULAS PARENTAIS TUMORAIS DE MAMA MDA-MB-231, MCF-7 E SK-BR3, EM COMPARAÇÃO AOS NÍVEIS DA CÉLULA NÃO TUMORAL DE MAMA MCF-10A.....	48
FIGURA 15. EXPRESSÃO DO GENE SCL31A1 (CTR1) ENTRE AS CÉLULAS TUMORAIS MDA-MB-231 PARENTAIS E TRANSFECTADAS.	49
FIGURA 16. VALORES DE IC ₅₀ (CONCENTRAÇÃO TÓXICA PARA 50% DAS CÉLULAS) DOS COMPOSTOS DE COBRE (4) - [CU(SDMX) ₂ (PHEN)].H ₂ O - E (8) - [CUCL ₂ (-IMPY)].....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA RT-QPCR CORRESPONDENTES AS ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NO <i>UPTAKE</i> E TRANSPORTE DE COBRE.....	35
TABELA 2. VALORES DE IC50 (CONCENTRAÇÃO TÓXICA EM 50% DAS CÉLULAS) DOS COMPLEXOS DE COBRE, LIGANTES E SAIS DE PARTIDA (24H E 48H DE INCUBAÇÃO) EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA E PRÓSTATA E NÃO TUMORAIS DE MAMA	39
TABELA 3. ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DO COMPLEXO (4) [CU(SDMX) ₂ (PHEN)].H ₂ O.....	40

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1. CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE FECHAMENTO UTILIZADA NO ENSAIO DE *WOUND*

HEALING.....33

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg – Microgramas

µg/mL – Microgramas por mililitro

µl – Microlitro

µM – Micromolar

BPE – *Bovine Pituitary Extract*

cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂ – dióxido de carbono

CTR1 – *Copper transporter 1*

Cu – Cobre

DAPI – *4,6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ER – *Estrogen receptor*

FBS – *Fetal Bovine Serum*

FDA – *Food and Drug Administration*

Fe – ferro

H₂DCFDA - *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

hEGF - Human epidermal growth factor

HER-2 – *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2)*

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular

ID/g – *Injected Dose per Gram of Tissue*

KP1019 – *Indazolium trans-[tetrachlorobis(1h-indazole)ruthenate(III)]*

mg/mL – Miligramas por mililitro

MP – megapixel

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NAMI-A – *Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate*

PBS – *Phosphate buffered saline*

PI – iodeto de propídio

PR – *Progesterone receptor*

RNA – *Ribonucleic acid*

RT-qPCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative Real Time*

Ru – Rutênio

STEAP - Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

UA – Unidades Arbitrárias

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>16</u>
1.1	CÂNCER DE MAMA E TRATAMENTOS	17
1.1	METALOFÁRMACOS.....	18
1.1.1	COMPLEXOS DE COBRE	21
1.2	TRANSPORTADORES DE METAIS	24
2	<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>29</u>
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	<u>MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>30</u>
3.1	COMPLEXOS DE COBRE.....	30
3.2	CULTURA CELULAR	30
3.3	CITOTOXICIDADE	31
3.4	MORFOLOGIA CELULAR.....	32
3.5	FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	32
3.6	<i>WOUND HEALING</i>	33
3.7	IMUNOCOLORAÇÃO	33
3.8	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	34
3.9	CICLO CELULAR	34
3.10	RT-qPCR	35
3.11	TRANSFEÇÃO CELULAR	36
3.11.1	SELEÇÃO CELULAR	36
3.11.2	TRANSFEÇÃO CELULAR.....	36
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4	<u>RESULTADOS.....</u>	<u>38</u>
4.1	VIABILIDADE CELULAR	38
4.2	MORFOLOGIA CELULAR.....	40
4.3	FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	42

4.4	WOUND HEALING	44
4.5	IMUNOCOLORAÇÃO	45
4.6	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	46
4.7	CICLO CELULAR	47
4.8	TRANSFEÇÃO CELULAR	48
4.8.1	RT-QPCR – CÉLULAS PARENTAIS E TRANSFECTADAS.....	48
4.8.2	VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS	49
5	<u>DISCUSSÃO</u>	51
6	<u>CONCLUSÃO</u>	58
7	<u>PERSPECTIVAS</u>	59
8	<u>REFERÊNCIAS</u>	60

1 INTRODUÇÃO

Câncer compreende mais de 100 tipos distintos de alterações com diversos fatores de riscos e epidemiológicos, os quais são originários de diferentes tipos de células e órgãos e é caracterizado pela contínua proliferação celular que pode invadir outros tecidos normais e promover a formação de metástases para órgão distantes (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Câncer é a segunda cause de morte no mundo, precedido apenas pelas doenças cardiovasculares e é associado com o processo de envelhecimento. É esperado que o dobro da população mundial tenha mais de 65 anos em 2035, aumentando a prevalência desta doença e a necessidade de novas formas de tratamento, especialmente em países em desenvolvimento (BRAY et al., 2018).

O tipo mais incidente de câncer é o de pele não melanoma para ambos os sexos, seguido em homens pelos cânceres de próstata e pulmão e nas mulheres pelos de mama e intestino. O câncer de mama é o que mais afeta mulheres no Brasil e no mundo, podendo ser dito como o que se forma nos tecidos da mama, ocorrendo também em homens. No Brasil, a estimativa para o Biênio 2018-2019 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, sendo 59 mil em mulheres; atualmente o de mama constitui 25,2% da incidência (INCA, 2017). O tratamento se torna elevado aos cofres públicos e é estimado crescimento nos gastos de \$290 bilhões em 2010 para \$458 bilhões em 2030. Nos EUA, estima-se que os custos diretos com a doença aumentarão de \$125 bilhões em 2010 para \$156 bilhões em 2020 (BLOOM et al., 2011).

O cis-[diamindicloridoplatina-(II)], cis-[PtCl₂(NH₃)₂], denominado como cisplatina, foi o primeiro complexo inorgânico utilizado na clínica no tratamento do câncer. É um agente antitumoral que interage com o DNA, intra e interfitas, e ativa vias de sinalização citoplasmáticas e nucleares envolvidas na regulação do ciclo celular, reparo do dano e morte celular programada. O cisplatina, após administrado entra na célula por difusão passiva, sofre hidrólise e liga-se ao DNA. Este mecanismo de ação confere toxicidade equivalente entre células normais e cancerígenas, apresentando vários efeitos colaterais, como ototoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e mielosupressão, dentre outros (CEPEDA et al., 2007; PENG et al., 2017). Entretanto, mesmo com a presença de fortes efeitos colaterais, o cisplatina ainda é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer, como de ovário,

cervical e de bexiga, sendo responsável por 90% de casos de cura no câncer testicular (PIZARRO; SADLER, 2009).

Os compostos inorgânicos apresentam algumas vantagens em relação aos orgânicos devido a facilidade na arquitetura da molécula e síntese dos compostos (MARKOWSKA et al., 2015). Assim, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado à prospecção de compostos que aumentem a efetividade real no combate à doença e que propiciem simultaneamente menos custos e mais qualidade de vida ao paciente durante o tratamento. Atualmente muitos metais são investigados e se mostram promissores como antitumorais, destacando-se os complexos de rutênio e cobre (DENG et al., 2017; LU, Mingxia et al., 2017).

1.1 CÂNCER DE MAMA E TRATAMENTOS

Os tumores de mama são categorizados em três principais classes: os que apresentam receptor de estrogênio (ER+) ou receptor de progesterona (PR+), os que apresentam *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2+) com ou sem ER+, e o triplo-negativo (TN) definido pela ausência desses receptores (ENGEBRAATEN; VOLLAN; BØRRESEN-DALE, 2013).

A maioria dos tumores classificados como triplo negativo possui um pior prognóstico comparado a outros subtipos de tumores, pois apresentam maior risco de recorrência no período de três anos, maiores taxas de mortalidade e é altamente metastático, com disseminação para órgãos sólidos como fígado, pulmão e cérebro (ABRAMSON et al., 2015). Os tumores TN são conhecidos por serem mais frequentes em mulheres mais jovens e dos grupos étnicos afro-americanos e hispânicos, possuem um mau prognóstico com relação a cura e sobrevivência e não possuem terapias-alvo (PARISE; CAGGIANO, 2017). O tempo médio de sobrevivência para mulheres com tumor TN é menor que 1 ano, e quase todas morrem dessa doença por conta do tratamento quimioterápico agressivo e tóxico e pela formação de metástases, a qual ocorre principalmente nos tecidos: pulmonar, cerebral, ósseo e em linfonodos, tornando o tratamento ainda mais difícil que em outros tipos de tumores (ABRAMSON et al., 2015).

O tratamento do câncer de mama é constituído principalmente por cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. Na quimioterapia, as pesquisas para encontrar novos fármacos antitumorais representam um campo repleto de desafios. O agente quimioterápico ideal deve agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento de células

tumorais, deixando as células normais intactas (XIANG et al., 2015). Entretanto, a maioria dos fármacos atualmente usados na quimioterapia causa dano ao DNA em ambas células tumorais e normais, levando à morte de células em rápida divisão e caracterizando os indesejáveis efeitos colaterais. Tais efeitos resultam da alta toxicidade dos atuais agentes quimioterápicos, os quais especialmente afetam células normais com um alto ritmo de divisão, tais como a linhagem hematopoiética, medula óssea e até mesmo células do bulbo piloso e mucosa do sistema digestivo (CEPEDA et al., 2007).

Assim, diferentes classes de fármacos são testadas para minimizar o impacto de efeitos adversos e aumentar a eficácia. Compostos inorgânicos têm mostrado algumas vantagens comparadas aos compostos orgânicos devido a sua estrutura mais simples e facilidade de síntese. Atualmente, muitos metais investigados são considerados promissores como agentes antitumorais, em particular complexos de rutênio e de cobre (MARKOWSKA et al., 2015).

1.1 METALOFÁRMACOS

O tratamento do câncer é constituído basicamente por: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Na quimioterapia, a busca por quimioterápicos que atuem seletivamente na morte ou inibição do crescimento das células neoplásicas, deixando as não tumorais intactas é o objetivo de muitos estudos (LU, Jie et al., 2010). Contudo, a maioria dos medicamentos usados em quimioterapia, orgânicos ou inorgânicos, é mutagênico e provoca danos ao DNA, tanto nas células tumorais quanto nas não tumorais, causando a morte das células de divisão rápida, o que está associado aos efeitos colaterais observados, devido à alta toxicidade desses medicamentos (RABIK; DOLAN, 2012).

Um dos mais antigos e conhecidos metalofármacos é o cisplatina (cis-diamindicloridoplatina (II)), um complexo quadrado planar Pt^{+2} . Este foi primeiramente sintetizado por Peyrone em 1844, mas suas propriedades anticâncer foram descobertas mais de 100 anos depois, por Rosenberg na década de 1960 (ROSENBERG et al., 1969), sendo estas exploradas, patenteadas e aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em dezembro de 1978 (MJOS; ORVIG, 2014). Usada como agente único ou em combinação, cisplatina constitui um fármaco *blockbuster* e um dos metalofármacos de maior sucesso até dias atuais, sendo também considerada parte de um tratamento padrão contra diferentes formas de câncer (ALDERDEN; HALL; HAMBLEY, 2006).

Após a remoção cirúrgica do tecido tumoral maligno, dependendo do tipo do tumor, os pacientes sofrem ciclos de injeções intravenosas de cisplatina, que tem por mecanismo de ação a Pt^{+2} , a formação de ligações intercalantes nas sequências de dinucleotídeos GC e AG no DNA, levando a inibição de replicação e transcrição, parada do ciclo-celular, reparo de DNA e apoptose (ALDERDEN; HALL; HAMBLEY, 2006) Como principal consequência observada durante o tratamento, há uma grande quantidade efeitos colaterais decorrentes da alta citotoxicidade do complexo. Em virtude disso, ao longo dos anos, as pesquisas sobre fármacos de núcleo metálico de platina para terapia anticâncer aumentaram, desde 1979 até início de 2015, 1055 complexos de platina foram testados e 185 foram ativos, destes, apenas cinco são aprovados para comercialização, sendo oxaliplatina e carboplatina os únicos aprovados nos países ocidentais (figura 1) (MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009; ROBERTS et al., 2016; WHEATE et al., 2010).

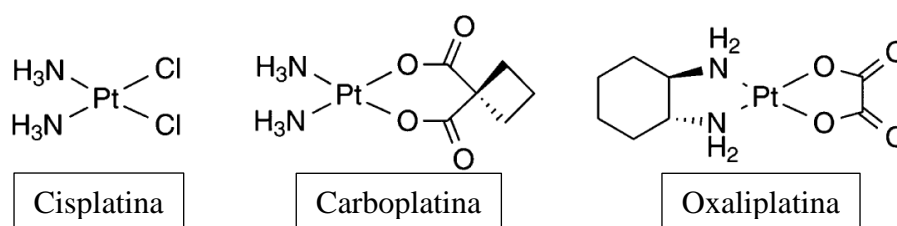


Figura 1. Metalofármacos anticâncer de platina aprovadas pelo FDA (USA).

A carboplatina constitui a segunda geração de metalofármaco derivado do cisplatina, tendo um mecanismo de ação similar e diferindo apenas em termos de estrutura e toxicidade, sendo também uma das principais metalofármacos usadas como quimioterápico. Esta é utilizada especificamente para o tratamento do câncer de testículo, ovário, cabeça e pescoço, e de pulmão de células não pequenas (CHANG et al., 2014). Para ser ativado, a droga deve atravessar a membrana da célula e, uma vez no interior, sofrer hidrólise do 1,1-ciclobutanodicarboxilato, tornando-se carregada positivamente e permitindo a interação com moléculas nucleófilas, incluindo DNA, RNA e proteínas, gerando a formação de adutos de platina (FONSECA DE SOUSA; RODRIGUES WLODARCZYK; MONTEIRO, 2014). Embora favoreça menos efeitos colaterais que o cisplatina, também possui menor potência terapêutica, devido as diferenças nas proporções da formação de adutos com o DNA, porém, a resistência ao tratamento é o maior problema para com seu uso, devido a vias de detoxificação citoplasmáticas e assim

a necessidade de aumento da dose ou mudança no plano de tratamento (SHAHZAD; LOPEZ-BERESTEIN; SOOD, 2009).

A oxaliplatina é um metalofármaco da terceira geração de derivados do cisplatina, diferindo deste pela presença de diaminociclohexano substituindo os grupos amina. Surgiu da necessidade de encontrar uma alternativa menos tóxica quando comparado ao cisplatina e que tivesse ação principalmente no tratamento do câncer colorretal, que é uma limitação do seu precursor. A fase I de um estudo que avaliou a atividade e segurança de uma gama de doses encontrou efetividade do tratamento contra câncer de pulmão, mama, melanoma e hepatoma (MATHÉ et al., 1986). Neste estudo observou-se que em doses maiores que 135mg/m², a neuropatia periférica foi o principal efeito colateral observado (EXTRA et al., 1990). Para mais, oxaliplatina exerce significativos efeitos terapêuticos no câncer colorretal quando em combinação com 5-fluorouracil. Tem essencialmente o mesmo mecanismo de ação que o cisplatina, com a formação de interações no DNA, bem como os mesmos efeitos citotóxicos em doses altas e por longo prazo, sendo a neuropatia periférica seu agravante e motivo de substituição do plano de tratamento (ALCINDOR MD; BEAUGER PHD MBA, 2011).

Diferentemente do cisplatina e seus derivados, os quais geram toxicidade severa e resistência no tratamento, alguns complexos de rutênio vêm apresentando propriedades anticancerígenas e antimetastáticas, com poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2011). Dependendo da estrutura e estado de oxidação destes complexos, estes podem atuar após sofrerem oxidações nos fluidos biológicos, ativando cineticamente a troca de ligantes e atuando em diferentes rotas citotóxicas. Dois complexos de rutênio foram testados em fases avançadas de testes clínicos, o NAMI-A (*imidazolium trans-[tetrachlorido (1H-imidazole)(s-dimethyl sulfoxide) ruthenate (III)]*) e KP1019 (*indazolium trans-[tetrachloridobis (1H-indazole) ruthenate (III)]*) (LEIJEN et al., 2015).

NAMI-A se mostra, em média, mais de 1000 vezes menos tóxico que o cisplatina contra linhagens de células tumorais (PLUIM et al., 2004) e sem atividade quando testada no NCI-60, painel que reúne 60 tipos de células tumorais, para *screening* inicial (BERGAMO; DYSON; SAVA, 2018). Este composto foi inicialmente testado em animais e mostrou um significativo potencial de inibição de metástases, mas não contra o crescimento do tumor primário e também introduzido em ensaios clínicos, sendo recentemente avaliado em fase-I/II combinado com gencitabina (ALESSIO;

MESSORI, 2019). Este estudo foi realizado de 2008 a 2011 em 32 pacientes com câncer pulmonar avançado de células não pequenas, contudo não conseguiu prosseguir para as demais fases devido à baixa eficácia terapêutica quando comparado ao uso isolado de gentamicina (LEIJEN et al., 2015).

Em contraste, KP1019 apresenta certa citotoxicidade *in vitro* quando testado no painel NCI-60, com valores de IC50 variando de 50 a 180 μ M (HEFFETER, 2004). Em ensaios *in vivo* mostrou-se altamente ativo, com uma redução do volume tumoral maior que 95% em carcinoma colorretal de ratos, para o qual observa-se resistência ao tratamento com compostos de platina (SEELIG; BERGER; KEPPLER, 1992). Recentemente, uma investigação clínica em fase I foi realizada em 46 pacientes e determinou-se a máxima dose tolerada como sendo de 625mg/m², sem toxicidade hematológica ou nefrotoxicidade significativa com os principais efeitos adversos considerados de baixo nível, como náusea, fadiga e vômito. De forma geral, o complexo se mostrou moderadamente ativo contra o tumor primário, com 26% de controle do desenvolvimento da doença e uma resposta parcial de diminuição de câncer colorretal (BURRIS et al., 2017).

Os mecanismos de ação do NAMI-A e KP1019 ainda permanecem inconclusivos e carecem de estudos com aprofundamento nas vias metabólicas, fato não extraordinário, visto que mesmo para as drogas de platina não há um consenso geral no mecanismo de ação molecular. Postula-se o “Paradigma do DNA” como a teoria que o modo de ação da cisplatina é ligação direta com o DNA, decorrente das ligações da platina com a guanina na dupla fita, mas achados recentes mostram que existem questões abertas acerca disto (BERGAMO; DYSON; SAVA, 2018; KENNY; MARMION, 2019).

1.1.1 Complexos de cobre

Além desses fármacos alternativos à platina como metal central, os complexos de cobre são também considerados promissores no combate ao câncer.

As propriedades antitumorais dos complexos de cobre são ainda recentes na literatura, envolvem também o dano ao DNA, bem como à proteínas citoplasmáticas, induzindo alta toxicidade que é letal para as células cancerígenas (DENOYER et al., 2015). Nos últimos anos foi mostrado sua eficácia antitumoral em modelos animais e dois complexos foram examinados em ensaios clínicos. O primeiro é o elesclomol (Cu(II)), estrutura química representada na Figura 2 que não apresentou resultados favoráveis no

tratamento a leucemia mieloide aguda (O'DAY, Steven J et al., 2013). O segundo é a casiopeína IIIa, cuja estrutura química é representada na Figura 3, que entrou recentemente na fase I de ensaios clínicos contra o mesmo tipo de câncer e diferente do primeiro, seus resultados foram satisfatórios, contribuindo para a melhoria do bem-estar relatado dos pacientes e tendo como provável mecanismo de ação a indução da fragmentação do DNA por aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), contudo, ainda são necessários estudos que confirmem o mecanismo de ação (TABTI et al., 2017).

O elesclomol é um fármaco conhecido por sua ação anticâncer via elevação de ERO levando a subsequente apoptose celular (KIRSHNER et al., 2008). Ele foi avaliado em ensaios clínicos que evidenciaram sua atividade terapêutica por meio do prolongamento do tempo de sobrevivência dos pacientes, principalmente naqueles que demonstraram menores níveis basais de lactato desidrogenase (LDH) (O'DAY, Steven et al., 2009), uma vez que é sabido que a enzima LDH é responsável pela conversão de piruvato em lactato (M. et al., 1973) e que este processo está aumentado em tumores dependentes de glicólise, ao invés de respiração mitocondrial por meio da cadeia transportadora de elétrons para produção de energia, tumores com alta respiração mitocondrial respondem melhor ao tratamento com elesclomol (BLACKMAN et al., 2012).

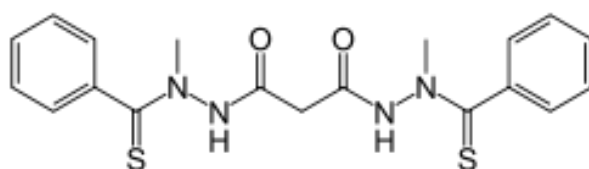


Figura 2. Estrutura química do Elesclomol

Seu mecanismo de ação é dependente de cobre, sendo que a geração de ERO se dá pela quelação e ciclo redox do cobre na mitocôndria. Elesclomol promove quelação de cobre extracelular, tornando-se elesclomol-Cu(II) o que facilita sua captação para a célula. Uma vez no meio intracelular é rapidamente transportado para essa organela gerando elevação de ERO mitocondrial pela redução do Cobre ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$), depois dissocia-se do metal e é transportado para o meio extracelular iniciando o transporte de cobre novamente, processo necessário para sua atividade anticâncer (NAGAI et al., 2012).

Já as Casiopeínas são uma família com mais de 100 complexos de cobre que foram avaliadas em várias linhagens de celulares tumorais, como de mama, cérvix-uterino, colorretal (BRAVO-GÓMEZ et al., 2009) e neuroblastoma (GUTIÉRREZ et al., 2013). Dentre esta família, a Casiopeína III-ia merece destaque por seus bons resultados em ensaios clínicos, como já mencionados anteriormente (TABTI et al., 2017), em que também é atribuído seu uso neste estudo devido sua citotoxicidade ser significativamente menor comparada com o subgrupo das fenantrolinas. Outro estudo demonstrou a associação deste complexo com cisplatina no tratamento de células de câncer cervical, HeLa, em que observou-se aumento da atividade antiproliferativa de 50 para 77% quando as células foram expostas a 4,59 μ M e 9,70 μ M, de Casiopeína III-ia e cisplatina, respectivamente (DAVILA-MANZANILLA et al., 2017).

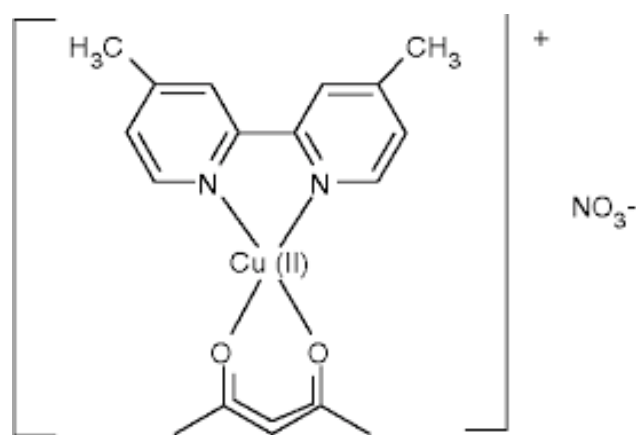


Figura 3. Estrutura química da Casiopeína III-ia

Além destes complexos de cobre, outros surgiram ao longo das pesquisas e têm demonstrando resultados favoráveis para o combate ao câncer. Como exemplo, Cu(gtsc) e Cu(gtscHCl), em que 'gtsc' representa o grupo glioxal-bis(4-metil-4-fenil-3-tiosemicarbazona) e 'gtscHCl' representa o mesmo grupo com a interação do ácido clorídrico (HCl), foram capazes de inibir a síntese de DNA e induzir morte celular apoptótica em várias linhagens celulares humanas, destacando-se em retardar o crescimento tumoral do carcinoma colorretal em modelo xenográfico (PALANIMUTHU et al., 2013). CuSn₂(Trp), em que 'Trp' representa um derivado do triptofano, um complexo heterometálico (com cobre e estanho), mostra-se como uma grande alternativa para o cisplatina, uma vez demonstrada a sua ação em induzir morte celular por apoptose em várias linhagens celulares tumorais. Em modelo animal, a sua dose máxima tolerada foi oito vezes maior que a do cisplatina, exibindo menores efeitos colaterais, sem sinais de lesões aos rins, fígado ou cérebro (ZAIDI et al., 2014).

Neste trabalho está apresentado a avaliação da atividade dos complexos $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$ (estruturas químicas representadas na Figura 4) em células tumorais de mama tri. O primeiro é composto por duas 1,10-fenantrolinas e uma sulfadimetoxina, que pertencem aos grupos das fenantronilas e sulfonamidas, respectivamente; enquanto o segundo complexo tem em sua esfera de coordenação um ligante de derivado imidazólico (2-(imidazol-2-yl)piridina). Os efeitos biológicos destes ligantes são relatados na literatura em diferentes abordagens, quando 1,10-fenantrolina e sulfadimetoxina coordenados ao cobre mostram atividade antimicótica (NAKAHATA et al., 2018) e antimicrobiana (NAKAHATA et al., 2017) além de antineoplásica (FAN et al., 2017). Já o os derivados imidazólicos, além destas atividades, também mostram-se antibacterianos, quando coordenados ao cobre (LEWIS et al., 2016).

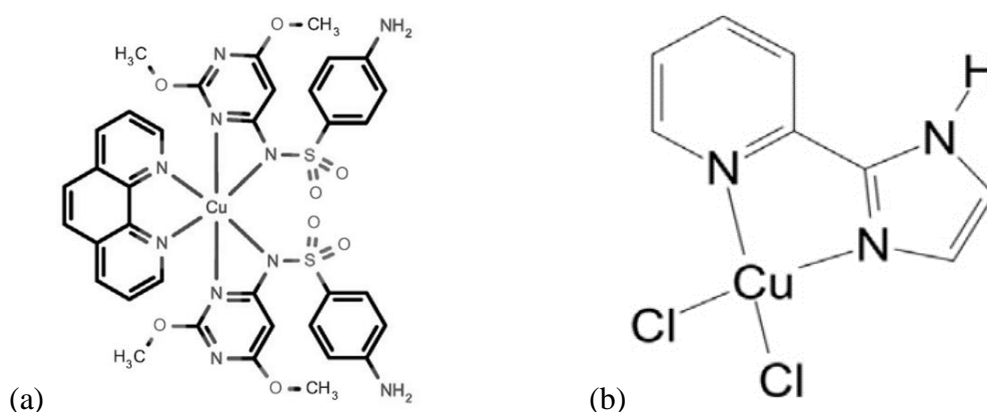


Figura 4. (a) Estrutura molecular do complexo $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\cdot\text{H}_2\text{O}$. (b) Estrutura molecular do complexo $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$.

Diversos estudos tem evidenciado a importância da pesquisa com complexos de coordenação ao cobre como terapia anticâncer, visando a melhoria do entendimento das características biológicas deste metal e seu papel na gênese da doença. Não obstante, os receptores e transportadores de metais, em destaque os relacionados ao metabolismo do cobre, vêm se tornando alvo de intensas pesquisas, uma vez que vários estudos relatam a importância desses na efetividade do tratamento antitumoral (BARTNICKA; BLOWER, 2018; DENOYER et al., 2015; GUERREIRO et al., 2018; NEHYBOVÁ et al., 2017).

1.2 TRANSPORTADORES DE METAIS

As concentrações de metais no corpo são estritamente mantidas por mecanismos homeostáticos que regulam sua absorção, excreção e biodisponibilidade. No que diz respeito ao cobre, apenas uma pequena quantidade é excretada na urina e fezes. No corpo, a maioria do cobre biodisponível está ligado à proteínas e o considerado livre ou não

ligado à proteínas é estimado em menos que 1 átomo por célula (CATALANI et al., 2018).

A atividade redox que permite o cobre contribuir com funcionalidades para as proteínas também pode gerar riscos de toxicidade. Para minimizar os efeitos tóxicos do cobre não conjugado e regular sua distribuição por tempo e no espaço intra e extracelular, os organismos elaboraram sistemas proteicos para sua absorção, transporte celular, carregamento de proteínas e armazenamento (CATALANI et al., 2018). Durante o processo de absorção de cobre, este é primeiramente reduzido e então direcionado ao interior celular por meio do transportador de cobre 1 (CTR1, *Copper Transporter 1*) seguido pelo transporte ou armazenamento em outras estruturas, como proteínas, enzimas e vesículas (POPE et al., 2012b).

O CTR1 é responsável por cerca de 70% do influxo total de cobre à célula, enquanto o restante é mediado via mecanismos de transporte de baixa afinidade (ZIMNICKA; IVY; KAPLAN, 2011). Este transportador é um homotrímero formado por uma região N-terminal relativamente longo e exposto na região extracelular, três segmentos transmembrana e uma região C-terminal muito curta na região intracelular (KAPLAN; LUTSENKO, 2009). A captação de cobre por CTR1 é estritamente controlada, a regulação é mediada por mudanças dependentes de cobre que refletem na quantidade do transportador na membrana plasmática. A diminuição do cobre aumenta a quantidade de CTR1 expresso, enquanto que os níveis elevados do metal induzem a uma rápida endocitose do transportador para vesículas (POPE et al., 2012a).

O cobre é captado por meio do CTR1 quando há interação entre o metal e a porção extramembranar do transportador onde ocorre uma mudança do estado redox ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$) e consecutiva entrada do cobre na célula (ÖHRVIK; THIELE, 2014). A seletividade do CTR1 é compartilhada com menor afinidade para a platina e prata, em que para o primeiro se mostra de grande importância na aquisição do cisplatina e eficácia terapêutica (KILARI, 2016) enquanto que os íons de prata causam a inibição da captação do cobre ao passo que é transportado por meio dele (BERTINATO et al., 2010). Estudos também sugerem que para a entrada de cisplatina na célula, ela é ativada por meio de interações com a porção extramembranar do transportador, resultando na formação de uma estrutura intermediária que é menor que o raio da abertura do poro extracelular do CTR1 (SZE et al., 2009).

O CTR1 também está relacionado com a resistência ao cisplatina e seus derivados. Em estudo conduzido em células com mutação do CTR1 mostrou que a diminuição nos níveis deste transportador diminuiu profundamente a resistência ao cisplatina comparado a células com outras mutações, bem como que a quantidade de cisplatina também regula negativamente a expressão de CTR1, como ocorre na presença de altos níveis de cobre (ISHIDA, S. et al., 2013). Já em um estudo *in vivo* foi observado que o *knockout* de CTR1 em fibroblastos parentais, que foram injetados em quatro locais subcutâneos em camundongos *nude*, eliminou completamente a responsividade dos agentes de platina (LARSON et al., 2009). Em estudo clínico com 15 pacientes em estágio III/IV de tumor ovariano que sofreram cirurgia citorrredutiva e subsequente terapia com cisplatina, observou-se que em pacientes com progressão livre da doença por seis meses apresentaram níveis maiores de CTR1 que em paciente com resistência ao tratamento (ISHIDA, Seiko et al., 2010).

Outras estruturas têm funcionamento apenas no meio intracelular, como o ATP7A e ATP7B, que são membros da família de transportadores ATPases tipo P1 e usam energia da hidrólise do ATP para transferir cobre do citosol para o lúmen da via secretória por meio da membrana celular (LINZ; LUTSENKO, 2007). A reação envolve a transferência de γ -fosfato para o resíduo catalítico Asp, a formação transiente do intermediário fosforilado, e subsequente hidrólise deste por água. A caracterização tempo-dependente para estas etapas releva a formação do intermediário fosforilado, sendo a etapa de desfosforilação mais rápida no ATP7A comparado ao ATP7B. Estes resultados sugerem que ATP7A poderia ter um ritmo de *turnover* e assim transportar mais cobre por minuto comparado ao ATP7B (GUPTA; LUTSENKO, 2012).

O tráfico de ATP7A e ATP7B para diferentes membranas sugere que em células co-expressando ambos Cu-ATPases, o papel destas proteínas seja de exportar cobre através das membranas basolateral e apical, respectivamente. *In vitro*, os defeitos na função do ATP7A podem ser compensados pelo ATP7B, por outro lado, a perda da funcionalidade do ATP7A não é compensada pelo ATP7B (HATORI; LUTSENKO, 2016). Nas células intestinais, a presença de ATP7B não previne o acúmulo de cobre devido a inativação de ATP7A. Em parte, isso poderia ser proveniente da eficiência mais baixa do ATP7B como um transportador, ou poderia ocorrer pelo fato de que nas células intestinais o ATP7B não migra em direção a membrana plasmática e está largamente envolvido no sequestro de vesículas (PIERSON et al., 2018).

O mecanismo pelo qual o cobre é captado pelas células mamárias não está completamente elucidado. No atual cenário, sabe-se que as proteínas plasmáticas transportam Cu^{+2} para estruturas localizadas na membrana plasmática, que sofre redução prévia à captação das células. Potenciais redutases de cobre envolvidas neste processo são as metaloredutases da família STEAP (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate*) (KNUTSON, 2007). A família de proteínas STEAP inclui 4 membros, nomeados de STEAP1-4. O primeiro papel atribuído a esta família de proteínas foi sua contribuição a homeostase do metal para a redução do ferro e cobre (GRUNEWALD et al., 2012).

STEAP1 desempenha um importante papel na comunicação intercelular. Ao bloquear STEAP1 com anticorpos monoclonais específicos nas células LNCaP observou-se o aumento da morte celular, sugerindo que STEAP1 pode promover a proliferação das células cancerígenas ou retardar apoptose. De outra forma, STEAP1 mostra-se facilitadora do crescimento celular por aumentar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO), mostrando que STEAP1 age em ambas vias inter e intracelular (KIM, Kwangsoo et al., 2016). 17β -estradiol mostra-se ser o único regulador conhecido da expressão de STEAP1. Este hormônio regula a expressão ambos *in vivo* em glândula mamária de ratos e *in vitro* nas células de câncer de mama (GOMES; MAIA; SANTOS, 2012).

STEAP3 é caracterizado como uma ferroredutase que reduz o íon férrico (Fe^{+3}) para íon ferroso (Fe^{+2}) em endossomos (ZHANG et al., 2012). Este foi inicialmente descrito como um gene supressor tumoral capaz de induzir a morte de células tumorais por meio de uma via dependente de caspase-3 (PASSER et al., 2003). Além disso, STEAP3 é relatado como facilitador da secreção de exossomos, manutenção no estado imune e principalmente homeostase de ferro (GRANDCHAMP et al., 2011), sendo que essas funções tem correta atividade desde que a captação de cobre e seu transporte esteja intacto. Porém, ainda não é bem descrito a relação entre a aquisição de ferro e os níveis de cobre na manutenção do funcionamento do STEAP3 (ELLIOTT; HEAD, 2012).

STEAP4 é primariamente localizado no *trans-golgi network*, também na membrana plasmática e em estruturas vesículo-tubulares no citosol e lisossomos (GRUNEWALD et al., 2012). Esta proteína é regulada por fatores hormonais, nutricionais, presença de citocinas como TNF- α , dentre outros, e está envolvida na captação de ferro e cobre (SCARL et al., 2017). Foi demonstrado que STEAP4 é

superexpresso em diferentes tipos de câncer, principalmente em células prostáticas, como LNCaP, e em câncer de mama com expressão de receptores hormonais, como MCF-7. Seu funcionamento é hormônio-dependente e relacionado ao crescimento tumoral, porém o mecanismo intrínseco de ação ainda precisa ser elucidado (GOMES; MAIA; SANTOS, 2012).

Neste sentido, os transportadores de metais constituem alvos de pesquisas que visem modular os efeitos de complexos inorgânicos, aumentando sua eficácia e redução de efeitos secundários, pelo conhecimento de seus mecanismos de transporte e ação. Assim, neste trabalho foi realizado a avaliação de complexos metálicos de cobre, $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})].\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$, em ensaios *in vitro*, com o uso de células tumorais e não-tumorais de mama, e análise do impacto que a superexpressão de CTR1, por meio de transfecção celular, pode causar na citotoxicidade destes complexos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se os complexos metálicos de cobre, $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$, mostram eficácia contra células tumorais de mama triplo negativa em modelos *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar valor de IC_{50} referente à toxicidade dos complexos de cobre em células tumorais e não tumorais de mama e selecionar o composto mais eficaz para ser testado nos modelos que se sucedem;

Avaliar a capacidade dos complexos em modificar a morfologia das células tumorais (MDA-MB-231) e não tumorais de mama (MCF-10A) e sobre a arquitetura do citoesqueleto celular;

Analisar o efeito dos complexos de cobre sobre a formação de colônias e ciclo celular na linhagem tumoral de mama triplo negativa MDA-MB-231;

Examinar a influência das diferenças estruturais dos complexos de cobre na toxicidade celular por meio da comparação da viabilidade de células parentais e transfectadas, via transfecção celular transiente, para superexpressão do transportador de cobre CTR1.

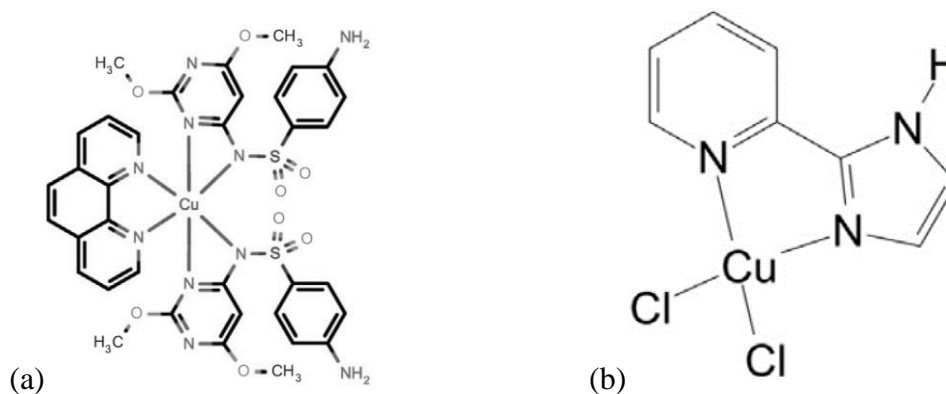
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMPLEXOS DE COBRE

Os complexos de cobre, precursores e ligantes foram sintetizados e disponibilizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (UNICAMP), sendo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ utilizados para sais de partida para síntese dos complexos $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$, respectivamente; sulfadimetoxina (-sdmx), pertencente ao grupo das sulfonamidas, 1,10-fenantrolina (-phen), pertencente ao grupo das fenantrolinas e o 2-(imidazol-2-yl)piridina (-impy), pertencente ao grupo dos imidazóis, estes três tem largo espectro de ação já bem relatados na literatura (GUTIÉRREZ et al., 2013; KHOWDIARY; MOSTAFA, 2016; SARKARZADEH et al., 2013) e Cu-phen que é o precursor do complexo $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Ambos os complexos têm suas rotas sintéticas e avaliações de atividade biológica descritas na literatura (NAKAHATA et al., 2017, 2018) e suas estruturas são demonstradas na Figura 5. Todos os compostos utilizados foram dissolvidos em dimetilsofoxido 1% (DMSO).

Figura 5. (a) Estrutura molecular do complexo $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})] \cdot \text{H}_2\text{O}$. (b) Estrutura molecular do complexo $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$.



3.2 CULTURA CELULAR

As células mamárias não-tumorais da linhagem MCF-10A foram cultivadas em meio *Mammary Epithelial Cell Growth Medium* (MEGM, Lonza, #CC-3150) suplementado com hEGF, insulina, hidrocortisona e *bovine pituitary extract* (BPE) nas proporções recomendadas pelo fabricante (Lonza, #CC-4136), além de 5% de soro de cavalo (Sigma-Aldrich, H1270) e 10ng/mL de toxina colérica (Sigma, #C8052). As

células MDA-MB-231, SKBR3 e 4T1 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-*Fetal Bovine Serum*) e antibióticos apropriados. Células de câncer de mama da linhagem MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de insulina (Thermo Scientific, 12584-014). Todas as células foram mantidas a 37°C em um incubador com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂, suas características são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características das células não-tumorais e tumorais utilizadas no estudo

Célula	Origem	Fenótipo
MCF-10A	Doença fibrocística do tecido mamário humano	Célula não tumoral
MDA-MB-231	Células de efusão pleural de sítio metastático de câncer mamário humano	Célula tumoral com ausência de receptores hormonais de estrogênio, progesterona e HER-2
MCF-7	Células de efusão pleural de sítio metastático de câncer mamário	Célula tumoral com superexpressão de receptores de estrogênio
SK-BR3	Células de efusão pleural de sítio metastático de câncer mamário	Célula tumoral com superexpressão de HER-2
L929	Tecido conectivo subcutâneo de camundongo	Fibroblasto
4T1	Tecido mamário de camundongo balb/c	Célula tumoral com ausência de receptores hormonais de estrogênio, progesterona e HER-2

3.3 CITOTOXICIDADE

Os efeitos dos complexos de cobre [Cu(sdmx⁻)₂(phen)].H₂O e [CuCl₂(-imp)] na toxicidade das células supracitadas foram determinados por meio do ensaio empregado

por Mosmann (MOSMANN, 1983) ou por avaliação colorimétrica pelo *Cell Counting Kit-8* (CCK-8, Sigma-ALdrich, #96992). As células (1×10^4 células/100 μ l) foram plaqueadas em placas de 96 poços, levadas ao incubador úmido (37°C e 5% de CO₂) e cultivadas por 24h para aderirem e atingirem morfologia característica. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (0,78 μ M a 100 μ M) dissolvidos em DMSO, por 24h e 48h. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi removido e 100 μ L/poço da solução de MTT (0,5mg/mL) foram adicionados e as placas incubadas por 4h a 37°C, em seguida foram adicionados 100 μ L de DMSO e as placas incubadas em estufa para dissolver os cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de placa de ELISA (LabTech LT4000) no comprimento de onda de 540nm. Para o segundo delineamento metodológico, 10 μ l de CCK-8 foram adicionados por poço e incubados por 2h. A absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 450nm pelo leitor de microplacas *GloMax® Discover* (Promega). Cada experimento foi repetido três vezes de forma independente.

3.4 MORFOLOGIA CELULAR

As células MDA-MB-231 e MCF-10A (1×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 12 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa humificada. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por meio contendo diferentes concentrações do composto dissolvido, baseados nos valores de IC₅₀. As células foram incubadas por 48h e fotos capturadas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48h por meio de uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3MP *Live Resolution*) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) em quatro campos diferentes por poço no aumento de 40 \times . Com este experimento objetivou-se analisar a capacidade do complexo em alterar a morfologia das células mencionadas.

3.5 FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Células tumorais da linhagem MDA-MB-231 (3×10^2 /placa) foram inseridas em placas de 6cm e levadas ao incubador úmido por 24h. Após, foram adicionadas diferentes concentrações do complexo de cobre [Cu(sdmx-)₂(phen)].H₂O e as células foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente por um período de 2 horas. Em seguida, o meio foi removido, as células lavadas delicadamente com tampão fosfato salina (PBS) e posteriormente foi adicionado DMEM 10% de FBS. As células foram novamente incubadas na mesma condição por 10 dias. Após a incubação, o sobrenadante foi

descartado e as células fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) durante cinco minutos. Em seguida as colônias foram coradas com solução de metanol e cristal violeta a 5% por 30 minutos. O número de colônias e seu tamanho foram medidos com auxílio do *software Image J*, assim, sendo analisada a capacidade citotóxica e citostática, respectivamente, do complexo citado.

3.6 WOUND HEALING

O ensaio de *wound healing* tem o intuito de investigar as características da migração celular e moléculas que possam interferir no processo migratório. Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5 /poço) foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida (5% de CO₂ a 37°C) até atingir confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, removeu-se as células no centro de cada poço no sentido longitudinal por meio de uma risca produzida por uma extremidade pontiaguda. Cuidadosamente, cada poço foi lavado com PBS para remover fragmentos celulares e células desaderidas durante esse processo. A seguir, o meio de cultura de cada poço foi substituído por um novo contendo diferentes concentrações do complexo de cobre [Cu(sdmx⁻)₂(phen)]H₂O, exceto os controles que receberam somente meio com veículo DMSO. As imagens foram capturadas em diferentes intervalos de tempo com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100), com aumento de 10× acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 Megapixels *Live Resolution*) em dois campos diferentes por poço. A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software ImageJ* e a porcentagem de fechamento foi calculada utilizando a equação que se segue (DEJANA; CORADA; LAMPUGNANI, 2003), na qual $A_{t=0h}$ é a medida da área da risca imediatamente após sua realização e $A_{t=\Delta h}$ é a medida da área da risca após o período de incubação com o complexo de cobre.

Equação 1. Cálculo da porcentagem de fechamento utilizada no ensaio de *Wound Healing*.

$$\% \text{ de fechamento} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{A_{t=0h}} \times 100$$

3.7 IMUNOCOLORAÇÃO

Foram plaqueadas 5×10^4 células/100µL, da linhagem MDA-MB-231, em placa de 96 poços e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas. Após, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo de cobre e incubadas por 5h (tempo definido

com base nos achados do ensaio de morfologia). Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 3,7% de paraformaldeído em PBS durante 30 minutos e permeabilizadas com 0,1% de TritonX-100 em PBS durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa, os poços foram novamente lavados com PBS, seguido da adição de 2% de BSA durante 30 minutos. O marcador *Alexa 488 Fluor® Phalloidin*, que interage com filamentos de actina, foi incubado por 20 minutos, seguido da incubação por 5 minutos com uma solução de DAPI (30nM), que interage com DNA, para marcação de citoesqueleto e núcleo, respectivamente. Após uma última lavagem com PBS as imagens foram capturadas em microscópio automatizado *ImageXpress® Micro System XLS (Molecular Devices)* com aumento de 100×. Assim, objetivou-se analisar a capacidade do complexo em promover desarranjos nas estruturas proteicas do citoesqueleto e do núcleo celular.

3.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Células MDA-MB-231 (1×10^5 /poço) foram semeadas em uma placa de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações do complexo de cobre $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\text{H}_2\text{O}$, por 5h. Depois do tratamento, foi adicionado H_2DCFDA [*2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*] (Sigma-Aldrich, D6883) na concentração de $10 \mu\text{M}$ por 30min antes de serem coletadas para análise. A fluorescência foi mensurada usando *Synergy HI Hybrid Multi-Mode Microplate-Fluorimeter* nos comprimentos de onda de excitação $\lambda=400\text{nm}$ e de emissão $\lambda=525\text{nm}$. Análise das ERO foram realizadas em comparação com o grupo controle negativo (sem tratamento) e grupo controle positivo, que recebeu $200 \mu\text{M}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Sigma-Aldrich, H1009) para produção intracelular de ERO.

3.9 CICLO CELULAR

As células MDA-MD-231 (4×10^5 /poço) foram semeadas em placas de 12 poços e após 24h de incubação a 37°C foram tratadas com concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\text{H}_2\text{O}$ durante 5h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol (70%) durante 24h a -20°C . Após a fixação, as células foram centrifugadas e incubadas com RNase ($0,2 \text{ mg/mL}$) e PI (*propidium iodide*) ($20 \mu\text{g/mL}$) em PBS durante 30 minutos a 37°C . Os conteúdos de DNA foram analisados pelo citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 15.000 eventos para cada condição e foram quantificados no *software FlowJo* (BD Biosciences). Camptotecina

foi utilizada como controle positivo da parada do ciclo celular.

3.10 RT-qPCR

As células MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR3, MCF-10A foram semeadas em placas de 10mm por 24h ou até alcançarem a confluência aproximada de 1×10^6 células em seu meio de cultura específico. Então foram desaderidas usando solução de Tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma-Aldrich, #T4049), centrifugadas e lisadas seguindo as instruções do kit para extração de RNA (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen, #74106). A concentração e o grau de pureza foram mensurados pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). O total de RNA (1µg de RNA por amostra) foi reversamente transcrito usando o *amfiRivert cDNA synthesis master mix* (GenDEPOT, #R5600).

Uma reação de RT-qPCR (*Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*) foi realizada adicionando em cada poço de uma placa de 96 poços 1µL de cDNA, 2x SYBR *Green Master Mix* (Applied Biosystems), e 20µM de *forward* e *reverse primers*. A amplificação gênica foi realizada pelo *ViiA 7 System* (Thermo Scientific) e depois desse processo os produtos específicos foram determinados como picos únicos na *melting curve*. Os níveis de expressão comparativos de cada condição foram calculados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ da amostra – ΔC_t do controle. Os valores de C_t foram normalizados pelos níveis de β -actina (ΔC_t do controle ou amostra = C_t do controle ou amostra – C_t da β -actina do controle ou amostra). As sequências dos *primers* são mostradas na tabela 1.

Tabela 2. *Primers* utilizados para RT-qPCR correspondentes as estruturas envolvidas no metabolismo e transporte de cobre

Target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
ATP7A	TGACCCTAAACTACAGACTCCAA	CGCCGTAACAGTCAGAAACAA
ATP7B	GGCCGTCATCACTTATCAGCC	GGGAGCCACTTTGCTCTTGA
SLC31A1 (CTR1)	AAGGACTCAAGATAGCCCGAG	TGGGACAGGCATGGAATTGTA
SLC31A2 (CTR2)	GCAGACCATCGCAGAGACAG	GCCAAAGTGACACAAATACCAC
SLC11A2 (DMT1)	ATCGGCTCAGACATGCAAGAA	TTCCGCAAGCCATATTTGTCC
STEAP1	GGTCGCCATTACCCTCTTGG	GGTATGAGAGACTGTAAACAGCG
STEAP3	CTCCCCGGAGGTCATCTTTG	TCTTGCTCTGTAGGGTTGCTC
STEAP4	CCTCAGCCCTTCAAATCTCAG	ACATGGCATGATTAGGACAAACT
β -ACTIN	AGAAGGATTCTATGTGGGCG	CATGTCGTCCCAGTTGGTGAC

3.11 TRANSFEÇÃO CELULAR

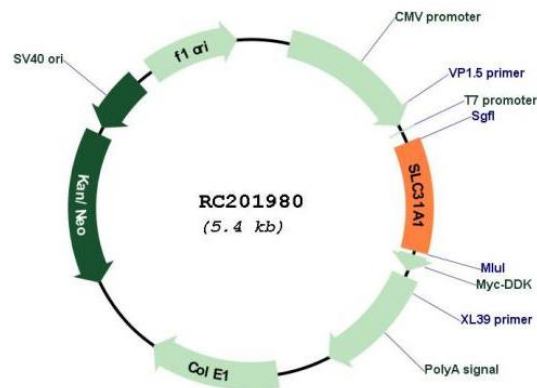
3.11.1 Seleção Celular

Primeiramente, a determinação da concentração letal mínima do antibiótico G418 (Geneticina) foi realizada para determinar a menor concentração do antibiótico capaz de matar a maior quantidade de células não-transfectadas. Para este propósito, as células MDA-MB-231 (5×10^5 /placa) foram semeadas em uma placa de cultura celular de 100mm e permitidas alcançar a confluência de 90%. Em seguida, as células foram desaderidas usando solução de Tripsina-EDTA 25% (Sigma-Aldrich, #T4049), plaqueadas em uma placa de 96 poços (3×10^3 / poço) e permitidas aderir por 24h. No dia seguinte o meio foi substituído por um novo contendo G418 nas concentrações de 50 até 1000 μ g/mL em triplicada. As células foram tratadas por 8 dias, que foi o período para as células alcançarem a máxima confluência ou até que a mais alta concentração do antibiótico matasse uma significativa quantidade de células, a partir disso foi determinado a mínima concentração letal a ser utilizada depois da transfecção celular e assim efetuar a seleção celular.

3.11.2 Transfecção Celular

As células MDA-MB-231 foram semeadas em uma placa de 6 poços com 2mL de meio por poço na densidade de $6,25 \times 10^5$ células/poço e cultivadas até alcançarem a confluência mínima de 80% no momento da transfecção. O vetor pMCV6-SCL31A1 (Figura 6) foi produzido pela empresa Origene (#RC201980), a sequência do plasmídeo pareou exatamente com o gene de interesse selecionado como descrito em NCBI (NM_001859), em análise conduzida no BLAST. Uma quantidade de 2,5 μ g do plasmídeo foi misturada com *Lipofectamina 3000 Transfection Reagent* e *Plus Reagent* (Thermo Scientific, #L3000001) e *Opti-MEM Reduced Serum Medium* (Thermo Scientific, #31985062). A mistura foi deixada por 15 min em temperatura ambiente e então transferida para as células previamente plaqueadas. As células foram submetidas ao processo de transfecção por 14h seguido pela substituição de meio novo com adição do antibiótico G418 (650 μ g/mL). A seleção ocorreu por 4 semanas.

Figura 6. Mapa do vetor pMCV6-SCL31A1 utilizado para a transfecção das células MDA-MB-231 com a região de interesse indicada pelo gene SLC31A1 (CTR1).



3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados três vezes em triplicatas independentes, garantindo assim a confiabilidade dos dados. Os cálculos foram conduzidos por meio dos programas Microsoft Office Excel 2007 e GraphPad Prism® (versão 8.02). Os testes e pós-testes são variáveis e aplicados conforme os dados analisados, por isso estão descritos junto de cada resultado.

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

Visando conhecer a citotoxicidade dos complexos $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$, de seus precursores $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Cu-phen e dos ligantes sulfadimetoxina, 1,10-fenantrolina e 2-(imidazol-2-yl)piridina sobre as células tumorais, MDA-MB-231, SK-BR3, MCF-7, 4t1.13ch5t1 e não tumorais de mama, MCF-10A, além de fibroblastos murinos da linhagem L929, foram utilizados os métodos MTT e CK-8 conforme procedimentos metodológicos descritos. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos e incubadas por 24h e 48h. Além disso os compostos foram numerados da seguinte forma: (1) -sdmx= Sulfadimetoxina; (2) -phen= 1,10-fenantrolina; (3) Cu-phen; (4) $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\text{H}_2\text{O}$; (5) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (6) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; (7) -impy= 2-(imidazol-2-yl)piridina; (8) $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$.

Como observado na Tabela 3, página 31, os complexos apresentaram amplo espectro de ação sobre a viabilidade das linhagens testadas. Os compostos (5) e (6) são definidos como sais de partida e espera-se que os mesmos sejam inertes na citotoxicidade celular, porém observou-se morte nas linhagens SK-BR3 pelo (6) em 48h ($\text{IC}_{50} = 43,9\mu\text{M}$) e L929 pelo (5) em 24h e 48h ($\text{IC}_{50} = 3,87\mu\text{M}$ e $1,89\mu\text{M}$). Os compostos (1), (2) e (7) são os ligantes que foram coordenados ao cobre e, portanto, fazem parte da rota sintética dos compostos (4) e (8). Os ligantes não coordenados apresentaram diferentes níveis de toxicidade, quando complexados ao cobre observou-se aumento da eficácia sobre a toxicidade celular, como observado pelos valores de IC_{50} dos compostos (4) e (8).

De acordo com os resultados, ao analisar a atividade de todos os compostos, o complexo (4) foi o que apresentou maior citotoxicidade para a linhagem tumoral triplo negativa MDA-MB-231, também sendo observado maior seletividade quando comparadas com a linhagem não tumoral MCF-10A, constatando-se pelo índice de seletividade (IS, tabela 3). A partir disso, optou-se pela continuidade aos experimentos na investigação do composto (4) na linhagem mencionada.

Tabela 3. Valores de IC₅₀ (concentração tóxica para 50% das células) dos complexos de cobre, ligantes e sais de partida (24h e 48h de incubação) em células tumorais de mama e não tumorais de mama; valores representados em μM .

Compostos Células	(1)		(2)		(3)		(4)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>MDA-MB-231</i>	>100	>100	2,391	2,236	*	*	6,29	2,78
<i>SK-BR3</i>	>100	>100	>100	9,01	2,5	2,34	4,09	3,96
<i>MCF-7</i>	>100	>100	3,118	4,758	14,9	2,05	30	5
<i>MCF-10A</i>	>100	>100	*	*	*	*	8,95	4,76
<i>4t1.13ch5t1</i>	>100	>100	0,102	0,152	1,09	0,307	1,14	0,79
<i>L929</i>	>100	>100	>100	>100	4,11	2,82	4,06	2,14
	(5)		(6)		(7)		(8)	
<i>MDA-MB-231</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	27,5	32,1
<i>SK-BR3</i>	>100	>100	>100	43,9	>100	44,83	26,7	11,81
<i>MCF-7</i>	>100	>100	*	*	*	*	*	*
<i>MCF-10A</i>	>100	>100	*	*	*	*	*	*
<i>4t1.13ch5t1</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>L929</i>	3,87	1,89	*	*	*	*	*	*

(1) -sdmx= Sulfadimetoxina; (2) -phen= 1,10-fenantrolina; (3) Cu-phen; (4) $[\text{Cu}(\text{sdmx}^-)_2(\text{phen})]\cdot\text{H}_2\text{O}$; (5) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (6) $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; (7) -impy= 2-(imidazol-2-yl)piridina; (8) $[\text{CuCl}_2(-\text{impy})]$.

* valores não determinados

Tabela 4. Índice de Seletividade (IS) do complexo (4) dado pelo IC₅₀ da linhagem não tumoral de mama MCF-10A/IC₅₀ da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231; valores representados em μM .

IC₅₀	24h	48h
MCF-10A	8,95	4,76
MDA-MB-231	6,29	2,78
IS	1,4	1,7

4.2 MORFOLOGIA CELULAR

Para analisar as mudanças morfológicas promovidas pelo complexo (4) na linhagem tumoral MDA-MB-231 e não tumoral MCF-10A, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo e imagens foram capturadas em determinados intervalos de tempo através de uma câmera acoplada ao microscópio invertido.

Os resultados evidenciam alterações morfológicas com o uso da mesma concentração do complexo ($6,25\mu\text{M}$) em ambas linhagens celulares. Porém, enquanto houve imediata alteração morfológica, em concentrações crescentes a partir de $12,5\mu\text{M}$ em menores tempos na linhagem tumoral MDA-MB-231, o mesmo não foi observado para a linha não tumoral MCF-10A, em que a densidade celular se manteve a mesma nas 4h iniciais de tratamento, mas com discreta mudança na morfologia a partir da concentração de $25\mu\text{M}$ (Figura 7 e Figura 8, páginas 40 e 41).

A partir da concentração de $12,5\mu\text{M}$ após 8h de tratamento, todas as células não tumorais evidenciaram severa alteração morfológica com aquisição de formato circular, células desaderidas e por fim, com o surgimento de debris celulares. Contudo, estes achados foram observados desde o tempo inicial de tratamento para as mesmas concentrações na linhagem tumoral, demonstrando uma aparente seletividade citotóxica do complexo (4) para as células tumorais.

Figura 7. Efeito do complexo (4) na morfologia nas células tumorais de mama MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata e cada imagem é correspondente a uma das repetições (aumento de 100×).

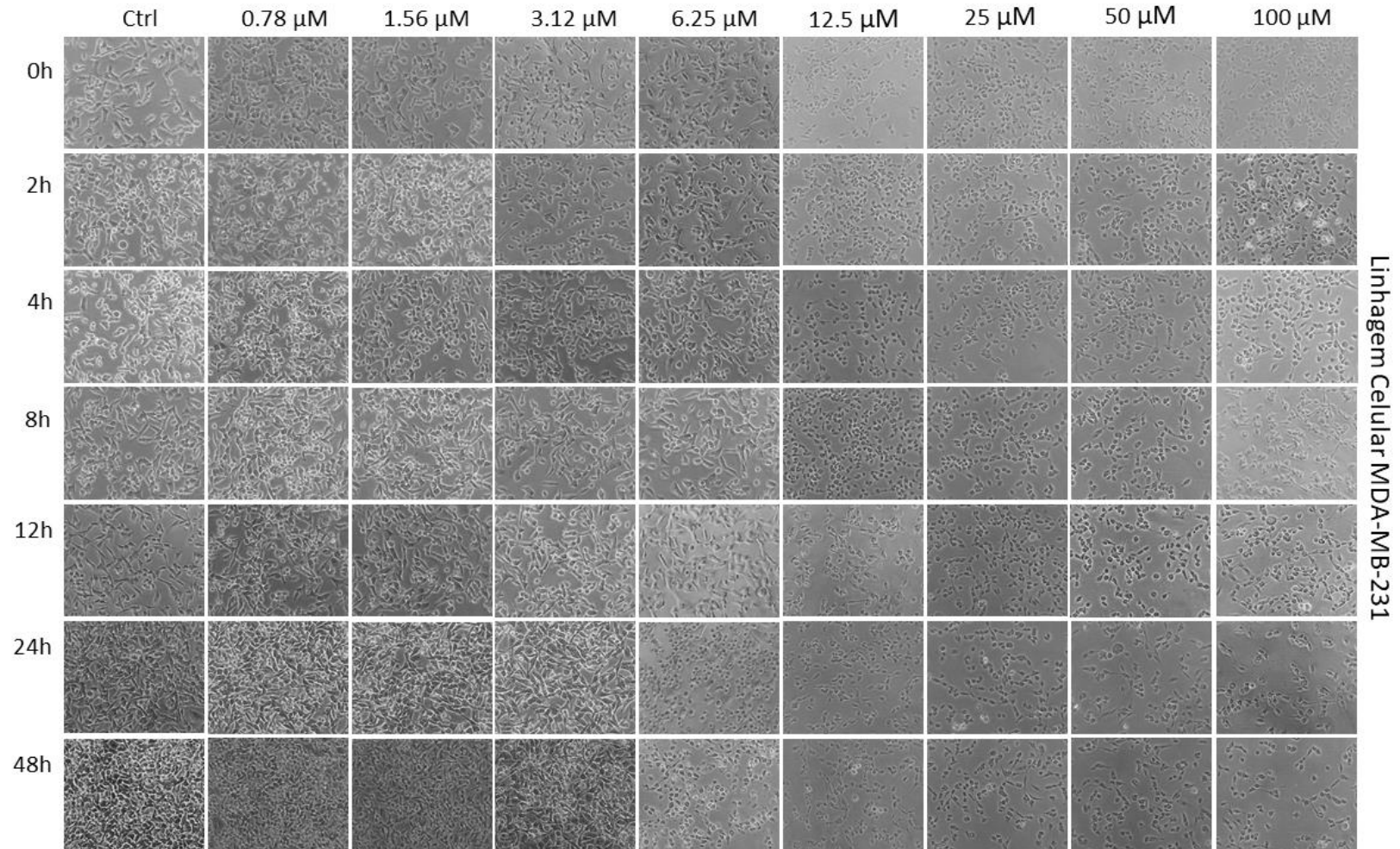
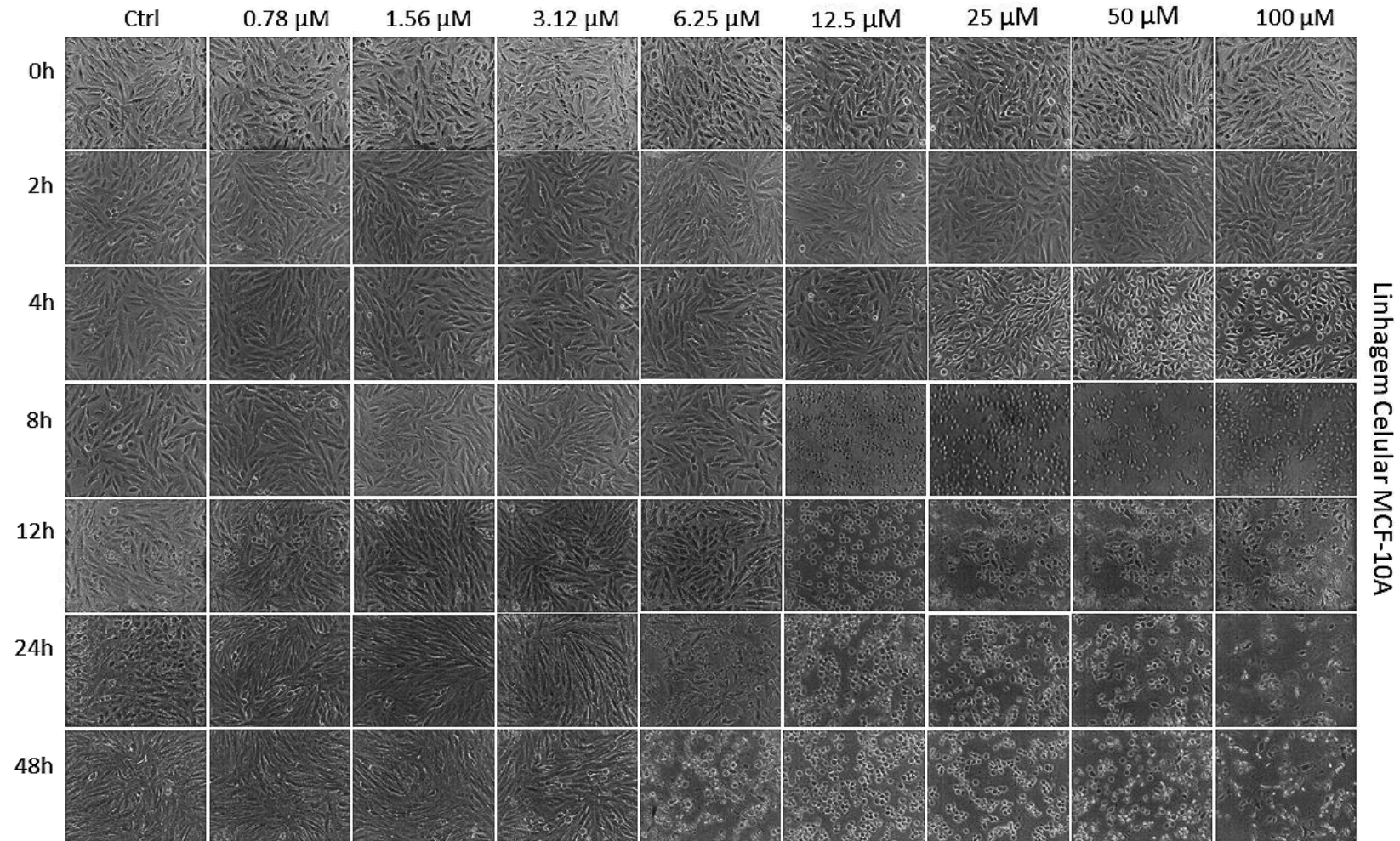


Figura 8. Efeito do complexo (4) na morfologia nas células não tumorais de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata e cada imagem é correspondente a uma das repetições (aumento de 100×).

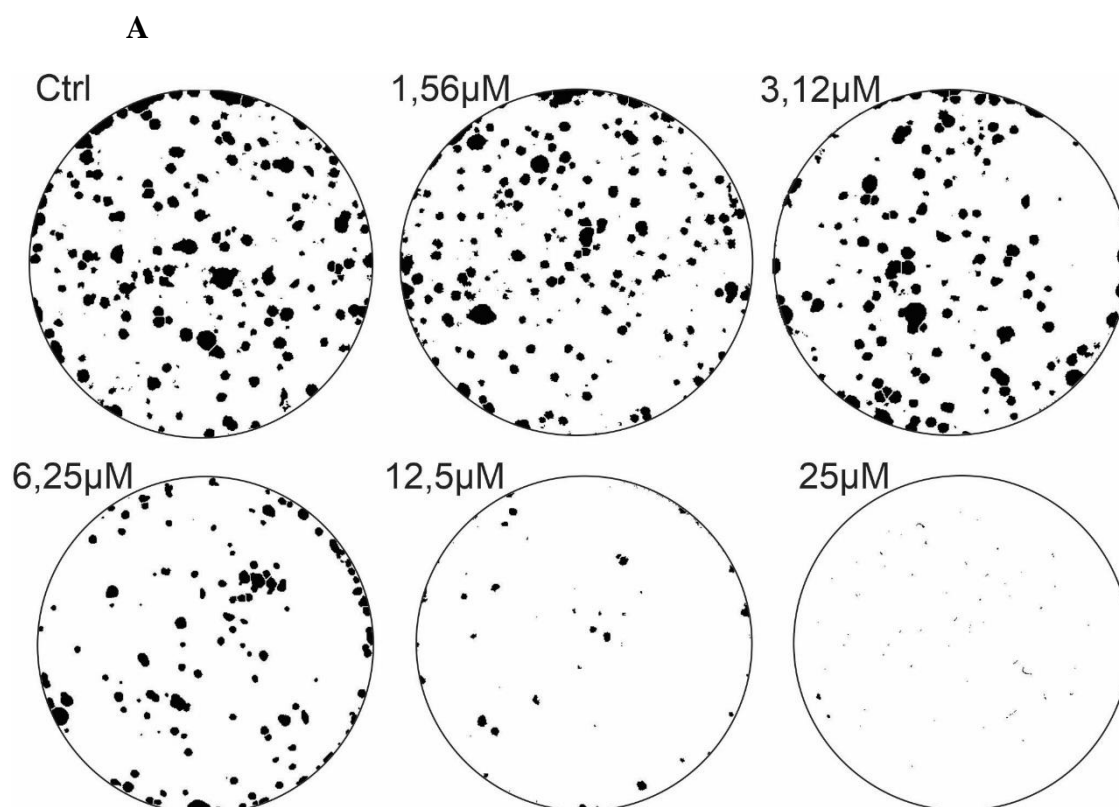


4.3 FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

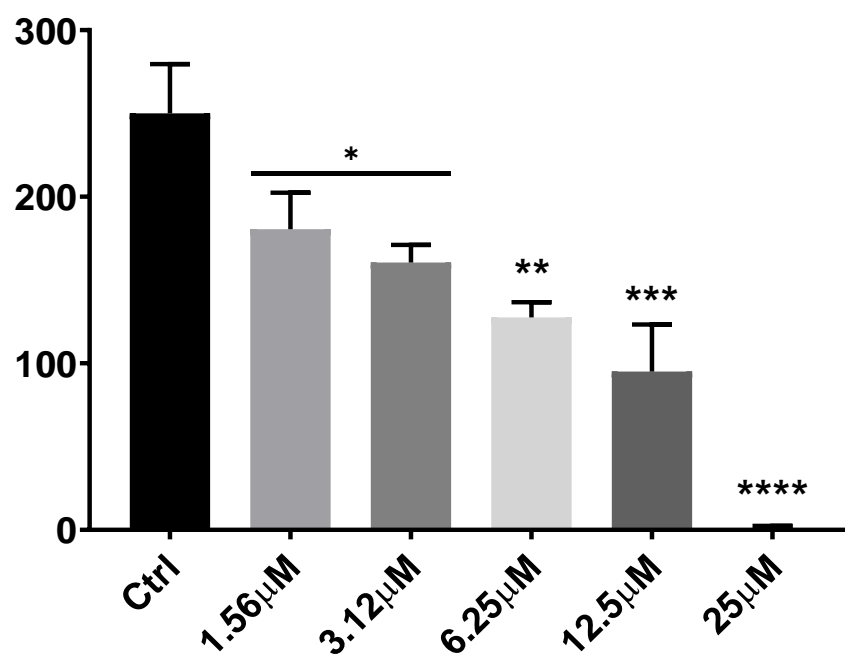
Neste ensaio observa-se a capacidade de um número significativamente reduzido de células tem em crescer e formar colônias, após a exposição a agentes citotóxicos (BRASELMANN et al., 2015).

Os resultados mostram que todas as concentrações do complexo (4) foram efetivas na diminuição do número de colônias das células tumorais MDA-MB-231, frente ao grupo controle, ou seja, que não recebeu o composto (1,56 μ M, 3,12 μ M e 6,25 μ M, $p < .05$; 12,5 μ M e 25 μ M, $p < .001$). Com relação a ação sobre o tamanho das colônias observou-se significativa redução a partir da concentração de 6,25 μ M ($p < .05$), em que as concentrações de 12,5 μ M e 25 μ M inibiram quase completamente o crescimento de colônias ($p < .001$). Assim, constata-se a inibição da formação de colônias e redução de seus tamanhos, mostrando ação citotóxica e citostática pelo composto (4).

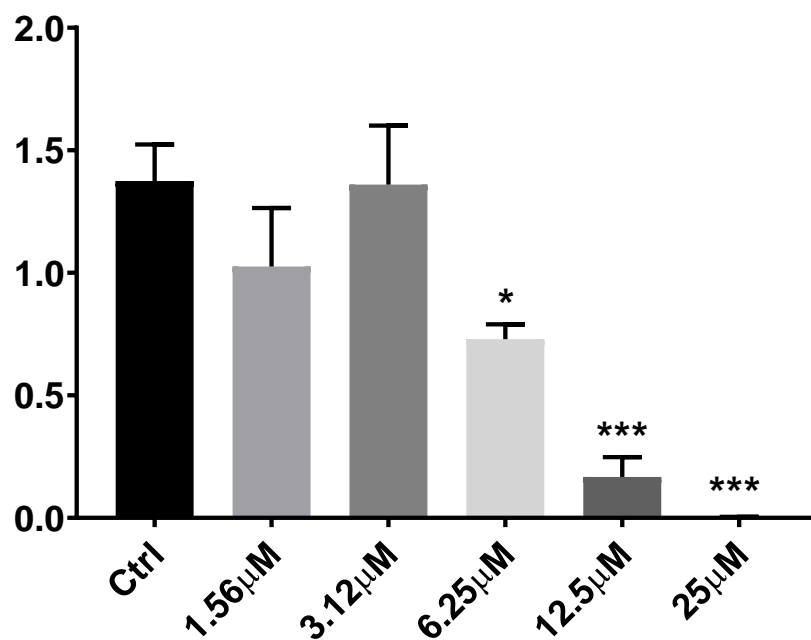
Figura 9. Efeito do complexo (4) sobre a formação de colônias em células tumorais de mama MDA-MB-231. (A) Imagem correspondente a uma das triplicatas de cada concentração. (B) Gráfico do número de colônias. (C) Gráfico do tamanho das colônias. Os resultados foram comparados com os controles sem tratamento. * $p < .05$, ** $p < .005$, *** $p < .001$, **** $p < .0001$ One-way ANOVA, post-hoc de Dunnett.



B

Número de colônias

C

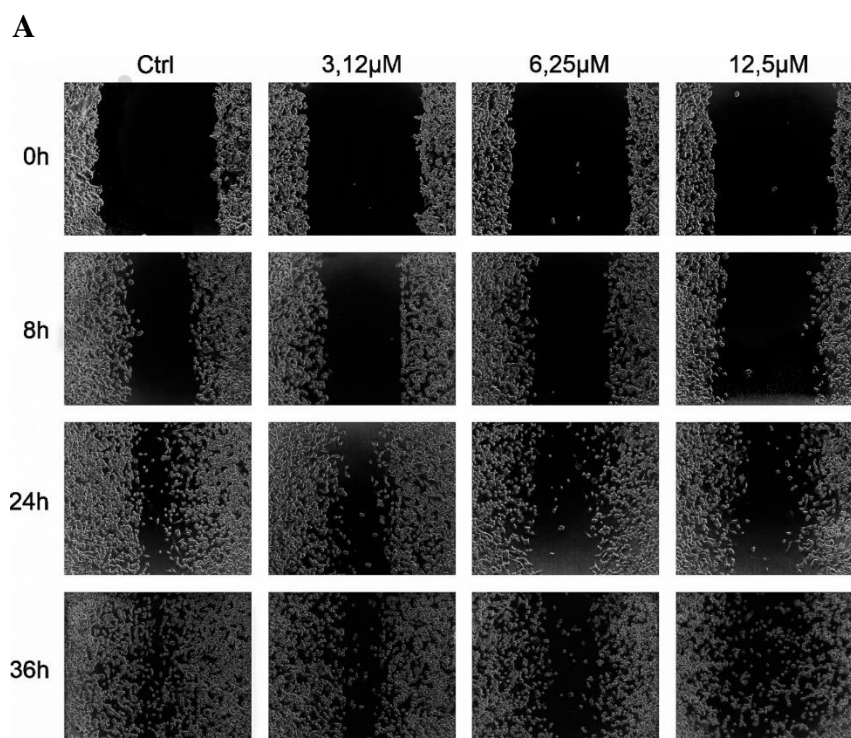
Tamanho das colônias

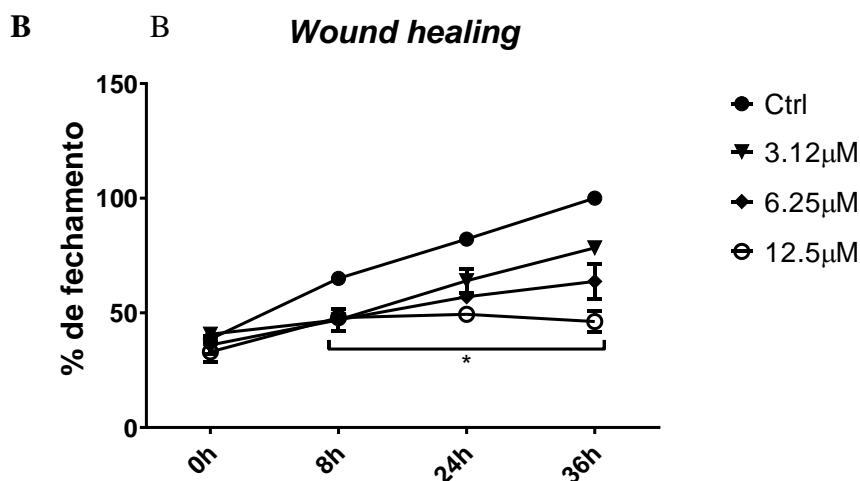
4.4 WOUND HEALING

Por meio deste ensaio, que consiste na remoção de células confluentes, por meio de uma risca longitudinal, cultivadas em placas de 12 poços (DEJANA; CORADA; LAMPUGNANI, 2003), objetivou-se investigar se o composto (4) interfere em uma das etapas do processo metastático, principalmente na migração e invasão celular *in vitro*.

Os resultados apresentados na Figura 10, página 44, mostram que a partir de 8h de tratamento, o complexo (4) inibe a migração celular em todas as concentrações testadas, como demonstrado pela inibição do fechamento da risca. Em 8h de tratamento observa-se uma similar inibição para todas as concentrações testadas. A concentração de 3,12 μ M mantém a taxa de inibição constante, frente ao controle como apresentado na figura 5 (B). Na concentração de 6,25 μ M, observa-se um aumento gradual da inibição conforme aumento do tempo de exposição, como evidenciado em 24h e 36h.

Figura 10. Efeito de diferentes concentrações do composto (4) na migração das células tumorais de mama MDA-MB-231. (A), após a confluência a risca foi realizada no centro do poço e as células foram tratadas com as concentrações indicadas, com as imagens sendo capturadas nos intervalos de 0, 8, 24 e 36h. (B) Quantificação do fechamento da risca dado em porcentagem. * $p < .0001$, Two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni.

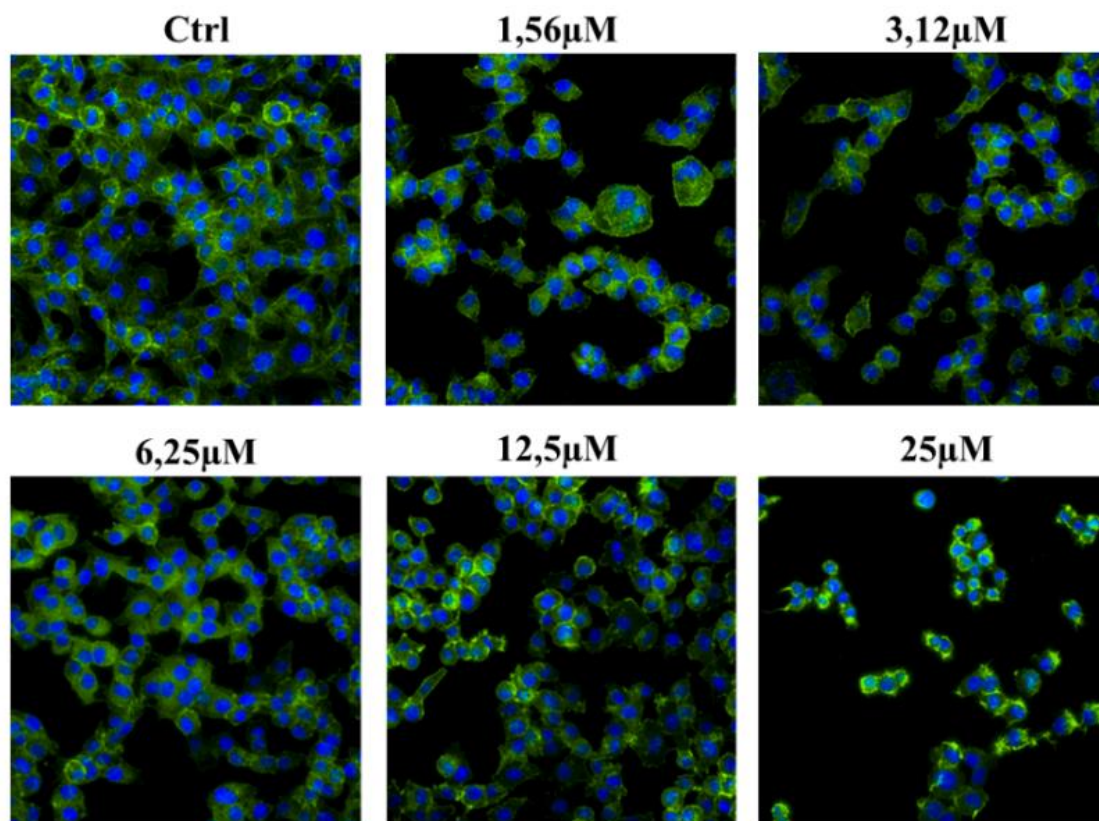




4.5 IMUNOCOLORAÇÃO

Os resultados indicam que o composto (4) foi capaz de alterar bruscamente a estruturação do citoesqueleto das células tumorais de mama, MDA-MB-231, logo na menor concentração ($1,56\mu\text{M}$) após 5h de tratamento, evidenciado com a diminuição marcante da densidade das fibras de actina. As modificações nucleares foram vistas na concentração de $3,12\mu\text{M}$ e de forma mais pronunciada em $12,5$ e $25\mu\text{M}$. Assim, infere-se que em baixas concentrações o complexo (4) é capaz de promover significativas mudanças na organização do citoesqueleto e arranjo nuclear, quando comparados ao grupo controle Figura 11, página 46.

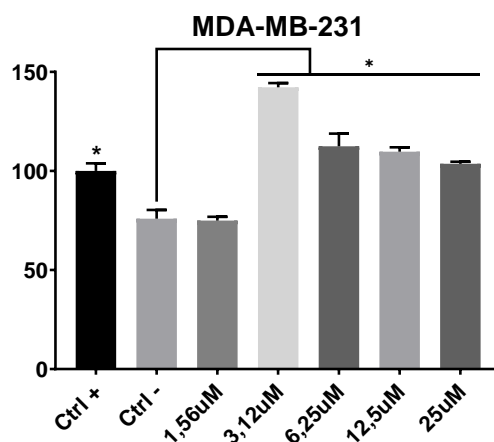
Figura 11. Efeito de diferentes concentrações do composto (4) sobre a organização dos feixes de actina do citoesqueleto e no núcleo celular das células tumorais de mama MDA-MB-231. Cada quadro corresponde a uma das triplicatas de cada concentração. O controle é isento de qualquer tratamento.



4.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Espécies reativas de oxigênio são geradas continuamente durante o metabolismo aeróbico. ERO são moléculas altamente reativas e em quantidades excessivas podem levar à oxidação proteica, degradação de DNA e consecutivamente à morte celular (UY; MCGLASHAN; SHAIKH, 2011). Observa-se que a geração de ERO pelo composto (4), em 5 h de tratamento, é significativa quando comparado ao controle, a partir da concentração de 3,12 μM. A produção de ERO apresenta-se menor nas concentrações maiores, porém ainda estatisticamente significativas, quando comparadas ao controle negativo, ou seja, aquele que não teve indução da geração de ERO por tratamento com o composto ou pela exposição ao peróxido de hidrogênio Figura 12, página 47, indicando que o complexo (4) é um forte indutor da geração de ERO intracelular.

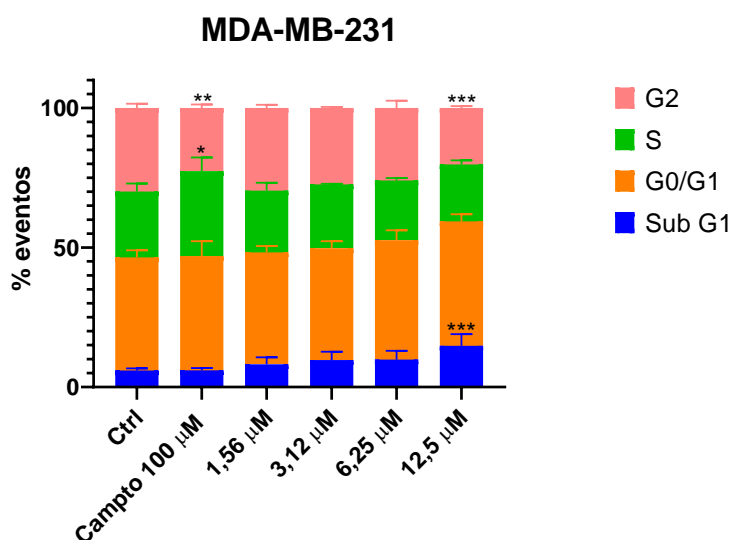
Figura 12. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo composto (4) na linhagem celular tumoral de mama MDA-MB-231. * $p < .0001$, One-way ANOVA, post-hoc de Holm-Sidak.



4.7 CICLO CELULAR

Visando investigar o efeito do complexo (4) nas fases do ciclo celular na linhagem MDA-MB-231, foi realizada a análise da quantidade de DNA simples e dupla fita, utilizando o PI (iodeto de propídeo) como marcador. Observou-se um aumento significativo no número de células na fase sub-G1 e diminuição na quantidade de células na fase G2, observado na Figura 13.

Figura 13. Efeito do composto (4) no ciclo celular das células MDA-MB-231. Camptotecina foi utilizada como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata e comparado com o controle negativo. Significância no nível * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, Two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni.



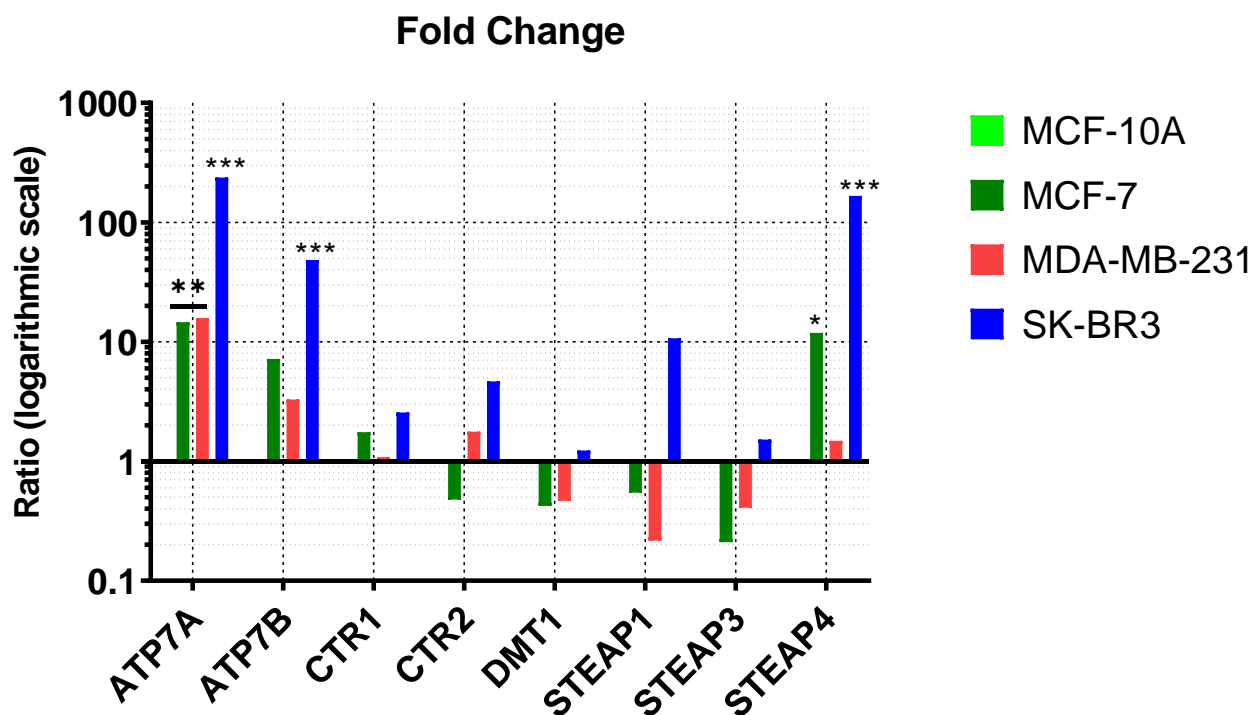
4.8 TRANSFEÇÃO CELULAR

As células MDA-MB-231 foram submetidas à transfeção celular transiente para superexpressão da proteína CTR1 com a inserção do vetor pMCV6-SCL31A1 (Figura 6, página 37). Após procedimento metodológico previamente descrito, prosseguiu-se para análise de expressão gênica via RT-qPCR, visando confirmar a efetividade da transfeção.

4.8.1 RT-qPCR – células parentais e transfectadas

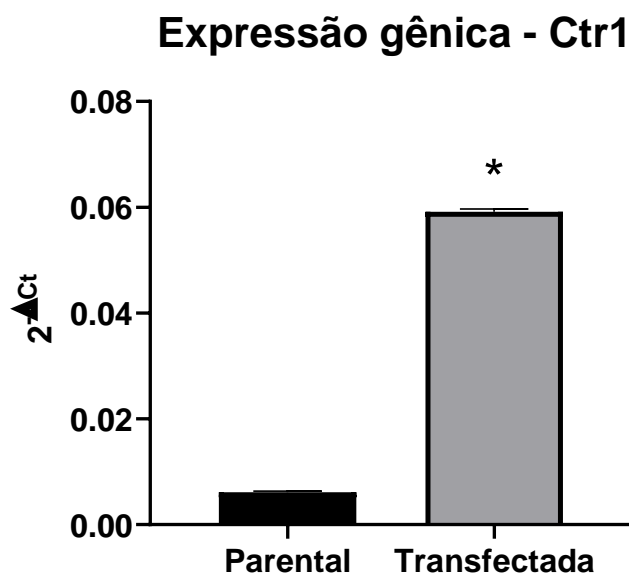
A expressão dos genes relacionados ao transporte de metais das células tumorais MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR3 e da célula não tumoral de mama MCF-10A, foi analisada por *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative Real Time* (RT-qPCR). Observa-se nas células MDA-MB-231 não transfectadas que os níveis do receptor de cobre CTR1 são similares aos da célula controle MCF-10A, enquanto que para os outros genes há uma variação entre maior ou menor expressão, fato também observado para as demais células.

Figura 14. Expressão gênica de transportadores de metais em células parentais tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR3, em comparação aos níveis da célula não tumoral de mama MCF-10A, considerada controle para relativizar a proporção de aumento (*fold change*) em escala logarítmica dos genes. * $p < .005$, ** $p < .001$, *** $p < .0001$, Two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni.



Após transfecção celular analisou-se os níveis de expressão gênica para o receptor CTR1 entre as células MDA-MB-231 parentais e transfectadas. O resultado mostra que houve um aumento significativo da expressão gênica para o CTR1 em aproximadamente 10 vezes nas células transfectadas frente às células parentais, indicando que o plasmídeo foi inserido com sucesso no interior da célula tumoral, além de evidenciar a estabilidade da transfecção após seleção celular com o uso do antibiótico G418, observado na Figura 15.

Figura 15. Expressão do gene SCL31A1 (CTR1) entre as células tumorais MDA-MB-231 parentais e transfectadas. * $p < .0001$, t-test.



4.8.2 Viabilidade celular das células transfectadas

A fim de testar a hipótese de que para a entrada de um composto por meio do receptor CTR1 é necessário a disponibilidade de pontos vacantes que permita a redução do cobre ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$) e assim maior efetividade sobre a citotoxicidade, realizou-se um novo ensaio de viabilidade em células parentais e transfectadas, com os complexos (4) e (8).

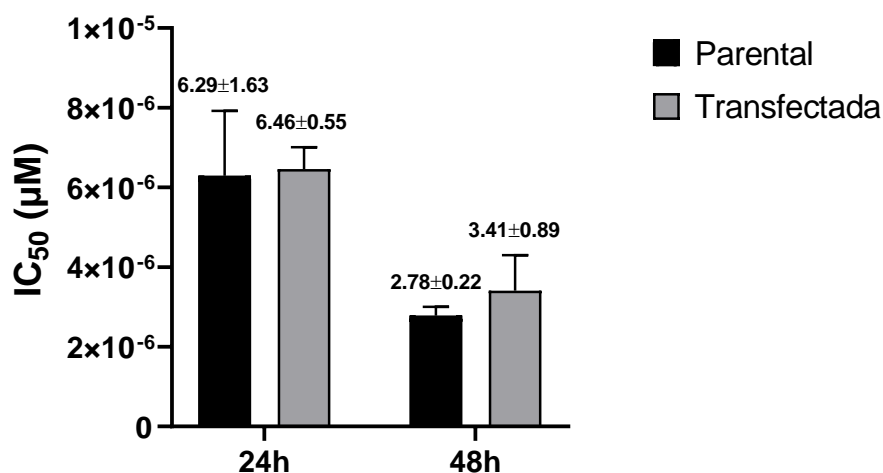
Como observado no gráfico A da Figura 16, não há diferença significativa entre as células parentais e transfectadas tratadas com o composto (4), porém, observa-se uma redução após 24h de tratamento na viabilidade de células transfectadas com o composto (8), tornando-se estatisticamente significativo em 48h, cujos valores de IC_{50} são apresentados no gráfico B. Isso indica que a presença de pontos vacantes decorrentes da

perda dos íons cloretos ligados ao cobre no complexo (8) podem favorecer sua maior captação pelo CTR1 e, portanto, desencadear um aumento de toxicidade nas células transfectadas, fato não pressuposto a ocorrer pelo complexo (4).

Figura 16. Valores de IC_{50} (concentração tóxica para 50% das células) dos compostos de cobre (4) - $[Cu(sdmx)_2(phen)].H_2O$ - e (8) - $[CuCl_2(-impy)]$ -, após 24h e 48h de incubação com células tumorais de mama MDA-MB-231 parentais e transfectadas; valores representados em μM . * $p < .05$, Teste t, post-hoc de Bonferroni.

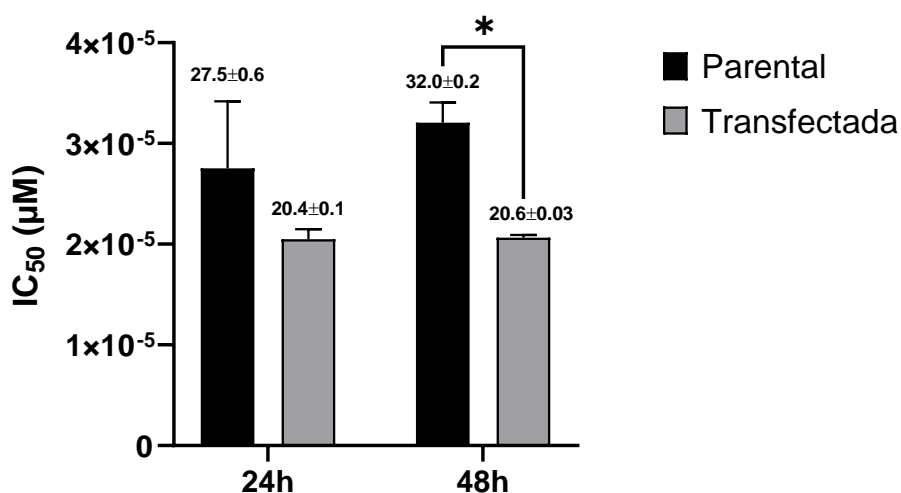
A

$IC_{50} [Cu(sdmx)_2(phen)].H_2O$



B

$IC_{50} [CuCl_2(-impy)]$



5 DISCUSSÃO

A quimioterapia ainda é hoje o tratamento terapêutico mais utilizado contra a maior parte dos cânceres, sendo administrada sozinha ou em conjunto com outras técnicas, como o tratamento adjuvante, em que a administração do quimioterápico se inicia após a intervenção cirúrgica, e o neoadjuvante sendo o contrário. No entanto, a resistência a fármacos antitumorais, bem como os efeitos colaterais, constituem os maiores obstáculos para o seu sucesso (ZHENG, 2017). Assim, existem diversas pesquisas em busca de novos fármacos que possam atuar de forma mais eficaz. Entre as abordagens utilizadas nessa busca está a síntese de compostos metálicos que consigam diminuir os efeitos colaterais à medida que também combatam as células tumorais com efetividade (KENNY; MARMION, 2019).

Os complexos de platina se mostraram e, ainda em tempos atuais, se fazem bastante presentes nas linhas de tratamento e como alvos de pesquisas, mesmo sabendo de suas desvantagens. Desta maneira, a procura por complexos antitumorais com outros centros metálicos, para além da platina, intensificou-se ao longo dos anos. Entre as vantagens de usar outros metais de transição estão a acessibilidade de pontos de coordenação adicionais em complexos octaédricos, alterações na afinidade dos ligantes e cinética de substituição, além da variabilidade de estados de oxidação. Neste contexto, os complexos estudados neste projeto são considerados promissores para o tratamento de células tumorais de mama (ALESSIO; MESSORI, 2019; MARKOWSKA et al., 2015; RUIZ-AZUARA; BRAVO-GÓMEZ, 2010)

O cobre é um íon metálico com vasto potencial em aplicações terapêuticas, sendo que a atividade de complexos de cobre tem sido avaliada recentemente mostrando resultados promissores. Tardito, et al (2010), testaram 11 complexos de cobre coordenados a diferentes ligantes derivados da pirazolona e encontraram significativa resposta contra a linhagem tumoral de fibrossarcoma HT1080, os valores de IC_{50} variaram na faixa de 3 a $28\mu M$, com a maioria dos valores em torno de $13\mu M$ e com três complexos abaixo de $7\mu M$ (TARDITO et al., 2011). Neste estudo, observa-se uma larga faixa de valores de IC_{50} , em que os complexos de cobre foram ativos desde 1,89 a $44,83\mu M$. Esta variação está relacionada com os ligantes coordenados ao metal, uma vez que a sulfadimetoxina (1) não apresentou atividade nas células testadas, enquanto 1,10-fenantrolina (2) mostrou o oposto, com uma larga variação de valores de IC_{50} , desde $0,102\mu M$ até $>100\mu M$. Já o 2-(imidazol-2-yl)piridina (7) evidenciou atividade apenas em

48h de tratamento na linhagem SK-BR3, com valor de IC_{50} de $44,83\mu M$. Quando os ligantes (1) e (2) foram coordenados ao cobre, complexo (4), observou-se valores de IC_{50} com maior similaridade, variando de $0,79\mu M$ a $8,95\mu M$, excetuando-se o valor de $30\mu M$ em 24h de tratamento na linhagem MCF-7. O mesmo observado para o ligante (7) coordenado ao cobre, complexo (8), em que a variação dos valores de IC_{50} em células tumorais humanas foi de $11,81\mu M$ a $32,1\mu M$.

A estrutura $[Cu(phen)_2]^{2+}$ é uma das bases de metal-fenantrolina com maior atividade biológica e bem relatada na literatura, sendo atribuído a capacidade de gerar radicais hidroxilas do oxigênio molecular provenientes dos ciclos de oxirredução intracelular, consecutivamente estimulando e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (SAMUNI; CHEVION; GIDON CZAPSKI, 1981). Na Tabela 3, página 39, observa-se importante ação do complexo $[Cu(phen)_2]^{2+}$ (3) em todas as linhagens celulares testadas, cujos valores de IC_{50} variaram entre $0,307\mu M$ a $14,9\mu M$, corroborando com a literatura, em que Deegan et al (2010) também encontraram resultados de IC_{50} para as linhagens tumorais renal A498, e fígado HepG2, na faixa de valores aqui relatadas, sendo $3,8\mu M$ e $0,8\mu M$, respectivamente (DEEGAN et al., 2007). Ainda na mesma Tabela 3, evidencia-se uma expressiva ação da fenantrolina, não coordenada ao cobre, na diminuição da viabilidade celular em quase todas as linhagens testadas (excetuando-se L929), ao contrário dos ligantes (2) e (7) que não mostraram efeitos significativos.

O ligante 2-(imidazol-2-yl)piridina (7) é uma dihidrodipiridina pertencente a classe dos imidazóis, que é um grupo constituído por alcaloides orgânicos que agem como importantes farmacóforos, apresentando interações com DNA, facilmente ligando-se a proteínas e podendo, em altas concentrações, inibir a síntese de componentes da membrana celular sem interferência de esteroides (ALI; LONE; ABOUL-ENEIN, 2017). No ensaio de viabilidade celular, este apresentou modesta ação apenas na linhagem celular tumoral de mama SK-BR3 em 48h (IC_{50} de $44,83\mu M$, 48h), mas quando coordenado ao cobre ocorreu melhoria de sua ação tanto nessa quanto na linhagem celular triplo negativa, MDA-MB-231 (IC_{50} de $27,5\mu M$, 24h). Esta gama de valores também foi encontrada por Sarkarzadeh et al (2013), ao avaliar 22 compostos derivados de uma estrutura dihidropiridinica, sendo que 21 compostos obtiveram valores de IC_{50} maiores que $25\mu M$ para as linhagens celulares tumorais HeLa (cervical), LS180 (colon), MCF-7 (mama) e Jurkat (linfócito T, leucemia), apenas um apresentou IC_{50} de $23,5\mu M$ na linhagem LS180 (SARKARZADEH et al., 2013).

O complexo $[\text{Cu}(\text{sdmx-})_2(\text{phen})].\text{H}_2\text{O}$ e as células MDA-MB-231 constituíram o foco deste trabalho. Nos ensaios iniciais o complexo mostrou notável efetividade contra esta linhagem tumoral apresentando baixos valores de IC_{50} ($6,29\mu\text{M}$, 24h e $2,78\mu\text{M}$, 48h). Valores correlacionáveis com o ensaio morfológico Figura 7, página 40, em que se nota expressiva alteração do formato celular na concentração de $6,25\mu\text{M}$ em 24h e em concentrações maiores desde a primeira hora de tratamento. Contudo, alterações em proteínas de citoesqueleto ocorrem antes de uma visível alteração morfológica (KIM, Dr. Do Kyeong; KIM; KIM, 2019; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010; ZIMMERMANN; KOVAR, 2019), situação evidenciada pela imunomarcção à actina (faloidina) e DNA (DAPI) (Figura 11, página 46) observando-se significativa alteração na intensidade luminosa da proteína do citoesqueleto na concentração de $1,56\mu\text{M}$ e no núcleo em $3,12\mu\text{M}$, quando as células foram tratadas com o complexo (4) por 5 horas.

Uma vez que a atividade da fenantrolina é bem conhecida pela diminuição da migração celular e geração de ERO (LAWS et al., 2018), realizou-se os ensaios de *wound healing* e formação de ERO. Nestes, ocorreu uma significativa diminuição da taxa de migração celular em direção a região central da risca (Figura 10, página 44) já na concentração de $3,12\mu\text{M}$ em 8h, concomitante aumento da geração de ERO, tornando-se significativo, a partir da concentração de $3,12\mu\text{M}$ em 5h de tratamento. Porém, nas concentrações de $6,25\mu\text{M}$ e $12,5\mu\text{M}$, em 24h e 36h, observa-se sinais de alteração morfológica que indicam morte celular, corroborando com os achados na Figura 7, página 40, e com os níveis de ERO demonstrados na Figura 12, página 47.

Este sinal de morte celular em concentrações mais altas e correlatas com o aumento da geração de ERO são abordadas na literatura no sentido de que a presença de níveis alterados de ERO são fator determinante para o correto funcionamento celular e implicam diretamente na sua motilidade e viabilidade sendo influenciados, por exemplo, pelos níveis de Glutathione (GSH) (GURER-ORHAN et al., 2017). Também recentemente Hussain et al. (2019) mostraram que células com quantidade reduzida de GSH poderiam ser mais sensíveis aos efeitos de um complexo de cobre coordenado com ligantes do grupo benzimidazolóio, em que este reduziu em 80% a $25\mu\text{M}$ a quantidade deste antioxidante, correlacionando-se a mudanças na morfologia celular e com a indução de apoptose (HUSSAIN et al., 2019).

Neste sentido, a análise da formação de colônias tem sido um padrão ouro para a determinação de efeitos de radiação ionizante e a determinação de efeitos citotóxicos de

agentes em sistemas celulares *in vitro*. Além disso, aliado a outros experimentos, pode-se inferir qual tipo de processo celular venha a ocorrer em células sob tratamento (KATZ et al., 2008). Assim, como evidenciado na figura 6, o tamanho das colônias diminuiu significativamente a partir da concentração de 6,25 μ M com redução no número de colônias a partir de 1,56 μ M. Em ambas análises a partir da concentração de 12,5 μ M observou-se que ocorreu uma drástica diferença para o controle, o qual não recebeu tratamento. Estes dados correlacionam-se com o achado no ensaio de ciclo celular, no qual evidenciou-se que as células tratadas com o complexo (4), por 5 horas, tiveram aumento significativo na população celular com parada na fase sub G1 do ciclo, na concentração de 12,5 μ M. Como bem descrito na literatura, uma população de células saudáveis possui um perfil de DNA na fase G1, porém, quando uma população celular apresenta teor reduzido de DNA, devido à fragmentação do mesmo por um processo apoptótico, é observada uma diminuição do pico da fase G1, e o conseqüente aumento da quantidade de células estacionárias em sub G1, o que indica a ocorrência de morte celular por apoptose (KAJSTURA et al., 2007).

Em continuidade, na Tabela 4, página 40, são dispostos os índices de seletividade (IS) do complexo (4) para a célula tumoral MDA-MB-231 em comparação com a não tumoral MCF-10A. Embora seja constatado que há menores valores de IC₅₀ na célula tumoral em 24 e 48h, a diferença para a não tumoral é mínima e o IS baixo. Sabe-se que o aporte de cobre para o meio intracelular é mediado pelo transportador de cobre 1 (CTR1), cujo mecanismo de ação se dá pela redução de Cu (II)→Cu(I) no poro extramembranar e uma vez dentro da célula é carregado por meio de transportadores para organelas ou diretamente para sua ação de cofator ou integrador de proteínas e enzimas (LEONE; PROIETTI CECCHINI, 2011). Visto isso, visando aumentar a seletividade do complexo (4) por meio da sensibilização celular, foi realizada transfecção celular para superexpressão do CTR1. Como demonstrado na Figura 4, página 24, e discutido em detalhes químicos nos artigos de suas sínteses e caracterizações (NAKAHATA et al., 2017, 2018), a estrutura química do complexo (4) é composta por ligações fortes ao cobre, diferente do complexo (8), que por conta da presença de íons cloreto, faz-se possível o cobre tornar-se oxidado por meio da perda destes dois íons.

Antes da transfecção celular, por meio de uma análise de RT-qPCR, constatou-se os baixos níveis de CTR1 principalmente nas células tumorais MDA-MB-231, em comparação com as não tumorais, corroborando com a literatura (LIANG et al., 2009).

Ressalta-se que as células SK-BR3 foram as que apresentaram significativamente maiores níveis de expressão gênica dos transportadores ATP7A, ATP7B e STEAP4, bem como para os outros transportadores, de maneira não significativa, em comparação às outras células avaliadas, indicando que esta linhagem seria a mais adequada para os estudos com os complexos de cobre.

Realizada a transfecção, uma nova análise de expressão gênica comprovou seu sucesso com a superexpressão em torno de 10 vezes nos níveis de CTR1 em comparação com as células tumorais parentais Figura 15, página 49, ainda, uma nova análise da viabilidade celular foi realizada, nesta encontrou-se valores de IC₅₀ que não diferiram estatisticamente para células tumorais transfectadas e parentais, quando submetidas a tratamento com o complexo (4). Enquanto que para o complexo (8) mostra-se que as células tumorais se tornaram mais sensíveis com a diminuição significativa do IC₅₀ de 32μM para 20,6μM em 48h. Resultados similares foram reportados por Kim et al (2014) quando realizaram a superexpressão de CTR1 via transfecção celular e notaram diminuição em 3 vezes da LD50, sendo 2,67μg/mL em células parentais para 0,74μg/mL em células transfectadas e tratadas com cisplatina (KIM, K. I. et al., 2014a).

A resistência celular ao tratamento quimioterápico com agentes de platina também é associada a alterações na expressão e funcionamento de transportadores de metais. Estudos evidenciam que a baixa expressão de CTR1 resulta na diminuição da captação de cisplatina (KILARI, 2016; LARSON et al., 2009) e seus derivados (LIANG et al., 2009) por vários tipos de células tumorais. Em cepas de leveduras mutante ou não para o CTR1 e expostas ao sulfato de cobre (CuSO₄) e cisplatina, foi observado que o acúmulo de cobre foi 16 vezes menor na célula mutada e de platina em 8 vezes quando comparadas às células íntegras (LIN, 2002). Níveis elevados de CTR1 em câncer de ovário estão associados com melhor resposta ao tratamento com cisplatina devido ao aumento da captação do quimioterápico, principalmente no estágio inicial, mas similar ao cobre, cisplatina também rapidamente diminui a expressão do receptor por induzir a internalização da proteína da membrana plasmática, quando em células sob cultura (DU et al., 2012).

Em um estudo que realizou a transfecção de células de câncer de mama MDA-MB-231 para superexpressar CTR1 foi visto que houve uma melhora na atividade do cisplatina. Nas células transfectadas, a LD50 (50% *lethal dose*) foi de 0,74μg/mL enquanto que nas parentais foi de 2,67μg/mL, quando injetadas em camundongos foi

observada maior acumulação de cobre (^{64}Cu) naqueles que receberam células transfectadas, $3,574 \pm 0,571$ %ID/g, em comparação aos animais que receberam células parentais, $1,368 \pm 0,316$ %ID/g (KIM, K. I. et al., 2014b). Em outro estudo realizado com células de câncer de próstata foi observado que o *knockout* de CTR1 e *knockdown* de CTR2 resultou em aumento dos níveis basais intracelular de cobre. Nas células parentais a quantidade do metal foi de $1,10 \pm 0,02$ ng/ μg de enxofre, nas células CTR1 (-/-) foi de $0,9 \pm 0,10$ ng/ μg de enxofre, enquanto nas células com ambas condições, CTR1 (-/-) CTR2 (Kd) foi de $1.89 \pm 0,01$ ng/ μg de enxofre (BLAIR, B. G. et al., 2010)

Além disso, as células foram injetadas em animais e observou-se um perfil similar, mas no acúmulo de metal nos animais, tratados com o cisplatina. A média de platina nos animais com tumores CTR1 (-/-) foi de $2,26 \pm 0,36$ ng/mg do tumor, enquanto nas células CTR1 (-/-) CTR2 (Kd) foi de $20,63 \pm 3,53$ ng/mg do tumor. Já no tratamento com cisplatina nos animais com tumores CTR1 (-/-) CTR2 (Kd) foi observado um volume tumoral 74% menor comparado com animais com tumores não tratados e com mesmo tipo de células injetadas (BLAIR, B. G. et al., 2010). De forma conjunta, estes resultados mostram que além do CTR1, o CTR2 também exerce grande efeito no acúmulo e efetividade do tratamento com agentes de platina bem como na captação do cobre, logo, a influência de mais transportadores de metais deve ser levada em consideração nos estudos que abordem a melhoria de intervenções terapêuticas.

Estudos de diferentes laboratórios mostram que as vias metabólicas do cobre estão também envolvidas no influxo e efluxo de platina. CTR1 tem locais de ligação semelhantes para cobre e platina, o que facilita o transporte de ambos por meio da membrana (SUN et al., 2017). CTR2 é conhecido por regular o armazenamento de cobre e cisplatina por interação e truncamento no CTR1, inibindo a passagem de ambos metais e também mantendo os níveis intracelulares de cobre estáveis por funcionar como um sensor e captador extra (OHRVIK et al., 2013). ATP7A sequestra a distribuição intracelular dos complexos de platina e facilita o efluxo do mesmo (SAMIMI, 2004), função similar também exercida pelo ATP7B (YOSHIZAWA et al., 2007). Estudos pré-clínicos demonstram que estes transportadores regulam a resposta ao cisplatina, com destaque para o CTR1 que é um indicador de bom prognóstico durante os tratamentos (BLAIR, Brian G. et al., 2019).

Portanto, este estudo corrobora com os achados da literatura descritos acima e ressalta a importância do CTR1 nas pesquisas avaliando complexos de cobre e também

de platina, uma vez realizada a transfecção celular com alcance da superexpressão do CTR1 (Figura 15, página 49) e efetividade do tratamento por meio da redução do IC₅₀ o complexo (8) (Figura 16, página 50).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram identificados complexos de cobre com atividade citotóxica em modelos *in vitro* utilizando diferentes linhagens de câncer de mama, em destaque a triplo-negativa MDA-MB-231.

O complexo (4), $[\text{Cu}(\text{sdmx-})_2(\text{phen})]\text{H}_2\text{O}$ foi o mais tóxico para esta linhagem celular, mostrando-se capaz de inibir a formação de colônias, alterar a morfologia dessas células e desarranjar as proteínas do citoesqueleto celular em baixas concentrações.

Para evidenciar a importância do receptor CTR1, o mesmo foi super expresso nas células MDA-MB-231 e uma comparação entre os complexos (4) e (8) foi realizada com relação aos efeitos citotóxicos, demonstrando a importância do desenho de metalofármacos que possibilitem a redução do cobre para maior captação dos complexos no interior das células tumorais.

Em conjunto, os resultados mostram que os complexos (4) e (8) possuem potencial antitumoral para novos estudos em células tumorais de mama, podendo ser uma futura alternativa para o tratamento desta doença. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de verificar seus efeitos na toxicidade e na capacidade de inibir metástases em modelos *in vivo*.

7 PERSPECTIVAS

Novos ensaios serão realizados visando compreender os mecanismos de ação dos complexos (4) e (8) e a influência de outros sistemas de transporte e metabolismo de cobre no meio intracelular em linhagens tumorais de mama. Os resultados exibiram níveis diferenciados de expressão gênica entre as células testadas para os transportadores de cobre, o que também direciona futuros estudos envolvendo principalmente o complexo (8) e investigação de sua atividade nas células SK-BR3, visto a expressão significativa de ATP7A e ATP7B, além de STEAP4. Como discutido, o CTR2 também exerce significativa influência na eficácia de tratamentos com agentes de platina, assim, ensaios averiguando seu papel no tratamento realizado com os complexos (4) e (8) serão performados, bem como em comparação com o cisplatina.

8 REFERÊNCIAS

ABRAMSON, Vandana G. et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8–16, 2015.

ALCINDOR MD, T; BEAUGER PHD MBA, N. **Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy**. . [S.l: s.n.], 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3031353/pdf/conc18-18.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

ALDERDEN, Rebecca A.; HALL, Matthew D.; HAMBLEY, Trevor W. The Discovery and Development of Cisplatin. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 5, p. 728, maio 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed083p728>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

ALESSIO, Enzo; MESSORI, Luigi. Anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1995, 2019.

ALI, Imran; LONE, Mohammad Nadeem; ABOUL-ENEIN, Haasan Y. Imidazoles as potential anticancer agents. **MedChemComm**, v. 8, n. 9, p. 1742–1773, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7MD00067G>>.

BARTNICKA, Joanna J.; BLOWER, Philip J. Insights into Trace Metal Metabolism in Health and Disease from PET: “PET Metallomics”. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 9, p. 1355–1359, 2018.

BERGAMO, Alberta; DYSON, Paul J.; SAVA, Gianni. The mechanism of tumour cell death by metal-based anticancer drugs is not only a matter of DNA interactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 17–33, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.009>>.

BERTINATO, Jesse et al. Ctr1 transports silver into mammalian cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 24, n. 3, p. 178–184, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.009>>.

BLACKMAN, Ronald K. et al. Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug Elesclomol. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

BLAIR, B. G. et al. Copper Transporter 2 Regulates Endocytosis and Controls Tumor Growth and Sensitivity to Cisplatin In Vivo. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n.

1, p. 157–166, 2010.

BLAIR, Brian G. et al. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin and carboplatin. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 13, p. 4312–4321, 2019.

BLOOM, David E. et al. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. **World Economic Forum**, n. September, p. 1–46, 2011. Disponível em: <<http://ideas.repec.org/p/gdm/wpaper/8712.html>>.

BRASELMANN, Herbert et al. CFAssay: Statistical analysis of the colony formation assay. **Radiation Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13014-015-0529-y>>.

BRAVO-GÓMEZ, María Elena et al. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 299–309, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006>>.

BRAY, Freddie 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, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>>.

BURRIS, Howard A et al. Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase I study with expansion cohort. **ESMO Open**, v. 1, n. 6, p. e000154, 23 fev. 2017. Disponível em: <<http://esmoopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/esmoopen-2016-000154>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

CATALANI, Simona et al. Free copper in serum: An analytical challenge and its possible applications. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 45, n. November 2017, p. 176–180, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.11.006>>.

CEPEDA, Victoria et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3–18, 2007. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871->

5206&volume=7&issue=1&spage=3>.

CHANG, Won Jin et al. A retrospective comparison of adjuvant chemotherapeutic regimens for non-small cell lung cancer (NSCLC): paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 84, n. 1, p. 51–5, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24521819>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

DAVILA-MANZANILLA, Silvia Graciela et al. Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 266–274, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.045>>.

DEEGAN, Carol et al. In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-fenantrolina (phen), [Ag 2 (phen) 3 (mal)] · 2H 2 O, [Cu(phen) 2 (mal)] · 2H 2 O and [Mn(phen) 2 (mal)] · 2H 2 O (malH 2 = malonic acid) using human cancer cells. **Cancer Letters**, v. 247, n. 2, p. 224–233, 2007.

DEJANA, Elisabetta; CORADA, Monica; LAMPUGNANI, Maria Grazia. Cell Migration into a Wounded Area In Vitro. **Adhesion Protein Protocols**, v. 96, p. 177–182, 2003.

DENG, Zhiqin et al. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. **Biomaterials**, v. 129, p. 111–126, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.017>>.

DENOYER, Delphine et al. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”. **Metallomics**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5MT00149H>>.

DU, Xiubo et al. Comparison between copper and cisplatin transport mediated by human copper transporter 1 (hCTR1). **Metallomics**, v. 4, n. 7, p. 679–685, 2012.

ELLIOTT, Robert L.; HEAD, Jonathan F. Cancer: Tumor Iron Metabolism, Mitochondrial Dysfunction and Tumor Immunosuppression; “A Tight Partnership—Was Warburg Correct?” **Journal of Cancer Therapy**, v. 03, n. 04, p. 278–311, 2012.

ENGEBRAATEN, Olav; VOLLAN, Hans Kristian Moen; BØRRESEN-DALE,

Anne-Lise. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. **The American journal of pathology**, v. 183, n. 4, p. 1064–74, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23920327>>.

EXTRA, J M et al. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 299–303, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2295116>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

FAN, Limei et al. Salicylate-Phenanthroline copper (II) complex induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 29823–29832, 2017.

FONSECA DE SOUSA, Grazielle; RODRIGUES WLODARCZYK, Samarina; MONTEIRO, Gisele. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, 2014. Disponível em: <<http://dx.>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

GOMES, I. M.; MAIA, C. J.; SANTOS, C. R. STEAP Proteins: From Structure to Applications in Cancer Therapy. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 573–587, 2012.

GRANDCHAMP, Bernard et al. A novel type of congenital hypochromic anemia associated with a nonsense mutation in the STEAP3/TSAP6 gene. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6660–6666, 2011.

GRUNEWALD, Thomas G.P. et al. The STEAP protein family: Versatile oxidoreductases and targets for cancer immunotherapy with overlapping and distinct cellular functions. **Biology of the Cell**, v. 104, n. 11, p. 641–657, 2012.

GUERREIRO, Joana Fernandes et al. Radiobiological characterization of $^{64}\text{CuCl}_2$ as a simple tool for prostate cancer theranostics. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 1–15, 2018.

GUPTA, Arnab; LUTSENKO, Svetlana. Evolution of copper transporting ATPases in eukaryotic organisms. **Current Genomics**, v. 13, n. 2, p. 124–133, 2012. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/PMC3308323>>.

GURER-ORHAN, Hande et al. The Role Of Oxidative Stress Modulators In Breast Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. July, 2017. Disponível em:

<<http://eurekaselect.com/154115>>.

GUTIÉRREZ, Anllely Grizett et al. Copper(ii) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line chp-212. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 126, n. 3, p. 17–25, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001>>.

HATORI, Yuta; LUTSENKO, Svetlana. The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, p. 25, 2016.

HEFFETER, P. Intrinsic and Acquired Forms of Resistance against the Anticancer Ruthenium Compound KP1019 [Indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A)]. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 1, p. 281–289, 11 ago. 2004. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.104.073395>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

HUSSAIN, Afzal et al. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41063-x>>.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. [S.l.: s.n.], 2017.

ISHIDA, S. et al. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19507–19512, 2013.

ISHIDA, Seiko et al. Enhancing Tumor-Specific Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin with a Copper Chelator. **Cancer Cell**, v. 17, n. 6, p. 574–583, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.011>>.

KAJSTURA, Malgorzata et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “Sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A**, v. 71, n. 3, p. 125–131, 2007.

KAPLAN, Jack H.; LUTSENKO, Svetlana. Copper transport in mammalian cells: Special care for a metal with special needs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.

38, p. 25461–25465, 2009.

KATZ, David et al. Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: Novel applications to combination therapies and high-throughput screening. **BioTechniques**, v. 44, n. 2, p. 9–14, 2008.

KENNY, Reece G.; MARMION, Celine J. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs - A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens? **Chemical Reviews**, v. 119, n. 2, p. 1058–1137, 2019.

KHOWDIARY, ManalMohmed; MOSTAFA, NashwaS. Synthesis of sulfadimetoxina based surfactants and their evaluation as antitumor agents. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 137, 2016.

KILARI, Deepak. Role of copper transporters in platinum resistance. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 106, 2016.

KIM, Dr. Do Kyeong; KIM, Dr. Eun Kyoung; KIM, Prof. Jin. THE CYTOSKELETAL ALTERATION MODULATES CELL INVASIVENESS OF OSCC CELLS THROUGH RHOA-YAP SIGNALING IN STROMAL FIBROBLASTS. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 128, n. 1, p. e58, 2019.

KIM, K. I. et al. Detection of Increased ^{64}Cu Uptake by Human Copper Transporter 1 Gene Overexpression Using PET with $^{64}\text{CuCl}_2$ in Human Breast Cancer Xenograft Model. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 55, n. 10, p. 1692–1698, 2014a. Disponível em: <<http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.114.141127>>.

_____. Detection of Increased ^{64}Cu Uptake by Human Copper Transporter 1 Gene Overexpression Using PET with $^{64}\text{CuCl}_2$ in Human Breast Cancer Xenograft Model. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 55, n. 10, p. 1692–1698, 2014b.

KIM, Kwangsoo et al. Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 1 (STEAP1) Has a Single heme and Is Capable of Reducing Metal Ion Complexes and Oxygen. **Biochemistry**, v. 55, n. 48, p. 6673–6684, 2016.

KIRSHNER, J. R. et al. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 8, p. 2319–2327, 2008.

KNUTSON, Mitchell D. Steap proteins: Implications for iron and copper

metabolism. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 7, p. 335–340, 2007.

LARSON, C. A. et al. The Role of the Mammalian Copper Transporter 1 in the Cellular Accumulation of Platinum-Based Drugs. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 324–330, 2009.

LAWS, Kristine et al. A Copper(II) Phenanthroline Metallopeptide That Targets and Disrupts Mitochondrial Function in Breast Cancer Stem Cells. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 1, p. 287–291, 2018.

LEIJEN, Suzanne et al. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 201–214, 2015.

LEONE, Massimo; PROIETTI CECCHINI, Alberto. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 129–137, 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14737175.2016.1216796>>.

LEWIS, Adam et al. The chemical biology of Cu(II) complexes with imidazole or thiazole containing ligands: Synthesis, crystal structures and comparative biological activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 157, p. 52–61, abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013416300149>>. Acesso em: 4 ago. 2019.

LIANG, Z. D. et al. Mechanistic Comparison of Human High-Affinity Copper Transporter 1-Mediated Transport between Copper Ion and Cisplatin. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 843–853, 2009.

LIN, X. The Copper Transporter CTR1 Regulates Cisplatin Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 1154–1159, 2002.

LINZ, Rachel; LUTSENKO, Svetlana. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: Cousins, not twins. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 5–6, p. 403–407, 2007.

LU, Jie et al. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. **Small**, v. 6, n. 16, p. 1794–1805, 2010.

LU, Mingxia et al. Enhanced Antimetastatic Activity of the Ruthenium Anticancer Drug RAPTA-C Delivered in Fructose-Coated Micelles. **Macromolecular Bioscience**, v. 201600513, p. 1600513, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201600513>>.

M., Adams J. et al. Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 7, p. 1968–72, 1973. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=433644&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MARKOWSKA, Anna et al. Noble metals in oncology. **Wspolczesna Onkologia**, v. 19, n. 4, p. 271–275, 2015.

MATHÉ, G et al. A phase I trial of trans-1-diaminocyclohexane oxalato-platinum (I-OHP). **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 40, n. 10, p. 372–6, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3580505>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

MCWHINNEY, Sarah R; GOLDBERG, Richard M; MCLEOD, Howard L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 1, p. 10–16, 2009. Disponível em: <<http://www.>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

MJOS, Katja Dralle; ORVIG, Chris. Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 2014.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, NULL, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

NAGAI, Masazumi et al. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 10, p. 2142–2150, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.017>>.

NAKAHATA, Douglas H. et al. Sulfonamide-containing copper(II) metallonucleases: Correlations with in vitro antimycobacterial and antiproliferative

activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 187, p. 85–96, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013418301727>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

_____. Synthesis, characterization and preliminary antimicrobial assays of copper(II) complexes with 2-(imidazole-2-yl)heteroaryl ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 458, p. 224–232, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.01.015>>.

NEHYBOVÁ, Tereza et al. Wedelolactone acts as proteasome inhibitor in breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–14, 2017.

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja et al. Organometallic Ruthenium(II) Arene Compounds with Antiangiogenic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3895–3902, 9 jun. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jm2002074>>.

O'DAY, Steven et al. Phase II, randomized, controlled, double-blinded trial of weekly elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone for stage IV metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 32, p. 5452–5458, 2009.

O'DAY, Steven J et al. Final results of phase III SYMMETRY study: randomized, double-blind trial of elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone as treatment for chemotherapy-naive patients with advanced melanoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 9, p. 1211–8, 20 mar. 2013. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.44.5585>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

OHRVIK, H. et al. Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ecto-domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. E4279–E4288, 2013.

ÖHRVIK, Helena; THIELE, Dennis J. How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1, Ctr1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1314, n. 1, p. 32–41, 2014.

PALANIMUTHU, Duraippandi et al. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 722–734, 14 fev. 2013. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm300938r>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

PARISE, Carol A.; CAGGIANO, Vincent. Risk factors associated with the triple-negative breast cancer subtype within four race/ethnicities. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 163, n. 1, p. 151–158, 17 maio 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-017-4159-y>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

PASSER, Brent J et al. NIX_PNAS-2003-Passer-2284-9. v. 100, n. 5, p. 1–6, 2003. Disponível em: <<papers://14e9de7b-4abc-44b1-bc56-6ea147e91f03/Paper/p135>>.

PAVLOVA, Natalya N.; THOMPSON, Craig B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 12 jan. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311500621X>>. Acesso em: 30 mar. 2018.

PENG, Huifang et al. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin for treating ovarian cancer in vitro and in vivo via transferrin binding. n. Ii, 2017.

PIERSON, Hannah et al. The Function of ATPase Copper Transporter ATP7B in Intestine. **Gastroenterology**, v. 154, n. 1, p. 168- 180.e5, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.019>>.

PIZARRO, Ana M; SADLER, Peter J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198–1211, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908409000789>>.

PLUIM, Dick et al. Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 71–78, 19 jul. 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00280-004-0773-6>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

POPE, Christopher R. et al. Structure and Function of Copper Uptake Transporters. **Current Topics in Membranes**, v. 69, p. 97–112, 2012a.

_____. **Structure and Function of Copper Uptake Transporters**. [S.l.]: Elsevier, 2012b. v. 69. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00004-5>>.

RABIK, Cara A.; DOLAN, M. Eileen. Molecular Mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat Rev**, v. 76, n. October 2009, p.

211–220, 2012.

ROBERTS, Nathan B. et al. Repurposing platinum-based chemotherapies for multi-modal treatment of glioblastoma. **OncoImmunology**, v. 5, n. 9, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1208876>>.

ROSENBERG, BARNETT et al. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385–386, abr. 1969. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/222385a0>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

RUIZ-AZUARA, L; BRAVO-GÓMEZ, M E. Copper compounds in cancer chemotherapy. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3606–15, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846116>>.

SAMIMI, G. Modulation of the Cellular Pharmacology of Cisplatin and Its Analogs by the Copper Exporters ATP7A and ATP7B. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 25–32, 2004.

SAMUNI, Amram; CHEVION, Mordechai; GIDON CZAPSKI. Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 24, p. 12632–12635, 1981.

SARKARZADEH, Hasti et al. Synthesis and antiproliferative activity evaluation of imidazole-based indeno[1,2-b]quinoline-9,11-dione derivatives. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 436–447, 2013.

SCARL, Rachel T et al. STEAP4: its emerging role in metabolism and homeostasis of cellular iron and copper. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 3, p. R123–R134, 2017.

SEELIG, Matthias H.; BERGER, Martin R.; KEPPLER, Bernhard K. Antineoplastic activity of three ruthenium derivatives against chemically induced colorectal carcinoma in rats. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 118, n. 3, p. 195–200, mar. 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01410134>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

SHAHZAD, Mian M K; LOPEZ-BERESTEIN, Gabriel; SOOD, Anil K. Novel Strategies for Reversing Platinum Resistance. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789192/pdf/nihms151050.pdf>>.

Acesso em: 2 ago. 2019.

SUN, Si et al. The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis of literatures and datasets. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 16036–16051, 2017.

SZE, Chak Ming et al. Interaction of cisplatin and analogues with a Met-rich protein site. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 163–165, 2009.

TABTI, Redouane et al. Progress in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Medicinal chemistry**, v. 07, n. 05, p. 875–879, 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/progress-in-copper-complexes-as-anticancer-agents-2161-0444-1000445.php?aid=89587>>.

TARDITO, Saverio et al. Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 16, p. 6235–6242, 2011.

UY, Benedict; MCGLASHAN, Susan R.; SHAIKH, Shamim B. Measurement of reactive oxygen species in the culture media using Acridan lumigen PS-3 assay. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 22, n. 3, p. 95–107, 2011.

WHEATE, Nial J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113, 25 ago. 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0dt00292e>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

XIANG, Shulin et al. Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 1, p. 60–69, 2015.

YILMAZ, Mahmut; CHRISTOFORI, Gerhard. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 629–642, 2010.

YOSHIZAWA, Kunio et al. Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines. **Oncology Reports**, v. 18, n. 4, p. 987–991, 2007.

ZAIDI, Yusra et al. A comprehensive biological insight of trinuclear copper(II)-tin(IV) chemotherapeutic anticancer drug entity: in vitro cytotoxicity and in vivo systemic toxicity studies. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 6, n. 8, p. 1469–79, ago.

2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817323>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

ZHANG, Fan et al. Metalloreductase steap3 coordinates the regulation of iron homeostasis and inflammatory responses. **Haematologica**, v. 97, n. 12, p. 1826–1835, 2012.

ZHENG, Hua-Chuan. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 59950–59964, 2017.

ZIMMERMANN, Dennis; KOVAR, David R. Feeling the force: formin's role in mechanotransduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 56, p. 130–140, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.12.008>>.

ZIMNICKA, Adriana M.; IVY, Kristin; KAPLAN, Jack H. Acquisition of dietary copper: a role for anion transporters in intestinal apical copper uptake. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 300, n. 3, p. C588–C599, 2011.