



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

**Efeitos antitumorais da naringenina complexada
com cobre (II) e 2,2'-bipiridina em células de
câncer de mama**

Júlio César Conceição Filho

São Carlos

2014

**Efeitos antitumorais da naringenina complexada
com cobre (II) e 2,2'-bipiridina em células de
câncer de mama**

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

Dissertação de Mestrado

**Efeitos antitumorais da naringenina complexada
com cobre (II) e 2,2'-bipiridina em células de
câncer de mama**

Júlio César Conceição Filho*

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Fisiológicas.**

Orientadora: Marcia Regina Cominetti

***bolsista CAPES**

São Carlos – SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C744ea

Conceição Filho, Júlio César.

Efeitos antitumorais da naringenina complexada com cobre (II) e 2,2'-bipiridina em células de câncer de mama / Júlio César Conceição Filho. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 54 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Câncer. 2. Produtos naturais. 3. Complexos metálicos. I. Título.

CDD: 616.994 (20ª)

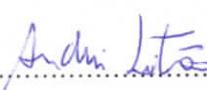
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Júlio Cesar Conceição Filho

Dia 07/05/2014

Profª. Drª. Marcia Regina Cominetti..... 

Prof. Dr. Andrei Leitão..... 

Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... 

Agradecimentos

Quando olhei para trás pude ver que nunca estive sozinho, que sempre tive boas companhias e graças a elas hoje estou aqui, sentado em minha escrivaninha olhando pela janela o céu que brilha como se quisesse me mostrar o que eu nunca devo esquecer. Neste azul imenso posso ver o rosto de todos vocês e aproveito para agradecer a Deus pela presença de cada um em minha vida.

*Aos meus pais que me deram a vida e nela me ensinaram a caminhar.
À minha mãe que sempre foi o maior exemplo de perseverança, dedicação e devoção a um objetivo.*

Ao meu pai, por me desafiar e me fazer ter a vontade de mostrar que posso ser cada vez mais e sem hesitar me oferecer suporte todas as vezes que precisei.

À minha irmã, pois, sempre que voltava para casa fazia questão de lá estar e me receber e mesmo sendo “durona” acabava por deixar transparecer o seu amor fraterno.

À fisiologia que me trouxe para São Carlos e aos meus amigos Diego, Andressa, Alex e Janaína que me acompanharam em cada viagem em meu primeiro ano e que sempre me incentivaram a permanecer aqui e entrar na pós-graduação.

Ao meu amigo Danilo, além de me dar abrigo nunca negou corrigir uma questão fisiológica e sempre me cobrava saber mais.

Ao Leandro (Leu) que nada menos, foi quem me apresentou a minha orientadora.

Ao André Sarria, que gentilmente cedeu seus compostos para que eu pudesse então iniciar minhas pesquisas.

À Kátia que sacrificou inúmeros finais de semana, preciosas horas de sono e o tempo ao lado de sua família para ficar ao meu lado dentro de um laboratório, por ouvir minhas reclamações, meus desabafos e me dar coragem quando duvidei de minha capacidade.

À Angélica por incontáveis vezes, ser minha professora de química e sanar diversas dúvidas que apareciam a cada novo experimento.

Às minhas companheiras de laboratório Amanda e Angelina que, por vezes dividiram preocupações, angústias, ansiedade e alegrias em cada experimento. Por serem excelentes companheiras de R.U. e mais que isso por aturarem meu mau humor quase diário, principalmente antes do almoço.

À Patrícia que mesmo sendo visita em nosso laboratório, esteve sempre disposta a nos ajudar e passar sua experiência para os novatos do LABEN.

À Ana Carolina (Carol) que além de amiga também foi professora e apaziguadora em alguns momentos. Por ter me ensinado quase tudo que sei sobre células, desde olha-las no microscópio a cultivar e compreender os mecanismos biomoleculares envolvidos em cada ensaio.

Às pessoas que me fizeram sentir São Carlos como minha casa e que agradeço a honra de ter conhecido e ter o convívio: José Campanholi (Zé), Charles, Prof. Keico (Keico), Grazielle, Gustavo, Bruno (Giz), Anderson, Markus, Luciane, Luísa, Guilherme, Daniela (Dani), Leo, Rodrigo, Nathalia e Francine. Como disse, foi uma honra poder estar com vocês.

À Marcia, minha orientadora, agradeço de todo meu coração. Pessoa chave de tudo isso, que além de abrir as portas do seu laboratório, sempre cobrou o melhor de mim em cada seminário, em cada resultado apresentado, do projeto até o final desta dissertação. Que inúmeras vezes me chamou a atenção, me empurrou, me deu puxões de orelha e principalmente nunca desistiu da minha formação como pós-graduando. Que esteve sempre presente tanto na bancada como em bancos de bares e confraternizações, a quem além de orientadora também pude chamar de AMIGA.

Agradeço também a FAPESP e a CAPES pelo suporte financeiro.

Espero com este, imortalizar minha gratidão eterna a todos vocês.

Símbolos e abreviaturas

7-AAD - 7-Aminoactinomicina D

A_t - Área total

Bipy - 2,2'-bipiridina em alguns casos pode ser representado por X

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

FBS – Soro fetal bovino

NGEN - Naringenina (4',5,7-Trihidroxiflavanona)

NGENCuB – Naringenina complexada com uma molécula de Cu(II) e uma de Bipy

PBS – Tampão Salina Fosfato

PE - Ficoeritrina

TE – Tampão de extração

TEA – Trietilamina

Sumário

1. Introdução	13
1.1. O câncer	13
1.2. Produtos naturais com atividade antitumoral	16
1.3. Flavonoides com atividade antitumoral	17
1.4. Atividades terapêuticas do cobre	18
2. OBJETIVO	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Compostos	24
3.2. Cultura celular	24
3.3. Citotoxicidade e proliferação celular – medida pelo método do MTT	25
3.4. Formação de Colônias	25
3.5. Morfologia Celular	26
3.6. Migração celular.....	26
3.6.1. Wound Healing	26
3.6.2. Zimografia	27
3.7. Apoptose.....	28
3.7.1. Citometria de Fluxo.....	28
3.7.2. Coloração com DAPI.....	28
3.8. PCR em tempo real:	28
3.9. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Morfologia Celular	31
4.2. Formação de colônias	31
4.3. Viabilidade Celular.....	34
4.4. Migração Celular.....	34
4.4.1. <i>Wound healing</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.2. Migração inserto	37
4.5. Zimografia.....	Erro! Indicador não definido.
4.6. DAPI.....	Erro! Indicador não definido.
4.7. PCR em tempo real.....	Erro! Indicador não definido.
5. Discussão.....	45
6. Conclusão.....	49
7. Referências Bibliográficas	51

Lista de Figuras

Figura 1. Alvos terapêuticos para regressão tumoral..	15
Figura 2: Novas entidades químicas desenvolvidas entre janeiro de 1981 e junho de 2006	17
Figura 3: Morfologia das células MDA-MB-231.....	32
Figura 4 – Efeito da NGEN e NGENCuB na formação de colônias de células MDA-MB-231.	33
Figura 5: Efeito da NGEN e NGENCuB no número, tamanho e eficiência de plaqueamento das células MDA-MB-231.	33
Figura 6: Ensaio de viabilidade celular	35
Figura 7: Migração <i>wound healing</i>	36
Figura 8: Análise quantitativa do ensaio de migração <i>wound healing</i>	37
Figura 9: Efeitos da NGENCuB sobre a migração das células MDA-MB-231	37
Figura 10: Efeitos da NGEN e NGENCuB sobre a atividade da pró-MMP9	39
Figura 11: Efeitos da NGEN e NGENCuB na fragmentação de DNA nuclear	40
Figura 12: Porcentagem de células apoptóticas	41
Figura 13: Efeitos da NGEN e NGENCuB na indução da apoptose tardia.....	42
Figura 14: Efeitos da NGEN e NGENCuB na expressão gênica de células MDA-MB-231	43

Lista de tabelas

Tabela 1: Alimentos e suas quantidades de flavonoides por porção 18

Tabela 2: Primers utilizados para o ensaio PCR em tempo real.....**Erro! Indicador não definido.**

Resumo

O câncer, a segunda doença que mais mata no mundo, é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Tal fenômeno ocorre por vários motivos, dentre eles, alterações no DNA que podem ser causadas por diversos fatores como estresse oxidativo, exposição à radiação solar e tabagismo, entre outros. Muitos esforços estão sendo empregados na busca de tratamentos que possam prolongar a vida de um paciente ou até mesmo curar em definitivo a doença. Nesta busca, muitos compostos quimioterápicos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de combater os diversos tipos de câncer. Dentre tais compostos vários foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, derivados de plantas ou de compostos bioativos como a camptotecina, extraída da casca da planta *Camptotheca acuminata* e o taxol, derivado da *Taxus brevifolia*. Os flavonoides formam um grupo de metabólitos secundários, os quais pertencem à classe dos polifenóis. Eles são encontrados em diversas espécies de plantas, especialmente em frutas, sementes e flores. Muitos deles foram descritos como tendo alta capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora e antitumoral. Os principais grupos derivados dos flavonóides são: os flavanóis, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas, flavononas, e flavonas. A naringenina pertence ao grupo das flavononas comumente encontradas em frutas cítricas e já demonstrou, em estudos anteriores, possuir uma ação antitumoral. Para tornar mais efetiva a ação destes compostos, muitos têm sido ligados a complexos metálicos o que, por diversas maneiras, aumenta a citotoxicidade dos mesmos. Um dos maiores desafios para campo de estudo do câncer está em obter um composto quimioterápico que seja citotóxico somente para células tumorais e que tenha menores efeitos colaterais comparados com os fármacos utilizados atualmente. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar o efeito citotóxico da naringenina e da naringenina complexada com cobre e 2,2'-bipiridina, na linhagem de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e compreender alguns dos mecanismos de ação molecular envolvidos.

Abstract

Cancer, is the name given to a set of more than 100 diseases that have in common the uncontrolled growth of cells that invade tissues and organs. It occurs for several reasons, among them changes in DNA that may be caused by many factors such as oxidative stress, exposure to sunlight and smoking. Many efforts are being made in the search for treatments that may prolong a patient's life or even cure of the disease. In this quest, many chemotherapeutic compounds have been developed in an attempt to combat the different types of cancer. Among these various compounds were developed directly or indirectly from natural products derived from plants or bioactive compounds such as camptothecin, extracted from the bark of *Camptotheca acuminata* plant and taxol derivative of *Taxus brevifolia*. Flavonoids are a group of secondary metabolites, which belong to the class of polyphenols. They are found in several species of plants, especially in fruits, seeds and flowers. Many of them were described as having high antioxidant, anti-inflammatory, antiallergic, hepatoprotective and antitumor capacity. The main groups derived from flavonoids are: flavanols, flavonols, isoflavones, anthocyanidins, flavonones, and flavones. The naringenin belongs to the group of flavonones commonly found in citrus fruits and has shown in previous studies to possess anti-tumor action. To make more effective the action of these compounds, many have been linked to metal complexes which increases the cytotoxicity of the same. One of the biggest challenges in the field of cancer research is to obtain a chemotherapeutic compound that is cytotoxic to tumor cells only and has fewer side effects compared to drugs currently used. Thus, the aim of this study was to evaluate and compare the cytotoxic effect of naringenin and naringenin complexed with copper and 2,2'-bipyridine, in triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231 and understand some of the mechanisms molecular action involved.

Introdução

1. Introdução

1.1. O câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem diferentes tecidos e órgãos. Esta doença é a segunda maior causa de morte no mundo precedida apenas por mortes decorrentes de doenças cardíacas[1].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2030 o câncer será responsável por 13,1 milhões de mortes em todo o mundo. No Brasil, as estimativas para 2010 foram de mais de 480 mil novos casos, já para 2012 estas estimativas apontaram para a ocorrência de aproximadamente 520 mil novos casos de câncer [1, 2]. Para 2014 estima-se que somente nos Estados Unidos sejam registrados em torno de 1.665.540 novos casos de câncer e um total de 585.720 mortes causadas pelo câncer [3]. Entre os homens europeus e asiáticos o câncer de pulmão é o mais comum, já o câncer de próstata é mais incidente na América do Norte, América do Sul e Austrália. Entretanto, entre as mulheres em quase todas as partes do mundo o tipo de câncer mais comum é o câncer de mama [4]. No Brasil, a exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e pulmão, para o sexo masculino, e de mama e colo do útero, no sexo feminino são os de maior incidência, o que acompanha o mesmo perfil de magnitude observada no mundo, sendo que nas mulheres, o câncer de mama é o mais incidente 52 casos a cada 100 mil mulheres [1]. No ano de 2008 aproximadamente 1,4 milhões de mulheres no mundo todo foram diagnosticadas tendo câncer de mama, sendo que no mesmo ano 459 mil mortes foram registradas e atribuídas ao câncer de mama [5]. Estima-se que nos Estados Unidos uma cada oito mulheres irão desenvolver câncer de mama ao longo de suas vidas, sendo que em 2013 foram registrados 232.340 novos casos de câncer de mama e o mesmo provocou 39.620 mortes [6].

Na tentativa de conter estes números, diversas pesquisas estão em andamento para desenvolver novas moléculas bioativas. Porém, existem várias dificuldades a transpor, como o fato de um agente antitumoral ter preferencialmente que atuar seletivamente matando ou inibindo o crescimento das células neoplásicas e sem afetar as células normais. Contudo, a maioria dos fármacos utilizados atualmente na quimioterapia causam danos no DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais, levando a morte das células de rápida divisão, causando os indesejáveis

efeitos colaterais associados. Tais efeitos decorrem da alta toxicidade dos quimioterápicos atuais, como por exemplo, a doxorrubicina, que é um antibiótico produzido por bactérias e amplamente utilizado contra diferentes tipos de câncer. A doxorrubicina atua em células tumorais intercalando o seu DNA, porém, este fármaco também apresenta um efeito cardiotoxico [7-9] degradando proteínas do citoesqueleto da célula cardíaca. Atualmente, técnicas quimioterápicas utilizadas não são capazes de erradicar todas as células neoplásicas do tumor, pois, apenas destroem uma parte das células que foram expostas ao tratamento [10].

O câncer é uma doença extremamente heterogênea, sendo que os tumores em diferentes tecidos apresentam características muito distintas envolvendo uma série de múltiplas alterações nas vias de sinalização como, por exemplo, vias de sinalização ligadas ao ciclo celular, fatores de crescimento, angiogênese e nas vias que controlam os processos de migração celular [11]. A transformação celular, ou seja, o processo no qual uma célula normal é transformada em uma célula maligna, acontece após uma série de mutações acumuladas, bem como após mudanças genéticas e epigenéticas que ativam oncogenes ou diminuem a expressão de moléculas supressoras tumorais ou ainda, levam a expansão clonal descontrolada [11]. Uma célula tumoral pode apresentar características como capacidade de migrar, invadir tecidos através da membrana basal e vasos sanguíneos, aumentar a sinalização para proliferação, proliferar sem limites, ignorar sinais inibitórios para proliferação, secretar fatores para promoção da angiogênese, entre outros [11, 12].

O processo de formação de metástases é também muito complexo e consiste de eventos inter-relacionados, que podem ser resumidos nos seguintes passos: (1) Após a malignização, o crescimento celular é progressivo e os nutrientes necessários para a expansão do tumor são fornecidos por difusão simples do microambiente local (2). Quando o tamanho do tumor excede 1-2 mm, inicia-se a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), com a síntese e secreção de fatores pró-angiogênicos (3). Ocorre invasão das células tumorais no tecido adjacente, através de diversos mecanismos. (4) As células tumorais entram na circulação sanguínea ou linfática. (5) A maioria das células é destruída na circulação, entretanto algumas sobrevivem e extravasam pelos capilares de órgãos distantes do sítio inicial. (6) A proliferação das células em tais órgãos completa o processo metastático, juntamente com a formação de novos vasos e a capacidade destas células de escapar do sistema de defesa do

hospedeiro [13, 14]. Neste sentido, compostos que atuam sobre estas vias em células tumorais representam, portanto alvos terapêuticos para a regressão tumoral podem ser de grande utilidade na terapia antitumoral (Figura 1).

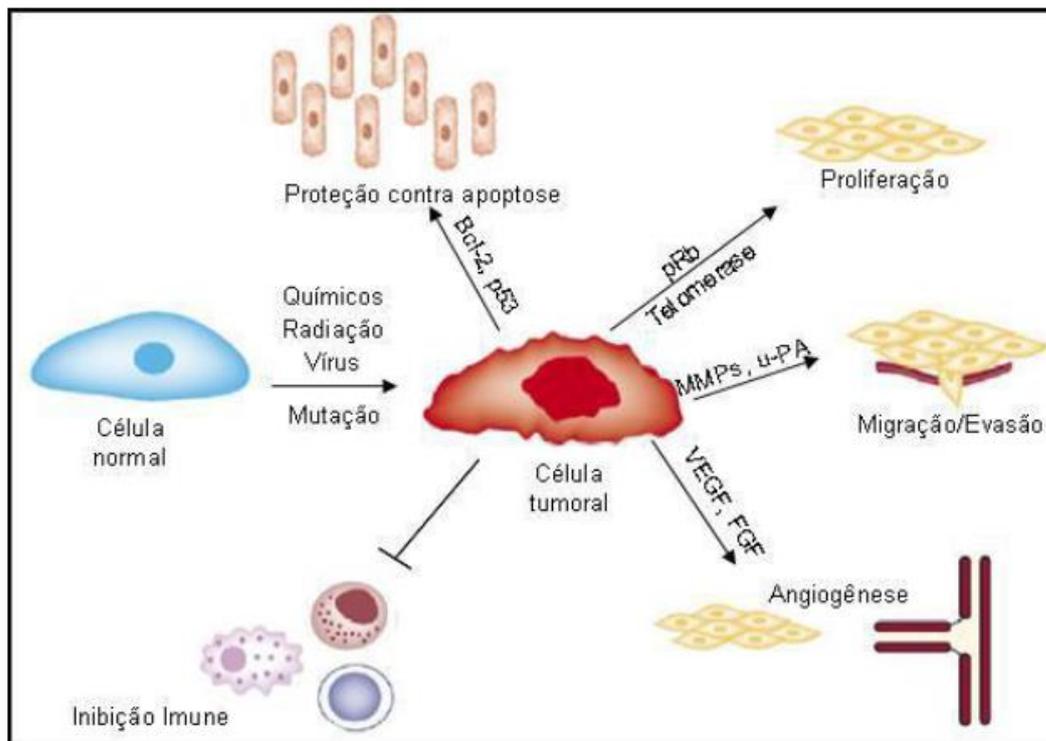


Figura 1. Alvos terapêuticos para regressão tumoral. Extraído e modificado de [12].

Outra razão para se desenvolver alternativas para tratamento de câncer é que alguns tipos de tumor, incluindo o câncer de mama, desenvolvem resistência à quimioterapia [15] por meio de alteração do metabolismo ou diminuição da captação da droga. Somado a isto, é importante ressaltar que existem três subtipos de tumor de mama: positivo para receptor de progesterona (PG-positivo) receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER-2-positivo) e o câncer de mama triplo negativo (TNBC) o qual não expressa receptores de progesterona, estrogênio e HER-2 [16], pelos quais agem os principais tratamentos quimioterápicos. O câncer de mama triplo negativo compreende a aproximadamente 15-20% de todos os casos de câncer de mama [17].

1.2. Produtos naturais com atividade antitumoral

A Natureza é uma fonte importante de agentes que podem servir de base para o desenvolvimento de novos medicamentos. Entre os anos de 1785 e 1928 o enorme impacto da descoberta de produtos de origem natural, tais como os cardiotônicos, extraídos a partir da planta *Digitalis purpurea*, o ácido salicílico, extraído da casca de plantas do gênero *Salix sp.*, a morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum*) e o antibiótico penicilina, extraído do fungo *Penicillium chrysogenum*, como fontes de novas drogas para o tratamento de diferentes doenças, corroboraram para o surgimento da indústria farmacêutica moderna. A partir de então as empresas farmacêuticas vêm desenvolvendo um número significativo de novos medicamentos eficazes no tratamento de uma variedade de doenças [18, 19].

Especificamente em relação ao desenvolvimento de novas drogas antitumorais derivadas de produtos naturais ou metabólitos bioativos de diferentes fontes, um grande esforço tem sido realizado por parte de diferentes laboratórios de centros de pesquisa mundiais. Cerca de 60% das drogas em fase de avaliação clínica para o tratamento de vários tipos de câncer são provenientes de produtos naturais ou seus derivados [20, 21]. De acordo com uma revisão feita entre os anos de 1981 até 2006, cem novas entidades químicas com atividades antitumorais foram introduzidas e destas, 63% representam produtos naturais ou compostos que de alguma forma são derivados de produtos naturais [22] (figura 2). Expresso em proporção a substâncias não-biológicas e vacinas, este valor aumenta para 77,8%, demonstrando a grande importância destas substâncias na área de descobrimento de novas drogas. Este estudo cita ainda a significativa expansão da exploração de fontes naturais na busca por novos compostos eficazes na terapia antitumoral e de uma variedade de outras doenças [22, 23].

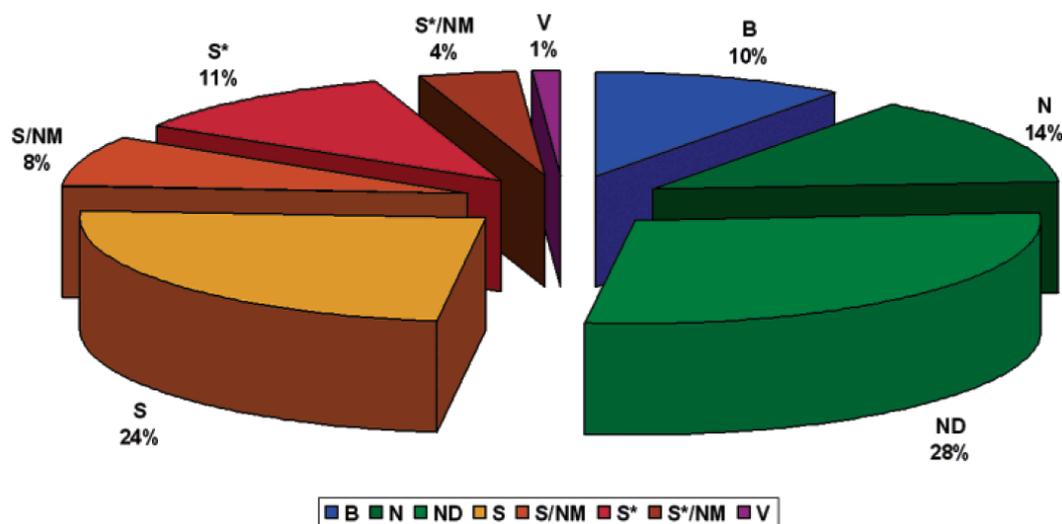


Figura 2: Novas entidades químicas desenvolvidas entre janeiro de 1981 e junho de 2006 por fonte (N=1184). ND, derivado de produtos naturais com modificação semissintética. S, droga totalmente sintética, sintetizada a partir de modificação de um agente já existente. N, produtos naturais. S*, totalmente sintética, porém, o farmacóforo foi ou é derivado de produto natural. B, biológico, normalmente peptídeos ou proteínas isolados de organismos ou linhagens celulares ou produzidos por meios biotecnológicos. NM, mimetiza produtos naturais. V, vacinas. *Extraído e modificado de [22].

1.3. Flavonoides com atividade antitumoral

Os flavonoides são compostos polifenólicos formados por seis grupos, Flavan-3-ols (flavonóis), flavononas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas, os quais são diferenciados dependendo de suas ligações químicas [24]. Devido a sua capacidade de se ligar grupos hidroxilas e carbonilas em seus três anéis, já foram identificados mais de 5.000 diferentes moléculas de flavonoides, sendo estas presentes em abundância principalmente em frutas, legumes, vegetais, nozes e castanhas, assim como em algumas bebidas como diferentes tipos de chá (folhas de ervas) e o vinho tinto [24, 25]. A quantidade de flavonoides presente nos alimentos pode variar entre quantidades elevadas como no vinho tinto, chás, soja e algumas nozes e castanhas, ou baixas quantidades como é o caso das cenouras e no cantalupo, uma espécie de melão (tabela 1).

Flavonoides são compostos que apresentam alta atividade antioxidante, antiviral, antialérgica, anti-inflamatória e antitumoral [24, 26, 27] assim como propriedades quelantes, ou seja, se ligam facilmente a metais como o cobre (Cu), zinco (Zn), cobalto (Co), níquel (Ni), manganês (Mn), ouro (Au) entre outros [28]. Estes complexos

metálicos têm demonstrado uma maior citotoxicidade em células tumorais *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais de câncer [29-31].

A naringenina pertence ao do grupo das flavononas e é encontrada em abundância em frutas cítricas principalmente na casca da laranja e teve sua atividade antitumoral testada *in vitro* e *in vivo* [32-37]. Sua atividade em diferentes tipos de células tumorais também foi testada isoladamente ou complexada com átomos de cobre, demonstrando que a naringenina é capaz de inibir a proliferação celular e esta atividade foi acentuada quando complexada ao cobre [33].

Tabela 1: Alimentos e suas quantidades de flavonoides por porção.

Alimento	mg/porção	Alimento	mg/porção
Chá preto		Maçã	
Flavan-3-ols	16,5 – 788,2	Flavan-3-ols	4,1 – 91,5
Flavonóis	3,54 – 59,0	Flavonóis	4,5 – 29,9
Chá verde		Laranja	
Flavan-3-ols	14,6 – 1283,8	Flavanonas	63,0 – 80,7
Flavonóis	11,8 – 14,2	Flavonóis	0 – 0,8
Vinho tinto		Tofú	
Flavan-3-ols	23,9 – 178,7	Isoflavonas	13,4 – 324,8
Antocianinas	3,5 – 114,8		
Flavonóis	3,0 – 23,1		
Amêndoas		Chocolate preto	
Flavan-3-ols	1,1 – 2,5	Flavan-3-ols	110,5 – 367,0
Flavonóis	0,5 – 1,5	Flavonóis	25
Nozes		Espinafre	
Flavan-3-ols	5,0	Flavonóis	33,6 – 288,4
Avelãs			
Flavan-3-ols	5,7		

Chá, 236,6 ml por porção. Vinho 156 ml por porção. Castanhas 30g por porção. Frutas 150g por porção. Vegetais 100g por porção

1.4. *Extraído e modificado de [24]Atividades terapêuticas do cobre

Em 1965, Barnett Rosenberg, ao pesquisar o efeito do campo elétrico no crescimento de bactérias [38] observou uma diminuição da proliferação das mesmas. Este efeito era causado pela presença de um composto que se formava devido uma reação *in situ* entre a platina presente no eletrodo utilizado e a amônia presente no meio de cultura. Tal composto foi descrito mais tarde por Rosenberg *et al.* como a cisplatina [38]. Após apresentar o mesmo efeito em células tumorais de camundongos, Sarcoma 180 [39], este foi o primeiro complexo metálico a ser utilizado no tratamento do câncer. Além da cisplatina, também são utilizados na quimioterapia a carboplatina e oxaliplatina [40, 41]. Desde então, há uma constante busca por metais ou complexos metálicos que possam ser utilizados como agentes quimioterápicos e que apresentem menores efeitos colaterais. Dentre tais compostos, já foram testados o rutênio (Ru), ferro (Fe) e cobalto (Co), cobre (Cu), prata (Ag) e ouro (Au) [16, 42-44]. Tais metais de transição têm demonstrado melhorar a atividade antitumoral de diversas substâncias.

O cobre que já foi utilizado para confecção de adagas, pontas de flechas e pelos egípcios para esterilizar a água [45] é também um metal essencial para diversas funções fisiológicas e pode ser facilmente encontrado na alimentação como em grãos, nozes, mariscos e fígado [46]. Este influencia a atividade de diversas enzimas como, ceruloplasmina, citocromo oxidase, tirosinase entre outras. Estas enzimas são essenciais para a respiração celular, defesa contra radicais livres, síntese de melanina, formação de tecido conectivo e metabolismo do ferro [46]. A deficiência de cobre no organismo pode causar doenças severas como neutropenia, anormalidades ósseas e está relacionada com a alta incidência de infecções e osteoporose [16]. Quando ligado em outras estruturas moleculares o cobre também aumenta a solubilidade em água e estabilidade da estrutura, previne a interação de amins com espécies não desejadas bloqueando ligações de hidrogênio [47]. Ullah e colaboradores demonstraram que o cobre quando ligado a alguns compostos como a genisteína pode induzir um aumento de EROS (espécies reativas de oxigênio) estimulando um efeito pró-oxidante podendo eventualmente induzir a apoptose em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231, MDA-MB-468 [48].

Estudos anteriores demonstraram que NGEN apresenta atividade citotóxica ou inibitória quando testada em diferentes linhagens celulares, como melanoma B16,

câncer de mama MCF-7, câncer de pâncreas asp-1 e hepatocelular [36, 37, 49-51]. O aumento dos efeitos antitumorais de complexos de Cu(II) com diferentes compostos também já estão bem estabelecidos na literatura [52-57] principalmente por possuírem potenciais redox biologicamente acessíveis e relativa afinidade nucleobase elevada [58]. Porém, poucos estudos demonstraram o efeito da complexação de NGEN com complexos metálicos como o Cu(II) em células tumorais [33, 59, 60].

Um único estudo apresentou os efeitos citotóxicos da NGEN complexada com Cu(II) em células tumorais [33]. Foi demonstrado neste trabalho que o Cu(II) complexado com NGEN apresentou efeito inibitório significativamente maior sobre células de carcinoma hepatocelular HepG2 do que quando comparado com NGEN. Os efeitos citotóxicos do Cu(II) complexado com NGEN em células de câncer cervical, HeLa e câncer gástrico SGC-7901 foram similares ao efeito de NGEN. Lee e colaboradores [61] testaram alguns derivados de NGEN em células de câncer de cólon RKO, o *7-O-benzyl naringenin* (KUF-1) e o *7-O-(m-metoxybenzyl) naringenin* (KUF-2) apresentaram um IC₅₀ respectivamente de 10 e 15µM e para a NGEN 150µM, ou seja, um aumento de 10 vezes na capacidade de inibir o crescimento tumoral de células RKO. No presente estudo a NGEN foi capaz de inibir a proliferação de células tumorais de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 apresentando um IC₅₀ de 342,4µM, enquanto a NGEN complexada com Cu(II) e Bipy (NGENCuB) também foi capaz de aumentar sua atividade antitumoral em aproximadamente 10 vezes, com IC₅₀ de 32,76µM.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.4. Objetivo geral

A- Avaliar e comparar o efeito da complexação da naringenina com cobre e 2,2'-bipiridina sobre diferentes atividades em células de tumor de mama triplo negativo da linhagem MDA-MB-231.

2.5. Objetivos específicos

A- Avaliar e comparar o efeito citotóxico e citostático da naringenina e da naringenina complexada com o Cu(II) e a 2,2'-bipiridina na linhagem MDA-MB-231 através de ensaios de morfologia celular, formação de colônias e de viabilidade celular.

B- Identificar alguns dos mecanismos biológicos envolvidos na atividade antiproliferativa dos compostos estudados através de ensaios de migração celular e atividade de MMPs, bem como através de estudos dos mecanismos apoptóticos, por meio de fragmentação de DNA, citometria de fluxo e PCR em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Compostos

Os produtos naturais utilizados neste estudo são derivados de flavonoides extraídos da laranja e ligados a complexos metálicos. Estes compostos foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Naturais, coordenado pelo Prof. Dr. João Batista Fernandes, do Departamento de Química da UFSCar (DQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e foram sintetizados pelo aluno Dr. André Sarria. O flavonóide, a Bipy e o CuCl_2 (cloreto de cobre) utilizados para a semi-síntese do composto foram adquiridos através da empresa *Sigma-Aldrich*. Os compostos em questão foram a naringenina (NGEN) e a naringenina complexada com Cu(II) e 2,2'-bipiridina (NGENCuB), a fórmula da reação está representada na figura 3.

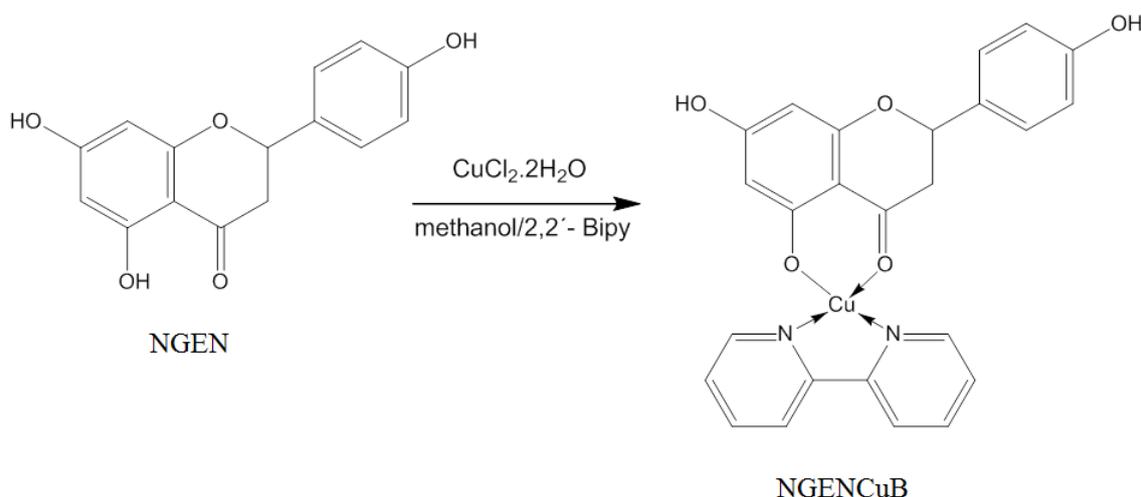


Figura 3: Estrutura da molécula de naringenina (NGEN) e da molécula da naringenina complexada com cobre II e a bipiridina (NGENCuB).

3.2. Cultura celular

Para este estudo foram utilizadas células da linhagem MDA-MB-231 de câncer de mama que foram obtidas do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti e cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2 com temperatura constante de 37°C para serem utilizadas nos experimentos ou para cultivo. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização, que ocorre por incubação

com 2 ml de solução de tripsina (0,1% em PBS) em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Foi adicionado 2 ml de meio de cultura completo para parar a reação e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio de cultura e utilizadas com a finalidade desejada.

3.3. Citotoxicidade e proliferação celular – medida pelo método do MTT

A citotoxicidade e o efeito dos produtos utilizados neste estudo sobre a proliferação celular foram determinados através do uso do reagente MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] conforme descrito anteriormente [62]. Para tal, as células foram preparadas na concentração de 5×10^4 células/200µl em meio DMEM adicionado de 10% de FBS e plaqueadas em placas de 96 poços estéreis (Corning), após seis horas, período necessário para a adesão das células no fundo dos poços, o meio de cultura com FBS foi retirado e no lugar adicionou-se meio de cultura sem FBS (*starvation*). As células foram mantidas em estufa durante um intervalo de 14 horas para que todas as células estivessem com seu ciclo celular sincronizado. Ao final do *starvation*, o meio de cultura foi retirado dos poços e adicionado meio novo com as concentrações de 1,9 - 1000µM de NGEN, NGENCuB, Bipy e CuCl₂ em meio completo (com a presença de FBS). As células foram incubadas por 48h nas mesmas condições descritas acima e a medida da proliferação celular foi realizada em comparação ao controle, poços onde somente meio com FBS foi adicionado. Após o tempo de incubação, o meio de cultura de cada poço foi removido e uma solução contendo MTT (2,5mg/ml) foi adicionada (50µl/poço). As placas permaneceram durante 4h em estufa a 37°C e em seguida, os cristais formados foram diluídos em isopropanol. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placa de ELISA (Labtech LT4000) em comprimento de onda de 540nm. Como controle positivo destes ensaios foi utilizado a doxorrubicina, uma molécula com atividade antibiótica e antitumoral.

3.4. Formação de Colônias

As células MDA-MB-231 (3×10^2) foram semeadas em placas de 60mm. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e adicionou-se meio completo com 1, 10 e 100µM de NGEN, NGENCuB, Bipy e CuCl₂. As células foram mantidas em estufa a

37°C e 5% CO₂ por 48h. Decorrido o tempo de incubação, o meio foi removido e as células foram gentilmente lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado DMEM contendo FBS a 10% e as placas foram incubadas por mais 10 dias em estufa a 37°C e 5% CO₂. No décimo dia, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução metanol e ácido acético (3:1) durante cinco minutos e em seguida, coradas com uma solução de metanol e cristal violeta a 5%.

As colônias foram contadas e seu tamanho foi medido com auxílio do *software* ImageJ, a eficiência de plaqueamento foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$EP = \frac{\text{no. de colônias formadas}}{\text{no. de células semeadas}} \times (100)$$

3.5. Morfologia Celular

Para analisar a alteração morfológica causada nas células pelos compostos, as células (5×10^4) foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas por 24h. No segundo dia foi adicionado meio de cultura completo contendo o produto natural nas concentrações de 1, 10 e 100µM de NGEN e NGENCuB. Para análise da morfologia celular, fotos em 24, 48 e 72h foram tiradas como auxílio de uma câmera (Moticam, 1000-S) acoplada ao microscópio (Nikon, T5100).

3.6. Migração celular

3.6.1. *Wound Healing*

Os ensaios de migração celular foram realizados como descrito anteriormente [63]. Monocamadas confluentes de células tumorais e normais foram crescidas em placas de 6 poços e em seguida, uma abertura retangular foi realizada na porção central de cada poço, com auxílio de uma ponteira estéril formando uma ferida. Os restos celulares e as células desaderidas foram lavadas com PBS e incubadas com meio de cultura com FBS a 10% e NGEN ou NGENCuB nas concentrações de 1, 10 e 100µM e controle (somente DMEM contendo FBS 10%). Imediatamente após serem aplicadas as concentrações de cada composto, foram registradas duas imagens da ferida em cada

poço com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio. As placas retornaram a estufa e foram incubadas a 37°C e 5% CO₂. As imagens foram registradas no tempo zero e após 6, 12, 24 e 48h de incubação. Para garantir a fidedignidade do experimento, todas as imagens foram registradas no mesmo local, para isto foram feitas marcações na parte externa de cada poço. A distância média da área interna até a região externa da região raspada foi determinada como a % de fechamento, quantificada em dois diferentes pontos por poço, com o auxílio do *software* Image J e calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

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

3.6.2. Determinação da atividade de MMPs

A atividade das MMPs (metaloproteinases de matriz) foi medida através de ensaio de zimografia. Um ensaio de migração celular foi realizado como descrito acima, porém as células foram incubadas por 24h em meio sem soro nas concentrações de 1, 10 e 100µM de NGEN e NGENCuB. Após 24h o sobrenadante foi removido e centrifugado a 1200rpm para a remoção de possíveis células ou restos celulares. Com auxílio do kit BCA[®] (Thermo) foi realizada a quantificação proteica para que a mesma quantidade de proteína pudesse ser aplicada em gel de SDS-PAGE 10%. Em cada poço foi adicionado 8µg de proteína. A corrida de eletroforese foi realizada a 75mV em cuba de eletroforese (BioRad) na geladeira. Ao fim da corrida o gel foi lavado duas vezes por 20 minutos em solução de lavagem contendo 2,5% triton-x e em seguida incubado por 22h em tampão de incubação. Após a incubação o gel foi corado com *comassie blue* e em seguida utilizou-se solução descorante para visualização das bandas. Uma imagem do gel foi registrada com o auxílio do aparelho Chemidoc (BioRad) e a quantificação das bandas foi realizada com o *software* Image J.

3.7. Apoptose

3.7.1. Citometria de Fluxo

A atividade apoptótica dos compostos foi analisada através de citometria de fluxo, com a utilização do kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences) conforme instruções do fabricante. As células em cultura (1×10^5) foram tratadas com 1, 10 e $100 \mu\text{M}$ de NGEN ou NGENCuB por 48h, centrifugadas a 1000rpm por 5min, lavadas com PBS e ressuspensas em $100 \mu\text{L}$ de tampão de ligação, proveniente do kit. As células foram incubadas com $5 \mu\text{L}$ de PE Anexina V e $5 \mu\text{L}$ de 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), por 15min protegidas da luz e em seguida adicionadas a tubos específicos para citometria contendo tampão de ligação. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) e a fluorescência emitida por cada corante foi quantificada através do *software BD CSamplertm* (BD Biosciences).

3.7.2. Análise da morfologia nuclear

Células MDA-MB-231 foram semeadas na concentração de 1×10^5 /poço em placas de 12 poços sobre uma lamínula circular de 15mm e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 durante 24h. No dia seguinte, as células foram tratadas com 1, 10 e $100 \mu\text{M}$ de NGEN e NGENCuB e incubadas novamente por 24h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol e então coradas com 30nM DAPI (*Life Technologies*) em meio DMEM sem FBS por 10 min. As lâminas foram preparadas e as imagens foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics), acoplado com um microscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation), com os filtros apropriados.

3.8. Análise de expressão gênica

Para verificar a expressão de genes relacionados a apoptose, através de PCR em tempo real, as células tumorais (1×10^6) foram semeadas em placas de 60mm e então tratadas com 1, 10 e $100 \mu\text{M}$ de NGEN e NGENCuB por 48h. Após este período, as células foram lisadas com Trizol® (Invitrogen) e o RNA total das células foi isolado, como descrito pelo fabricante. Em seguida, o RNA das amostras foi quantificado no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific) e a integridade das mesmas foram

verificadas em gel de agarose-formaldeído 1% corado com brometo de etídeo. As amostras de RNA foram então tratadas com DNase (Promega) para eliminar qualquer DNA contaminante. O RNA total (2µg) foi reversamente transcrito em cDNA utilizando-se o kit Enhanced Avian First Strand Synthesis (Sigma Aldrich). O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso. A reação de PCR em tempo real foi realizada seguindo instruções do kit Sybr Green (Sigma Aldrich). Os *primers* utilizados para amplificação dos genes relacionados a apoptose estão descritos na tabela 2:

Tabela 2: Sequência de primers utilizados para o ensaio PCR em tempo real.

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse
Caspase-8	GGATGAGGCTGACTTTCTG	CTGGCAAAGTGACTGGAT G
Caspase-9	GCCTCAATGCCAGTAACG	GTTGTCAGGCGAGGAAAG
Bcl-2	CGGGATTACAGAGTATTTG	GGCTGGGCACATTTACTG

3.9. Análise estatística

Cada experimento foi repetido três vezes em triplicata e o desvio padrão calculado. Teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Os resultados foram comparados estatisticamente utilizando ANOVA. Quando houve diferença significativa no teste ANOVA (valor de $P < 0,05$), foi realizado o pós-teste de Tukey para determinar diferenças entre as amostras. Os dados foram analisados com o auxílio do *software* de estatística Graphpad (versão 6.0; GraphPad software).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia Celular

Os resultados obtidos mostram que a NGEN nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M não alterou a morfologia das células MDA-MB-231 nos tempos de 24, 48 e 72h (figura 3) quando comparadas com as células não tratadas (controle). Por outro lado, quando NGENCuB na concentração de 100 μ M foi incubado por 72 horas com as células MDA-MB-231, pode-se observar grandes alterações morfológicas com o surgimento de células em um formato circular, indicando possível morte celular (Figura 3). Também é possível observar que a incubação das células com 100 μ M de NGENCuB resulta em um número menor de células após 48 e 72h de incubação, quando comparado com o controle nos mesmos tempos. Estes resultados demonstram que NGENCuB é capaz de alterar a morfologia celular de maneira mais efetiva comparado com a NGEN e com células controle não tratadas.

4.2. Formação de colônias

Os efeitos do NGEN e NGENCuB sobre a capacidade de inibir a formação (Figura 4) e o tamanho e número de colônias (Figura 5A, B) foram analisados. NGENCuB nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M inibiu significativamente tanto o número (Figura 5A), como o tamanho (Figura 5B) das colônias de células MDA-MB-231, quando comparado com o controle formado por células não tratadas ou com células tratadas com NGEN. A eficiência de plaqueamento foi calculada para NGEN e NGENCuB e a partir dos resultados observa-se que NGENCuB diminuiu significativamente a eficiência de plaqueamento nas concentrações de 10 e 100 μ M quando comparado com o controle e células tratadas com NGEN (Figura 5C). Para investigar se esta maior atividade observada em NGENCuB em células MDA-MB-231 poderia estar ocorrendo devido somente a presença do Cu(II) o mesmo ensaio foi realizado com CuCl₂ e Bipy nas mesmas concentrações de 1, 10 e 100 μ M. Através da análise dos resultados é possível concluir que o CuCl₂ não teve efeito no número de colônias e tão pouco no tamanho destas (dados não apresentados), já a bipyridina apresentou uma inibição da formação de colônias a partir de 10 μ M (dados não apresentados).

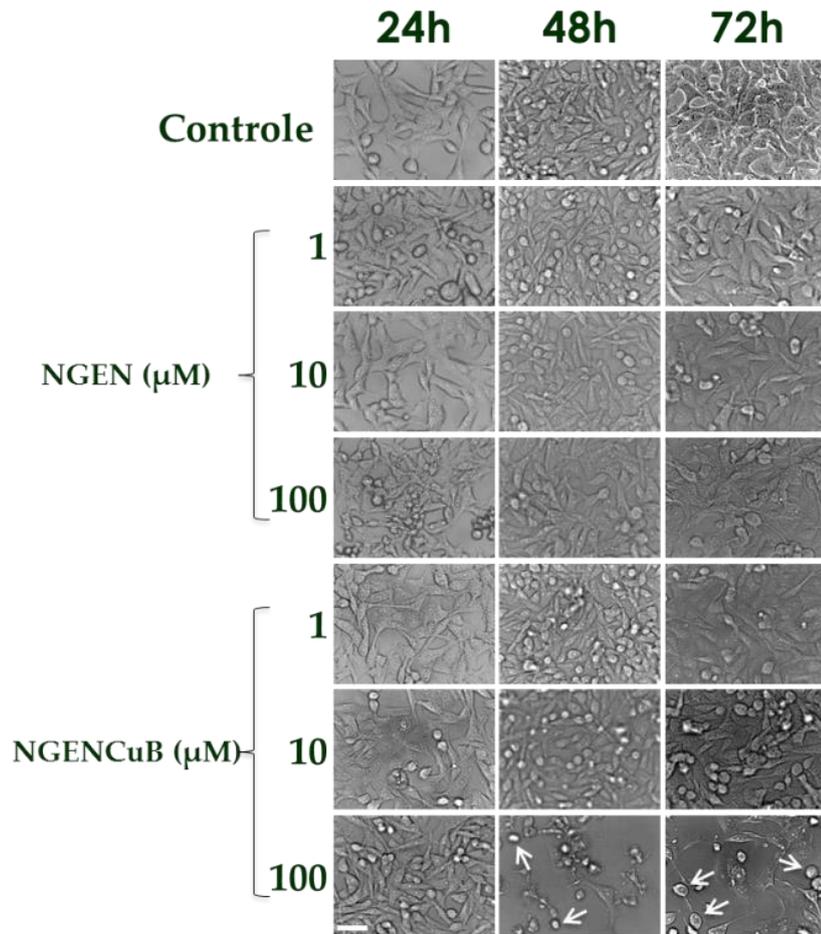


Figura 4: Morfologia das células MDA-MB-231. As células foram tratadas com 1, 10 e 100μM de NGEN ou NGENCuB por 72h, e nos tempos de 24, 48 e 72h foram registradas imagens de cada poço para análise visual. As setas brancas indicam células desaderidas.

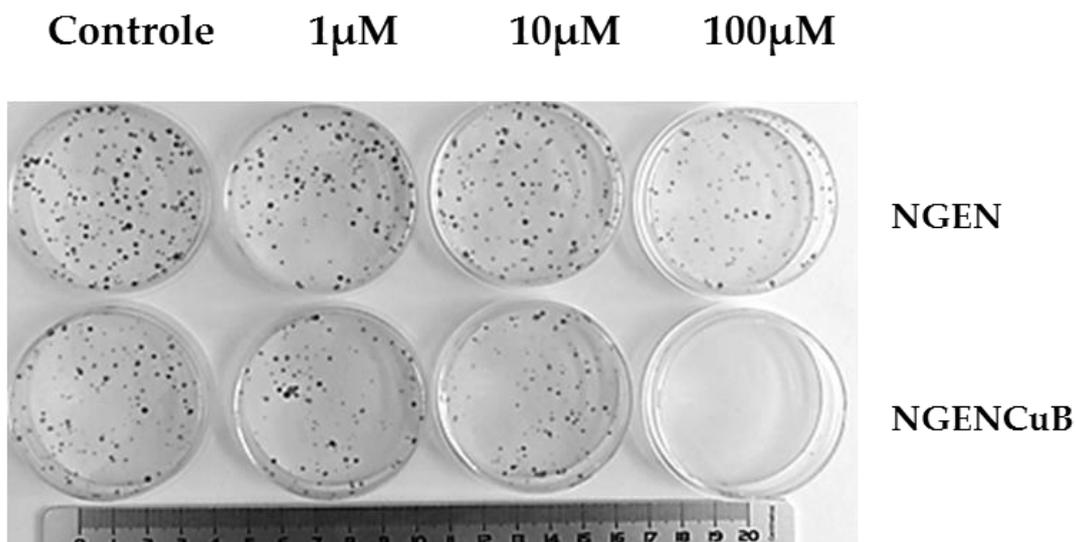


Figura 5: Efeito da NGEN e NGENCuB na formação de colônias de células MDA-MB-231. As células foram incubadas por 48h com NGEN ou NGENCuB, após foi removido o meio de cultura e adicionado meio completo e as células ficaram incubadas por 10 dias. Após incubação as células foram coradas e o número de colônias e o tamanho das colônias foi mensurado.

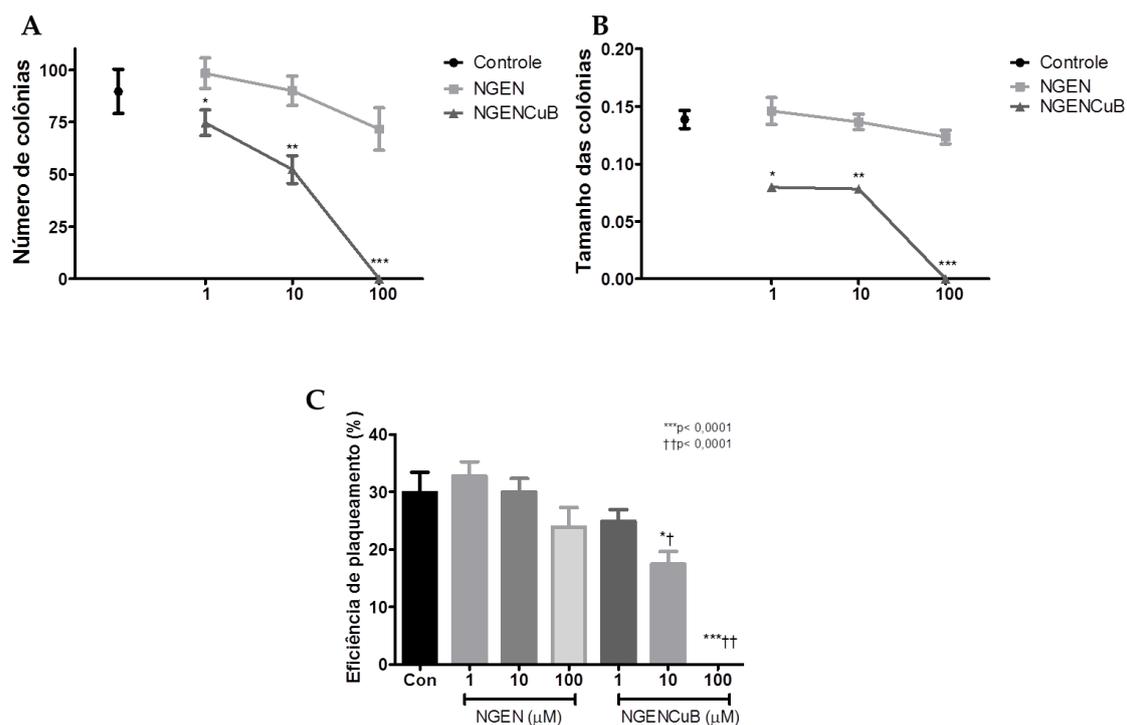


Figura 6: Efeito da NGEN e NGENCuB sobre o número, tamanho e eficiência de plaqueamento das células MDA-MB-231. A – Número das colônias. B – Tamanho das colônias. C – Eficiência de plaqueamento. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (comparado ao controle), † $p < 0,0001$ (comprado a NGEN 10 μ M) e †† $p < 0,0001$ (comparado a NGEN 100 μ M).

4.3. Viabilidade Celular

Para investigar os efeitos de NGEN e NGENCuB sobre a viabilidade das células MDA-MB-231 foi realizado um ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (Figura 6). Os resultados mostram que NGEN inibe aproximadamente 60% da viabilidade celular nas concentrações de 500 e 1000 μ M quando comparadas ao controle, o qual foi considerado como 100% de viabilidade celular. Nestas mesmas concentrações, NGENCuB inibiu aproximadamente 70% da viabilidade das células MDA-MB-231. NGENCuB também apresentou efeitos em concentrações mais baixas, sendo que em apenas 30 μ M este composto já inibiu aproximadamente 50% da viabilidade das células MDA-MB-231, o que foi significativamente diferente do controle. Novamente, para garantir que estes efeitos não foram causados somente pela molécula de Cu(II) ou pela Bipy, foram realizados ensaios de viabilidade celular com CuCl₂ e 2-2'-bipiridina. Os resultados demonstraram que o CuCl₂ não foi capaz de causar 50% de inibição da proliferação mesmo na concentração de 1000 μ M já a Bipy apresentou um IC₅₀ de 142,7 μ M. Com análise destes resultados pode-se concluir que a complexação da naringenina com Cu(II) e a Bipy melhorou sua atividade antitumoral em aproximadamente dez vezes tendo em vista o IC₅₀ calculado que foi de 342,4 e 32,76 μ M para NGEN e NGENCuB, respectivamente.

4.4. Migração Celular

4.4.1. *Wound healing*

Para analisar os efeitos da NGEN e NGENCuB sobre a migração celular, um ensaio de *wound healing* foi realizado (Figura 7). Os resultados permitem observar que após 6 horas de incubação NGENCuB já é capaz de inibir a migração celular nas concentrações de 10 (figura 8A) e 100 μ M (Figura 8B), aumentando o grau de significância em 12, 24 e 48h de incubação. A NGEN também foi capaz de inibir a migração celular, porém, somente a partir de 24h de incubação na concentração de 100 μ M (figura 8A) e 48h na concentração de 10 μ M (Figura 8B).

Figura 7: Ensaio de viabilidade celular. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços, após 24h, foi adicionado meio de cultura contendo 1 a 1000 μ M de NGEN ou NGENCuB. Após período de incubação de 48h a viabilidade celular foi medida através método MTT e absorbância medida em 540nm. **p<0,05, *p<0,01 e ***p<0,001, (Comparado ao controle FBS+).

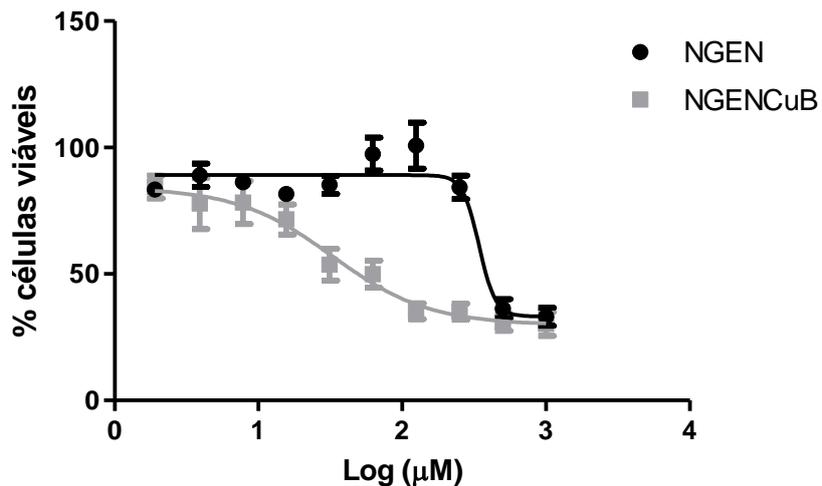


Figura 8: As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços, após 24h, foi adicionado meio de cultura contendo 1 a 1000 μM de NGEN ou NGENCuB. Após período de incubação de 48h a viabilidade celular foi medida através método MTT e absorbância medida em 540nm. Após leitura da absorbância, o valor do IC_{50} foi calculado com auxílio do programa prisma GraphPad.

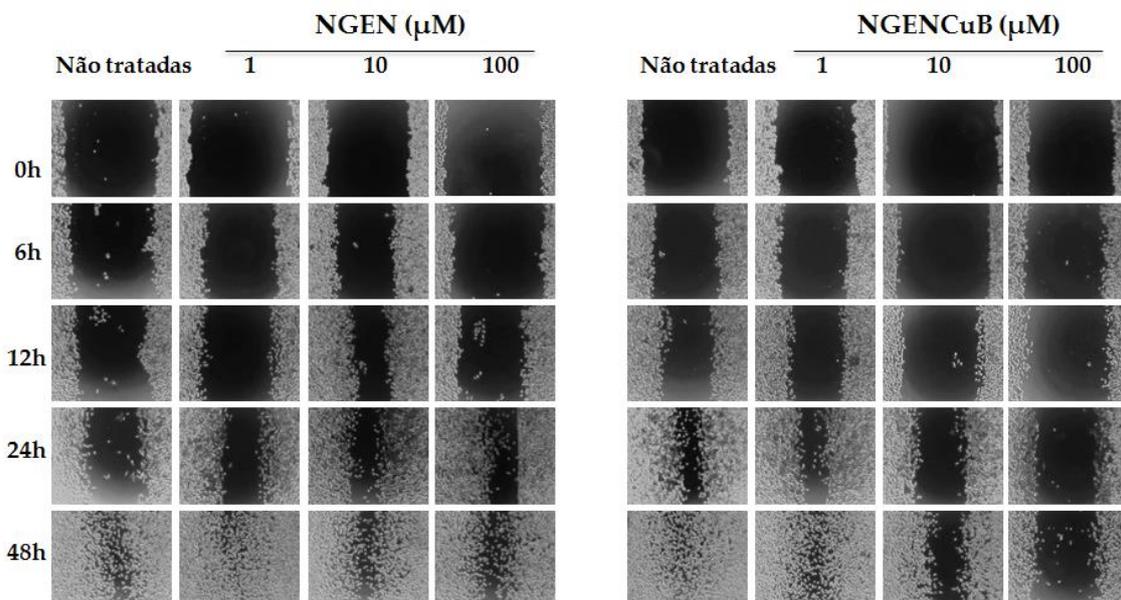


Figura 9: Migração *wound healing*. Após as células atingirem 100% de confluência, foi feita uma risca através da remoção das células do centro de cada poço. As células foram então tratadas com 1, 10 e 100 μM de NGEN ou NGENCuB por 48h. Imagens foram registradas em 0, 6, 12, 24 e 48h. A área da ferida foi medida com auxílio do programa Image J.

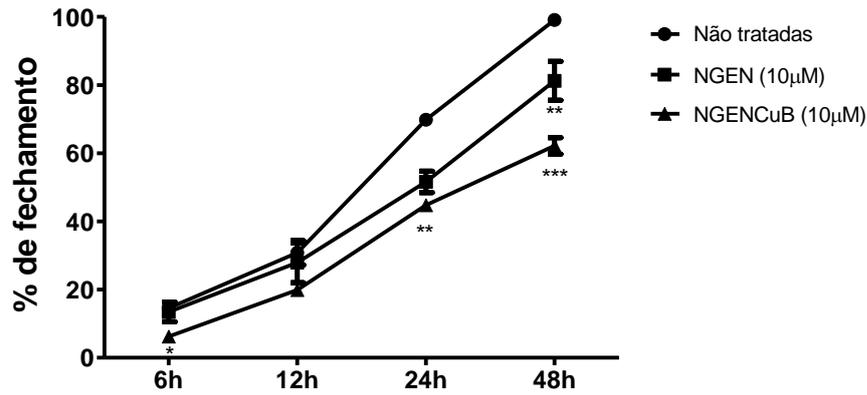


Figura 10: Análise quantitativa do ensaio de migração *wound healing*. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (comparado ao controle, células não tratadas).

4.4.2. Migração celular

A capacidade de NGENCuB interferir na migração celular também foi investigada utilizando insertos para migração, onde as células foram incubadas nas mesmas concentrações e condições descritas acima por 22h. Observa-se pelos resultados que as concentrações de 10 e 100µM de NGENCuB inibiram a migração das células MDA-MB-231 (figura 9).

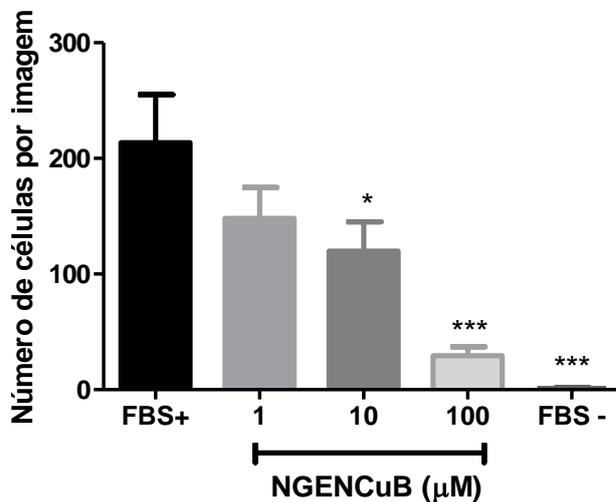
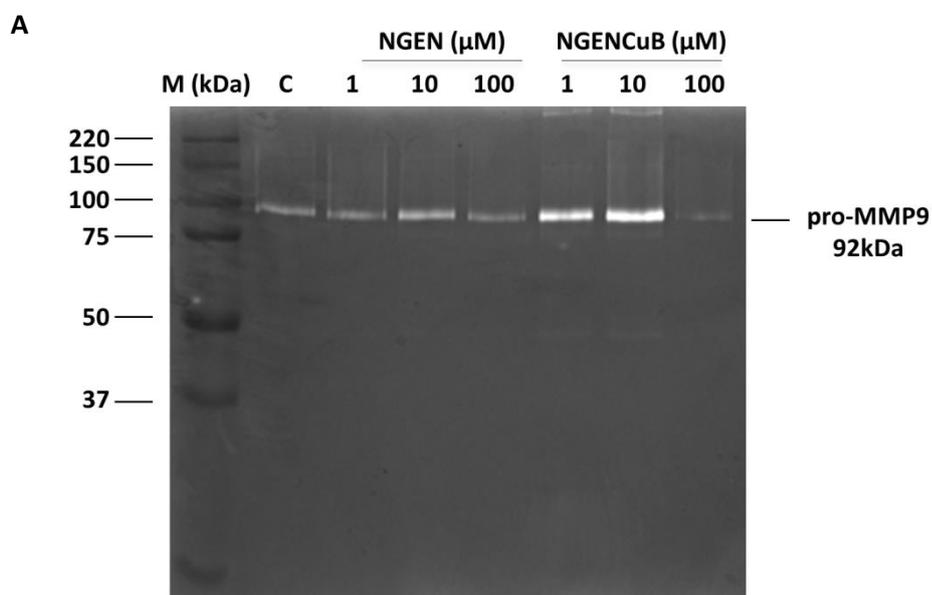


Figura 11: Efeitos da NGENCuB sobre a migração das células MDA-MB-231. As células foram plaqueadas em inserto *trans-well* e incubadas por 22h*. As células que migraram foram fixadas e coradas após, foram registradas 5 imagens de cada membrana e o número de células foi contado. * $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ (comparado ao controle FBS+).

4.5. Determinação da atividade de MMPs

A invasão de células tumorais pela membrana basal para atingir a circulação ou estabelecer o sítio secundário na metástase é mediada por metaloproteinasas de matriz, MMP2 e 9 [64]. Os efeitos causados pela incubação de células MDA-MB-231 com NGEN e NGENCuB sobre a atividade das MMPs 2 e 9 foram investigados através de zimografia em gel de eletroforese contendo gelatina (Figura 10). Para tal, foi utilizado o sobrenadante do ensaio de *wound healing*, realizado em meio sem soro. Os resultados indicam que a incubação das células MDA-MB-231 com 1 e 100 μ M de NGEN não alteraram significativamente a atividade desta MMP. Por outro lado, NGENCuB foi capaz de inibir a atividade da pró-MMP9 na concentração de 100 μ M, quando comparado a atividade das células controle não tratadas. Surpreendentemente, a incubação das células tumorais com 10 μ M de NGEN e NGENCuB resultou em um aumento da atividade da pró-MMP9 de maneira significativa. Apesar de o ensaio de zimografia com gelatina ser muito útil para avaliar a atividade de da MMP2 (gelatinase A) e MMP9 (gelatinase B), ambas com potente capacidade de degradar gelatina [65], células MDA-MB-231 não expressam MMP2 [66, 67]. Dessa maneira o trabalho apresenta somente os efeitos de NGEN e NGENCuB sobre a atividade da pró-MMP9.



B

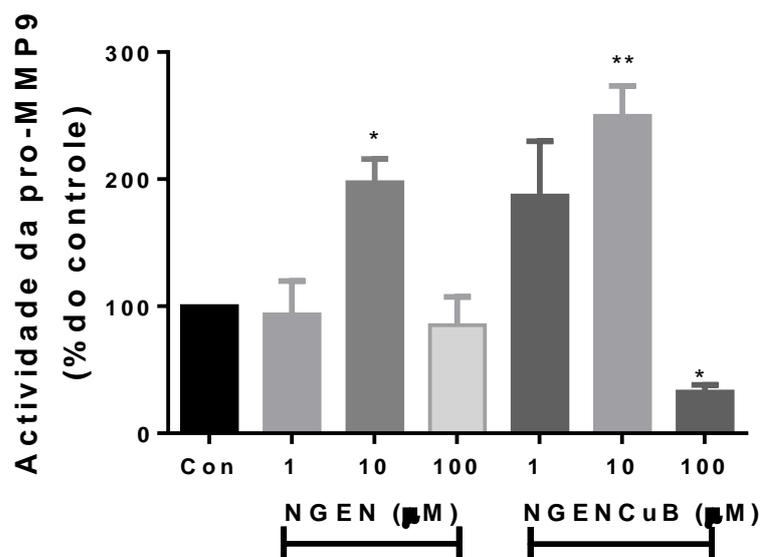


Figura 12: Efeitos da NGEN e NGENCuB sobre a atividade da pró-MMP9. Após as células atingirem 100% de confluência, foi feita uma risca através da remoção das células de cada poço. As células foram então tratadas com 1, 10 e 100 μM de NGEN ou NGENCuB por 48h, o sobrenadante foi removido e realizada a quantificação proteica. Após, uma corrida em gel de eletroforese foi realizada e em seguida o gel foi incubado em tampão de ativação por 20h. O gel foi corado para visualização das bandas e estas foram quantificadas com auxílio do programa ImageJ. * $p < 0,02$ ** $p < 0,0002$ (comparado ao controle, células não tratadas)

4.6. Análise da morfologia nuclear

Um dos marcos da apoptose é a fragmentação do DNA nuclear. Para investigar os efeitos da NGEN e NGENCuB sobre a fragmentação do DNA, foi utilizado o corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) que permeia a membrana celular e nuclear e tem forte ligação com os sítios AT do DNA (Figura 10). Ao ser excitado em um comprimento de onda de 358nm (ultravioleta) o DAPI passa a emitir fluorescência captada em 461nm (azul), o que permite que a condição do núcleo seja analisada. Os resultados indicam que 100 μM de NGENCuB induz a formação de corpos apoptóticos de maneira mais intensa quando comparado com células incubadas com NGEN ou com células do controle (Figura 10).

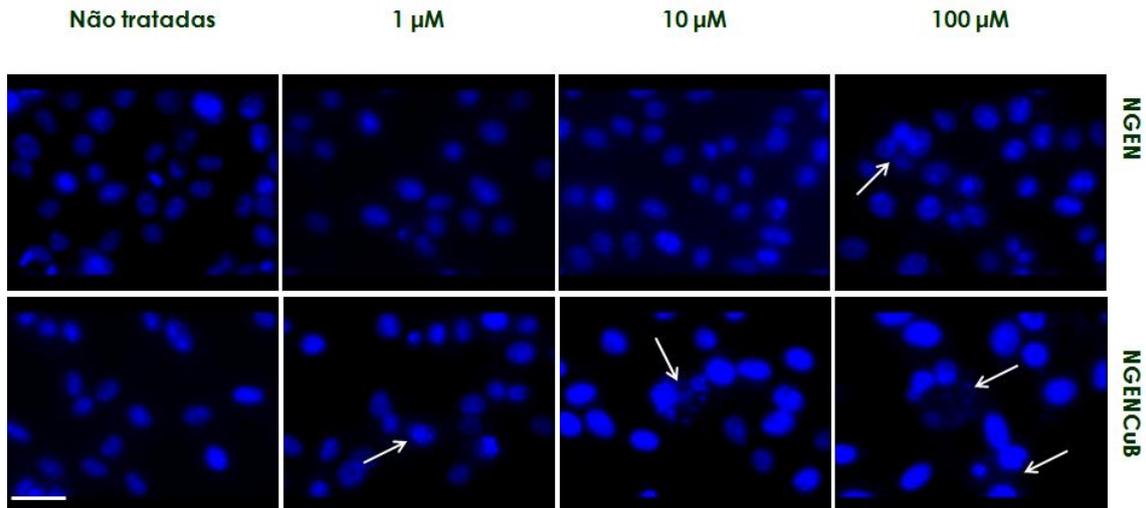


Figura 13: Efeitos da NGEN e NGENCuB na fragmentação de DNA nuclear em células MDA-MB-231 através de colocação com DAPI. As células foram incubadas por 24h com 1, 10 e 100 μ M de NGEN ou NGENCuB após, foi adicionado DAPI e realizada a leitura em microscópio de fluorescência com aumento de 100x. As setas brancas indicam a presença de corpos apoptóticos.

4.7. Citometria de fluxo

Para confirmar os resultados observados no ensaio com DAPI, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo, utilizando PE anexina-V e 7-AAD (Figura 11). A anexina é um composto fluorescente que se liga a fosfatidilserina, externalizada na membrana celular como forma de sinalizar apoptose célula. O 7-AAD é um fluoróforo que se liga ao DNA somente quando a membrana da célula está comprometida. Os resultados mostram que o número de células mortas por apoptose aumenta conforme a concentração em ambos os compostos NGEN e NGENCuB, contudo quando comparados nas mesmas concentrações 10 e 100 μ M a NGENCuB mostrou ser estatisticamente mais ativa que NGEN, induzindo um maior número de células a apoptose (Figura 12).

4.8. Análise da expressão gênica

Neste ensaio, foi analisada a expressão de três genes após a incubação da NGEN e NGENCuB com as células MDA-MB-231. Dois destes genes codificam para proteínas pró-apoptóticas (Caspase8 e Caspase9) e um gene codifica para a proteína anti-apoptótica (Bcl-2). Os resultados indicam que a NGEN não alterou significativamente a expressão de nenhum destes genes quando comparado ao controle.

Contudo, NGENCuB na concentração de $1\mu\text{M}$, aumentou a expressão de caspase 8 e caspase 9 sem alterar a expressão de Bcl-2 (figura 12) nas células tumorais. Ao observar a figura 12, nota-se que NGENCuB na concentração de $10\mu\text{M}$ também aumentou de forma significativa a expressão das caspases 8 e 9, porém, de forma intrigante também causou o aumento na expressão de Bcl-2. NGEN e NGENCuB nas concentrações de $100\mu\text{M}$ não foram capazes de induzir uma maior expressão de caspases 8 e 9 ou reduzir significativamente a expressão de Bcl-2.

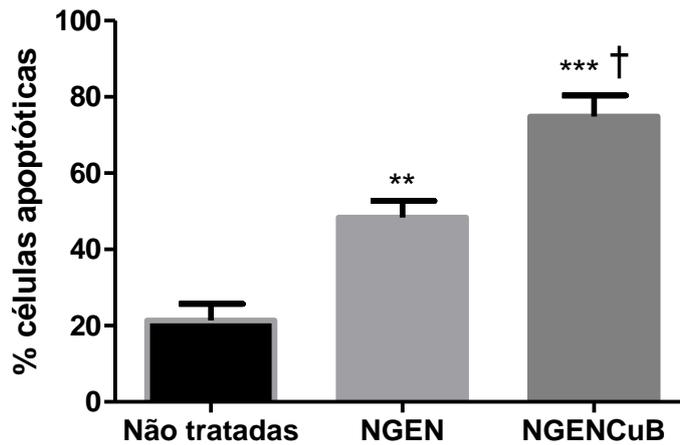


Figura 14: Porcentagem de células apoptóticas. Células incubadas com $100\mu\text{M}$ de NGEN ou NGENCuB. ***† $p < 0,0001$ (comparado ao controle e NGEN, respectivamente) ** $p < 0,001$ (comparado ao controle).

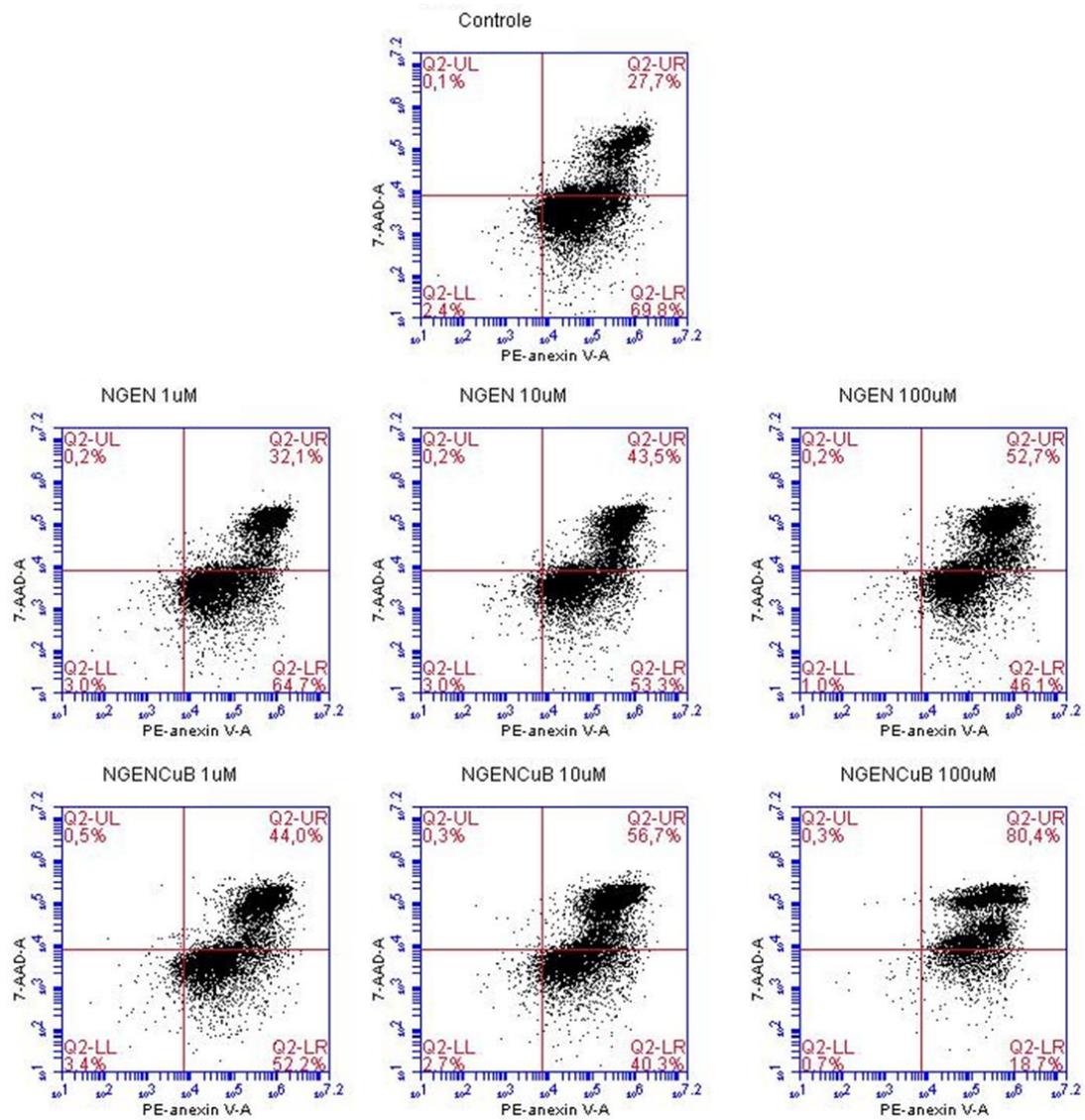


Figura 15: Efeitos da NGEN e NGENCuB na indução da apoptose tardia, analisados por citometria de fluxo. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1, 10 e 100 μ M de NGEN ou NGENCuB por 48h. Após foi adicionado PE e 7-AAD e a fluorescência foi medida em citômetro de fluxo.

Figura 16: Efeitos da NGEN e NGENCuB na expressão gênica de células MDA-MB-231. As células foram incubadas com 1, 10 e 100 μ M de NGEN ou NGENCuB por 48h, o RNA foi extraído com Trizol e o PCR em tempo real foi realizado utilizando o kit Sybr green. A – Aumento da expressão da caspase 8 nas concentrações de 1 e 10 μ M de NGENCuB. B – Aumento da expressão de caspase 9 nas concentrações de 1 e 10 μ M de NGENCuB. C – Aumento da expressão de Bcl-2 na concentração de 10 μ M de NGENCuB. **p<0,001 (comparado ao controle).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho é inédito ao apresentar os efeitos da NGEN complexada com Cu(II) e Bipy sobre migração celular, atividade de MMPs e apoptose, pois até o momento não foram encontrados trabalhos que descrevam tais efeitos.

Pelo que é de nosso conhecimento, há poucos estudos sobre os efeitos citotóxicos da NGEN complexados com Cu(II) em células tumorais. Tais estudos demonstraram que o Cu(II) complexado NGEN apresentou uma inibição da proliferação de células de carcinoma hepatocelular HepG2 quando comparado a NGEN [33]. Lee e colegas [55] estudaram os efeitos dos derivados NGEN em células de carcinoma colorrectal RKO. Entre os derivados 7-O-benzil-naringenina (KUF-1) e 7-O-(*m*-metoxybenzyl) (KUF-2) da naringenina apresentaram IC₅₀ de 10 e 15 μM, respectivamente, ao passo que NGEN sem qualquer modificação apresentou IC₅₀ superior a 150 μM. Parker e colaboradores analisaram os efeitos de NGEN sobre a proliferação de células de leucemia THP-1 e verificaram uma inibição do crescimento celular de um modo dependente da concentração, a partir de 200 μM [56]. Em células de leucemia humana U937 o tratamento com 50-500 μM NGEN inibiu a proliferação em 5% -80% [57]. Finalmente, no carcinoma hepatocelular humano da linhagem HepG2, NGEN inibiu a proliferação celular de um modo dependente da concentração com a IC₅₀ de 100 μM [58]. Neste trabalho, demonstramos que a NGEN inibiu a proliferação das células da linhagem MDA-MB-231 com IC₅₀ de 342,4 μM, no entanto, a complexação com Cu(II) melhorou o efeito em cerca de dez vezes, diminuindo o valor IC₅₀ para 32,76 μM.

Jin e colaboradores mostraram, através de coloração com DAPI, que a NGEN na concentração de 500 μM induziu a apoptose em células de leucemia humana da linhagem U937 [68]. Enquanto em nosso estudo a NGEN induziu células MDA-MB-231 a entrarem em apoptose na concentração de 100 μM, a NGENCuB apresentou o mesmo efeito na concentração de 10 μM, evidenciando que a complexação da NGEN causou um aumento na atividade antitumoral.

Alguns estudos relataram que a NGEN possui atividade antioxidante e efeito protetor do DNA [69, 70]. Em um estudo coordenado por Cavia-Saiz *et al.* [70] os resultados demonstraram que a naringenina em concentrações de 1 e 10 μM exerceu um efeito protetor do DNA impedindo sua fragmentação. Estes dados podem auxiliar a explicar os resultados encontrados neste estudo onde NGEN e NGENCuB não foram

capazes de induzir a fragmentação do DNA de células MDA-MB-231. Até o momento da confecção desta dissertação, não existiam estudos demonstrando os efeitos da NGEN complexada com Cu(II) sobre a migração de células tumorais, atividade MMP ou apoptose. Poucos estudos investigaram os efeitos de NGEN, mas não deste composto complexado com Cu(II), em diferentes linhagens de células tumorais. Jin e colaboradores também demonstram através de citometria de fluxo que a NGEN em concentrações a partir de 250 μ M induziu a apoptose em células U937. De maneira similar, Kanno *et al.* [71] observaram que a NGEN em concentrações de 100, 250 e 500 μ M induziu a apoptose em células HL-60 via NF- κ B, caspase-3 e -9. Em nosso estudo, a NGEN em 100 μ M também induziu a apoptose nas células MDA-MB-231, porém quando complexado ao Cu(II) a NGENCuB em 10 e 100 μ M foi capaz de induzir um maior número de células apoptóticas, quando comparado com as mesmas concentrações de NGEN. Ao analisar a expressão de caspases -8, -9 e Bcl-2, através de PCR em tempo real, NGENCuB aumentou a expressão das caspase -8 e -9, porém não de Bcl-2 na concentração de 1 μ M (uma concentração muito menor que a utilizada por Kanno e colaboradores). Nosso estudo também demonstrou que a concentração de 10 μ M de NGENCuB também aumentou a expressão de caspase-8, -9 e Bcl-2. Por outro lado na concentração de 100 μ M, a concentração que mais induziu apoptose, não houve diferenças na expressão desses genes comparados com as células controle não tratadas. Isto pode ser explicado pelo longo período de incubação das células com NGEN e NGENCuB (48 horas). Neste período a expressão destes genes pode ter diminuído por haver um *delay* e mecanismos de *feedback* entre a expressão gênica e a síntese proteica [72] apresentando a possibilidade de um erro tipo I, tornando necessário novas análises com um tempo menor de incubação das células com o composto.

Padhye e colaboradores[73] apresentaram os efeitos do Cu(II) complexado ao precursor do Taxol, 10-deacetilbaccatina tiosemicarbazona mostrando efeito citotóxico para células de câncer de mama positivas para receptor de estrogênio da linhagem MCF-7 com concentrações abaixo de 20 μ M, enquanto o precursor não complexado não apresentou efeitos citotóxicos para esta linhagem celular. O mesmo grupo demonstrou que a complexação com Cu(II) com tiosemicarbazona hidroxinaftoquinona foi o que apresentou maior efeito citotóxico, em células da linhagem MCF-7, quando comparado com complexos análogos de níquel Ni(II), ferro Fe(II), platina Pt(II) e paládio Pd(II). Cvek *et al.* [74] investigaram os efeitos do diethildithiocarbamate complexado com Zn(II), Ni(II) ou Cu(II) em células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231

demonstrando que o complexo com cobre apresentou maior atividade. No presente estudo, o Cu(II) juntamente com a 2-2'-bipiridina, também foram capazes de aumentar a atividade antitumoral quando complexados com a naringenina.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Após a análise de todos os resultados deste trabalho é possível afirmar que a complexação da naringenina com Cu(II) e Bipy foi capaz de potencializar seus efeitos citotóxicos contra células de tumor de mama triplo-negativo MDA-MB-231. Visto que o tumor de mama triplo-negativo apesar de pouco incidente na população, este tem maior probabilidade de promover uma reincidência do tumor além de um menor número de tratamentos possíveis, pois, não apresenta receptores para estrógeno, progesterona e HER2, por onde agem os principais tratamentos farmacológicos existentes. Dessa maneira NGENCuB pode ser uma alternativa ao tratamento do câncer de mama triplo-negativo. Outro ponto importante é a facilidade de obtenção deste composto, pois, a naringenina é facilmente extraída da casca da laranja e o processo para complexação do composto NGENCuB é facilmente realizado por um laboratório competente. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para investigar sua atividade e aprofundar na elucidação de seus mecanismos de ação e possíveis efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Câncer, M.d.S.-I.N.d., *Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil*. 2012, Brasil.
2. Alencar, M.d.S.-I.N.d.C.J.d., *Estimativas 2010 - Incidência de Câncer no Brasil*. 2010, Brasil. 118.
3. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
4. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
5. Youlden, D.R., et al., *The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality*. Cancer Epidemiol, 2012. **36**(3): p. 237-48.
6. Desantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 52-62.
7. Zhang, Y.W., et al., *Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009. **57**(6): p. 435-45.
8. Kalyanaraman, B., et al., *Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity*. Mol Cell Biochem, 2002. **234-235**(1-2): p. 119-24.
9. Campos, E.C., et al., *Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy*. Eur J Pharmacol, 2011. **670**(2-3): p. 541-53.
10. McDermott, M., et al., *In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 40.
11. Pedraza-Farina, L.G., *Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis*. Yale J Biol Med, 2006. **79**(3-4): p. 95-103.
12. Bhutia, S.K. and T.K. Maiti, *Targeting tumors with peptides from natural sources*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 210-7.
13. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis*. Endocr Rev, 2007. **28**(3): p. 297-321.
14. Fidler, I.J., S.J. Kim, and R.R. Langley, *The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 927-36.
15. Rivera, E. and H. Gomez, *Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone*. Breast Cancer Res, 2010. **12 Suppl 2**: p. S2.
16. Biersack, B., et al., *Coinage metal complexes against breast cancer*. Curr Med Chem, 2012. **19**(23): p. 3949-56.
17. Foulkes, W.D., et al., *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(19): p. 1482-5.
18. Rishton, G.M., *Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues*. Am J Cardiol, 2008. **101**(10A): p. 43D-49D.
19. Jones, A.W., *Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry*. Drug Test Anal, 2011. **3**(6): p. 337-44.
20. Cragg, G.M. and D.J. Newman, *Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions*. Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(12): p. 2783-97.
21. Mondal, S., et al., *Natural products: promising resources for cancer drug discovery*. Anticancer Agents Med Chem, 2012. **12**(1): p. 49-75.
22. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. J Nat Prod, 2007. **70**(3): p. 461-77.
23. Newman, D.J., G.M. Cragg, and K.M. Snader, *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*. J Nat Prod, 2003. **66**(7): p. 1022-37.
24. Corcoran, M.P., D.L. McKay, and J.B. Blumberg, *Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety*. J Nutr Gerontol Geriatr, 2012. **31**(3): p. 176-89.
25. Woo, H.D. and J. Kim, *Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(7): p. 1011-9.

26. Middleton, E., Jr., *Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function*. Adv Exp Med Biol, 1998. **439**: p. 175-82.
27. Lambert, J.D., et al., *Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 284S-291S.
28. Chen, X., et al., *Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone*. J Inorg Biochem, 2010. **104**(4): p. 379-84.
29. Zhou, J., et al., *Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes*. J Inorg Biochem, 2001. **83**(1): p. 41-8.
30. Garbutcheon-Singh, K.B., et al., *Transition metal based anticancer drugs*. Curr Top Med Chem, 2011. **11**(5): p. 521-42.
31. Teysstot, M.L., et al., *Metal-NHC complexes: a survey of anti-cancer properties*. Dalton Trans, 2009(35): p. 6894-902.
32. Tanaka, T., M. Tanaka, and T. Kuno, *Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of beta-cryptoxanthin and hesperidin*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 516981.
33. Tan, M., et al., *Synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties of copper (II) complexes with hesperetin, naringenin, and apigenin*. Bioinorg Chem Appl, 2009: p. 347872.
34. Sabarinathan, D., P. Mahalakshmi, and A.J. Vanisree, *Naringenin, a flavanone inhibits the proliferation of cerebrally implanted C6 glioma cells in rats*. Chem Biol Interact, 2011. **189**(1-2): p. 26-36.
35. Qin, L., et al., *Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model*. Protein Cell, 2011. **2**(6): p. 507-16.
36. Arul, D. and P. Subramanian, *Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells*. Pathol Oncol Res, 2013. **19**(4): p. 763-70.
37. Arul, D. and P. Subramanian, *Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **434**(2): p. 203-9.
38. Rosenberg, B., L. Vancamp, and T. Krigas, *Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. Nature, 1965. **205**: p. 698-9.
39. Rosenberg, B. and L. VanCamp, *The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds*. Cancer Res, 1970. **30**(6): p. 1799-802.
40. Calvert, A.H., et al., *Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II*. Cancer Chemother Pharmacol, 1982. **9**(3): p. 140-7.
41. Kidani, Y., M. Noji, and T. Tashiro, *Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers*. Gann, 1980. **71**(5): p. 637-43.
42. Kostova, I., *Ruthenium complexes as anticancer agents*. Curr Med Chem, 2006. **13**(9): p. 1085-107.
43. Kopf-Maier, P., H. Kopf, and E.W. Neuse, *Ferricenium complexes: a new type of water-soluble antitumor agent*. J Cancer Res Clin Oncol, 1984. **108**(3): p. 336-40.
44. Ott, I., et al., *Antitumor-active cobalt-alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid: studies on the mode of drug action*. J Med Chem, 2005. **48**(2): p. 622-9.
45. Orvig, C. and M.J. Abrams, *Medicinal inorganic chemistry: introduction*. Chem Rev, 1999. **99**(9): p. 2201-4.
46. Nasulewicz, A., A. Mazur, and A. Opolski, *Role of copper in tumour angiogenesis--clinical implications*. J Trace Elem Med Biol, 2004. **18**(1): p. 1-8.
47. Manning, T.J., et al., *Copper ion as a delivery platform for taxanes and taxane complexes*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(1): p. 371-7.
48. Ullah, M.F., et al., *Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(4): p. 553-9.
49. Lou, C., et al., *Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50956.

50. Iwashita, K., et al., *Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(9): p. 1813-20.
51. Bulzomi, P., et al., *The naringenin-induced proapoptotic effect in breast cancer cell lines holds out against a high bisphenol a background*. IUBMB Life, 2012. **64**(8): p. 690-6.
52. Duff, B., et al., *Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells*. Eur J Pharmacol, 2012. **689**(1-3): p. 45-55.
53. Puszko, A., et al., *Systematic coordination chemistry and cytotoxicity of copper(II) complexes with methyl substituted 4-nitropyridine N-oxides*. J Inorg Biochem, 2011. **105**(8): p. 1109-14.
54. Rosu, T., et al., *Synthesis, characterization antibacterial and antiproliferative activity of novel Cu(II) and Pd(II) complexes with 2-hydroxy-8-R-tricyclo[7.3.1.0.(2,7)]tridecane-13-one thiosemicarbazone*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(4): p. 1627-34.
55. El Brahmi, N., et al., *Original multivalent copper(II)-conjugated phosphorus dendrimers and corresponding mononuclear copper(II) complexes with antitumoral activities*. Mol Pharm, 2013. **10**(4): p. 1459-64.
56. Silva, P.P., et al., *Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage*. Inorg Chem, 2011. **50**(14): p. 6414-24.
57. Urquiola, C., et al., *New copper-based complexes with quinoxaline N1,N4-dioxide derivatives, potential antitumoral agents*. J Inorg Biochem, 2008. **102**(1): p. 119-26.
58. Beckford, F.A., et al., *Anticancer activity and biophysical reactivity of copper complexes of 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-N-alkylhydrazinecarbothioamides*. Inorg Chem Commun, 2012. **15**: p. 225-229.
59. Li, T.R., Z.Y. Yang, and B.D. Wang, *Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin Schiff base and its Cu(II), Ni(II), Zn(II) complexes*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2007. **55**(1): p. 26-8.
60. Li, Y.H., B.D. Wang, and Z.Y. Yang, *Infrared and DNA-binding on ultraviolet and fluorescence spectra of new copper and zinc complexes with a naringenin Schiff-base ligand*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2007. **67**(2): p. 395-401.
61. Lee, E.R., et al., *Regulation of apoptosis by modified naringenin derivatives in human colorectal carcinoma RKO cells*. J Cell Biochem, 2008. **104**(1): p. 259-73.
62. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
63. Yarrow, J.C., et al., *A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods*. BMC Biotechnol, 2004. **4**: p. 21.
64. Artym, V.V., et al., *Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3034-43.
65. Toth, M., A. Sohail, and R. Fridman, *Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography*. Methods Mol Biol, 2012. **878**: p. 121-35.
66. Stark, A.M., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells*. J Neurooncol, 2007. **81**(1): p. 39-48.
67. Barrett, J.M., et al., *Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **72**(3): p. 227-32.
68. Jin, C.Y., et al., *Naringenin-induced apoptosis is attenuated by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human leukemia U937 cells*. Toxicol In Vitro, 2009. **23**(2): p. 259-65.
69. Ramprasath, T., et al., *Naringenin confers protection against oxidative stress through upregulation of Nrf2 target genes in cardiomyoblast cells*. J Physiol Biochem, 2014.

70. Cavia-Saiz, M., et al., *Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study*. J Sci Food Agric, 2010. **90**(7): p. 1238-44.
71. Kanno, S., et al., *Naringenin-induced apoptosis via activation of NF-kappaB and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells*. Toxicol Lett, 2006. **166**(2): p. 131-9.
72. Suri, V., J.C. Hall, and M. Rosbash, *Two novel doubletime mutants alter circadian properties and eliminate the delay between RNA and protein in Drosophila*. J Neurosci, 2000. **20**(20): p. 7547-55.
73. Saha, D.K., et al., *Synthesis, structure, spectroscopy and antitumor activity of hydroxy naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal complexes against MCF-7 human breast cancer cell line*. Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry, 2002. **41**(2): p. 279-283.
74. Cvek, B., et al., *Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells*. J Med Chem, 2008. **51**(20): p. 6256-8.