

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA DE COMPLEXOS DE COBRE E ZINCO FRENTE A
CÉLULAS LEUCÊMICAS E MELANÔMICAS**

Franz Viana Borges

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes/RJ

Maio/2013

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA DE COMPLEXOS DE COBRE E ZINCO FRENTE A
CÉLULAS LEUCÊMICAS E MELANÔMICAS**

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Orientador: Prof. Dr. Milton Masaiko Kanashiro

Coorientador: Prof. Dr. Adolfo Horn Jr.

Campos dos Goytacazes/RJ

Maio/2013

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA DE COMPLEXOS DE COBRE E ZINCO FRENTE A
CÉLULAS LEUCÊMICAS E MELANÔMICAS**

Franz Viana Borges

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Aprovada em: ___/___/_____

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Dyeison Antonow - REDEFAC/INCA

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira – IQ/UFRJ

Prof. Dr. Nicolás Adrián Rey - Departamento de Química/PUC-Rio

Prof. Dr. Adolfo Horn Jr.- LCQUI-UENF (Coorientador)

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro - LBR/UENF (Orientador)

Apoio financeiro:

Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (UENF)

*Dedico este trabalho ao meu Pai **Renato** aos meus Irmãos **Marcell** e **Renata**, a minha Afilhada **Laurinha** e a minha Esposa **Tháís** por todo apoio e confiança a mim creditados. Em especial dedico a minha Mãe **Carol** por ser umas das grandes lutadoras na batalha contra o câncer*

*Dedico também a: **Ivone Mary, Maria Inês e Maria Luiza** – In Memoriam.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Milton Masahiko Kanashiro por contribuir de forma relevante para minha formação profissional e acadêmica.

Ao professor Adolfo Horn Jr. e professora Christiane Fernandes pela orientação, pelos importantíssimos conselhos e pelos essenciais ensinamentos de química.

Aos meus Pais Renato e Carol por incentivarem minha dedicação exclusiva aos estudos, o que sem dúvida me permitiu alcançar tão alto degrau acadêmico.

À minha linda esposa Thaís por me apoiar em todos os momentos sejam bons ou ruins, por ser essa “pequena” grande mulher e meu verdadeiro porto seguro.

Aos meus irmãos, Renata e Marcell e à minha sobrinha e afilhada Laurinha por serem a alegria da minha vida.

Ao grande amigo/irmão Fernandinho por todos esses anos de amizade verdadeira e apoio incondicional

Aos técnicos de Laboratório, Jorge, Núbia, Rita e Juju, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Às minhas colegas da química Samila, Rafaela e Érika, pela extrema paciência comigo e pelos importantes ensinamentos das técnicas de síntese e caracterização dos compostos.

À minha segunda família, Dona Ilda, Cândia, Cláudio, Laísa e Lucas por me aceitarem como neto, filho e irmão.

A todos meus familiares que acreditaram em mim, em especial à minha avó Norma, pela preocupação e amor materno dedicados a mim todo esse tempo.

Por fim àqueles que contribuíram para realização desse trabalho e a todos, que de certa forma me ajudaram, contribuindo com minha formação acadêmica e profissional.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Câncer: Epidemiologia e Aspectos gerais	1
1.2 – A Quimioterapia antineoplásica.....	5
1.3 - Química de coordenação	8
1.4 - Propriedades desejáveis dos Metalofármacos	8
1.5 - Metalofármacos com atividade antitumoral.....	11
1.5.1 – <i>Cisplatina</i>	12
1.5.2 – <i>Resistência à cisplatina</i>	17
1.5.3 - <i>Compostos metálicos que não contém platina</i>	20
1.6 - Mecanismos de Morte Celular	29
1.6.1 – <i>Necrose</i>	29
1.6.2 – <i>Autofagia</i>	30
1.6.3 – <i>Apoptose</i>	31
1.7 – Apoptose, câncer e quimioterapia.....	35
2 – JUSTIFICATIVA	37
3 – OBJETIVOS	38
3.1 - Objetivo Geral	38
3.2 - Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 - Caracterização Físico-Química dos precursores, ligantes e complexos.....	39
4.1.1 - <i>Espectroscopia de infravermelho</i>	39
4.1.2 - <i>Análise elementar</i>	39
4.1.3 - <i>Condutivimetria</i>	40
4.1.4 - <i>Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI(+)- MS e ESI(+)-MS/MS)</i>	40
4.2. Sínteses dos Compostos Orgânicos.....	40

4.2.1 - Síntese do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1).....	40
4.2.2 - Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2).....	41
4.2.3 - Síntese do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P3).....	42
4.2.4 - Síntese do composto 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (La)	43
4.2.5 - Síntese do composto 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (Lβ).....	44
4.3. Síntese dos compostos de coordenação	45
4.3.1 - Síntese do complexo [Cu(L _a)Cl]Cl ₂ H ₂ O (Cu _a).....	45
4.3.2 - Síntese do complexo [Cu(L _β)Cl]Cl ₃ H ₂ O (Cu _β).....	45
4.3.3 - Síntese do complexo [Zn(L _a)Cl] (Zn _a)	46
4.3.4 - Síntese do complexo [Zn(L _β)Cl] (Zn _β).....	47
4.4. Atividade biológica, <i>in vitro</i> , dos compostos.....	47
4.4.1 - Diluição, concentrações de trabalho e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação	47
4.4.2 - Cultura das linhagens de células de origem tumoral	48
4.4.3 - Cultura das linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	48
4.4.4 - Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio).....	49
4.4.5 - Determinação da Dose Letal Mediana (DL ₅₀) do composto Cu _a	49
4.4.6 - Avaliação do tipo de morte celular por Microscopia de fluorescência	50
4.4.7 - Confirmação do processo de morte celular programada através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).....	51
4.4.8 - Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)	52
4.4.9 - Avaliação de fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose	53
4.4.10 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)	53
4.4.11 - Análise ultraestrutural das mitocôndrias de células U937 por Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)	54
4.4.12 - Análise do padrão de distribuição mitocondrial por Microscopia de Fluorescência.....	55
4.4.13 - Fracionamento celular e Detecção da liberação de citocromo C	55

4.4.14 - Avaliação da atividade de caspases.....	56
4.4.15 - Análise estatística.....	57
5. RESULTADOS	58
5.1 - Caracterização dos compostos de coordenação	58
5.1.1 - Análise na região do infravermelho do ligante $L\alpha$ e dos complexos de cobre ($Cu\alpha$) e zinco ($Zn\alpha$).....	58
5.1.2 - Análise na região do infravermelho do ligante $L\beta$ e dos complexos de cobre ($Cu\beta$) e ($Zn\beta$).	61
5.1.3 - Análise de Condutividade elétrica dos compostos de zinco	63
5.1.4 - Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-(+)-MS) dos compostos de coordenação de zinco.....	63
5.2 - Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular.....	69
5.3 - Determinação da toxicidade dos compostos <i>in vivo</i> (DL_{50})	73
5.4 - Avaliação do tipo de morte celular mediada pelos compostos	75
5.4.1 - Avaliação de morte celular por microscopia de fluorescência..	75
5.3.2 - Avaliação da Externalização de fosfatidilserina (marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio)	81
5.3.3 - Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo.....	84
5.3.4 - Eletroforese em gel de agarose	89
5.4 - Avaliação da via apoptótica ativada pelo composto $Cu\alpha$	90
5.4.1 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	90
5.4.2 - Avaliação da morfologia mitocondrial por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	94
5.4.3 - Detecção da liberação de citocromo C e Avaliação do padrão de ativação de caspases	96
6 - DISCUSSÃO	99
7 - CONCLUSÕES	117
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012/13, exceto pele não melanoma na população brasileira, por sexo.....	2
Figura 2: Capacidades adquiridas pelas células tumorais. É sugerido que a maioria senão todos os tipos de câncer adquirem o mesmo grupo de capacidades funcionais durante seu desenvolvimento, embora através de várias estratégias diferentes (Modificado de Luo <i>et al.</i> , 2009).....	4
Figura 3: Áreas de atuação da química inorgânica medicinal, mostrando algumas possíveis aplicações dos metais. (Modificado de Guo e Sadler, 1999).	10
Figura 4: Estrutura dos outros compostos contendo platina: Nedaplatina (a), Oxiplatina (b), Lobaplatina (c) e Carboplatina (d).	12
Figura 5: Estrutura molecular da cis-diaminodicloroplatina II (cisplatina) e seu mecanismo de ação (Modificado de Kartalou e Essigmann, 2001).	14
Figura 6: Formação de aductos da cisplatina com o DNA e proteínas (Modificado de Jones e Thornback, 2007).....	15
Figura 7: Mecanismos de resistência à cisplatina (Modificado de Katalou & Essigmann, 2001).....	17
Figura 8: Dois dos compostos de gálio mais utilizados em ensaios clínicos. (a) [GaIII(L ^{maltolato}) ₃] e (b) [GaIII(L ^{quinolinolato}) ₃] ou KP46.....	21
Figura 9: Os principais compostos de Ru(III) utilizados em ensaios clínicos. (a) [ImH][trans-RuCl ₄ (DMSO)Im] ou NAMI-A e (b) [InH][trans-RuCl ₄ In ₂] ou KP1019.	23
Figura 10: Estrutura molecular do dicloreto de titanoceno, [Ti(Cp) ₂ Cl ₂].	24
Figura 11: Alguns complexos de ferro com atividade antitumoral. (a) DEMFc ⁺ . (b) derivado ferroceno do tamoxifeno. (c) derivado ferro nucleosídeo. (d) complexo de ferro com ligante piridil pentadentado.	26
Figura 12: Compostos orgânicos e de coordenação com atividade antitumoral avaliados pelo grupo de Bioinorgânica da Universidade Estadual do Norte Fluminense, (BMPA) bis-(2-piridilmetil)amina, (HBPA) (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (Bull, 2008).	27
Figura 13: Vias de ativação e mecanismos centrais da apoptose (Modificado de Yu e Zhang, 2003).	33
Figura 14: Esquema de síntese do precursor P1 (Neves, <i>et al.</i> , 1993).....	41
Figura 15: Esquema de síntese do precursor P2 (Corrêa, 2006).....	42

Figura 16: Esquema de síntese do precursor P3 (Corrêa, 2006).....	42
Figura 17: Esquema de síntese do composto L α (Lopes 2012).	43
Figura 18: Esquema de síntese do composto L β (Lopes, 2012).....	44
Figura 19: Rota sintética para obtenção do complexo Cu α (Lopes, 2012).....	45
Figura 20: Rota sintética para obtenção do complexo Cu β (Lopes, 2012).....	46
Figura 21: Esquema de síntese do complexo Zn α	46
Figura 22: Esquema de síntese do complexo Zn β	47
Figura 23: Microscopia de Fluorescência de células U937 evidenciando as características para classificação das células como mencionadas acima em: 1 – Normais, 2 – Necrose, 3 – Apoptose Primária e 4 – Apoptose-necrose (necrose secundária).	51
Figura 24: Espectros na região do infravermelho para o ligante L α e seus complexos Cu α e Zn α	60
Figura 25: Espectros na região do infravermelho para o ligante L β e seus complexos Cu β e Zn β	62
Figura 26: Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto Zn α em água:metanol (1:1).....	65
Figura 27: Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto Zn β em água:metanol (1:1).....	66
Figura 28: Principais espécies presentes no espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto Zn α . (piridina ligada ao zinco)	67
Figura 29: Principais espécies presentes no espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto Zn β . (piridina ligada ao zinco).	68
Figura 30: Avaliação da viabilidade celular das linhagens leucêmicas U937 e THP-1, pelo ensaio de MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L α e L β) e com os compostos de coordenação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%.	70
Figura 31: Avaliação da viabilidade celular das linhagens melanômicas SK-MEL-5 e B16F10, pelo ensaio de MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L α e L β) e com os compostos de coordenação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%.	71

- Figura 32: Avaliação da viabilidade celular de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com o composto orgânico (L α) e com os compostos de coordenação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. 72
- Figura 33: Ensaio de toxicidade *in vivo* do composto Cu α . Os animais foram inoculados via intraperitoneal com diferentes concentrações do composto. O gráfico mostra a porcentagem de animais vivos de acordo com a concentração do composto Cu α 74
- Figura 34: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células leucêmicas U937 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey. 77
- Figura 35: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células leucêmicas THP-1 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey. 78
- Figura 36: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células de melanoma B16F10 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey. 79
- Figura 37: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células de melanoma SKMEL-5 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey. 80
- Figura 38: Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), necrose secundária (quadrante B) e apoptose primária (quadrante D) induzida pelo composto Cu α nas linhagens leucêmicas após 12 horas de incubação. O Quadrante C corresponde as células controle (não receberam o tratamento com os compostos). 82
- Figura 39: Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), necrose secundária (quadrante B) e apoptose primária (quadrante D) induzida pelo composto Cu α nas linhagens melanômicas após 12 horas de incubação. O Quadrante C corresponde as células controle (não receberam o tratamento com os compostos). 83
- Figura 40: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos. 85

- Figura 41: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem THP-1, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos. 86
- Figura 42: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem B16F10, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos. 87
- Figura 43: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem SK-MEL5, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos. 88
- Figura 44: Eletroforese em gel de agarose para detecção de fragmentação do DNA em oligonucleotídeos nas linhagens U937, THP-1, B16F10 e SKMEL-5 após tratamento com 50 e 100 μ M do composto Cu α durante 24 horas. 89
- Figura 45: *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para as linhagens U937 e THP-1 submetidas a incubação de 12 horas com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Quadrante B, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante C células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana..... 92
- Figura 46: *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para as linhagens B16F10 e SK-MEL5 submetidas a incubação de 12 horas com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Quadrante B, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante C células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana. 93
- Figura 47: Mudanças morfológicas em mitocôndrias de células U937 tratadas com 50 μ M do composto Cu α durante 12 e 24h. A parte de cima da figura mostra imagens de fluorescência de células U937 (objetiva de 100x) marcadas com *mitotracker* (vermelho) e com o corante nuclear *Hoechst* (azul). A parte de baixo da figura mostra alterações mitocondriais visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Células controle. (B) Células incubadas com composto Cu α por 12h. (C) Células incubadas com o Cu α por 24h. A cabeça de seta indica mitocôndrias com morfologia normal (controle). As setas indicam mudanças morfológicas nas mitocôndrias como inchaço, deformação da membrana interna e vacuolização..... 95
- Figura 48: Detecção da liberação de citocromo C em células U937 após incubação com o composto Cu α por 6, 12, 24 e 36 horas (n=2). A detecção da liberação do citocromo c foi feita utilizando o *Kit-Cytochrome c ELISA (Calbiochem[®])*. FM, fração mitocondrial. FC, fração citoplasmática. 97
- Figura 49: Avaliação da atividade das caspases 2, 3, 4, 8 e 9 em células U937 após incubação com os compostos Cu α e Cisplatina por 3, 6 e 12 horas (n=2). A atividade das caspases foi avaliada utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. *P<0,05,

P<0,01, *P<0,001 valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (tempo 0h) pelo teste de Tukey.98

Figura 50: Provável mecanismo de ação do composto de coordenação de cobre Cu α . O composto se ligaria a receptores da família TNF (TRAIL-R, por exemplo) e ativaria em tempos iniciais as caspase 8 e 4. A caspase 8 age quebrando Bid em t-bid o que provoca a liberação de citocromo C pela mitocôndria e ativação de caspase 9. A caspase 4, por sua vez, pode ser ativada pelo reticulo, e ativar as caspases 3 e 9 de maneira independente da mitocôndria. A caspase 2, esta associada a via mitocondrial e seria uma das responsáveis por danos no DNA e em outras macromoléculas..... 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais absorções observadas no espectro de infravermelho do ligante $L\alpha$ e dos complexos $Cu\alpha$ e $Zn\alpha$, com suas respectivas atribuições.	60
Tabela 2: Principais absorções observadas no espectro de infravermelho do ligante $L\beta$ e dos complexos $Cu\beta$ e $Zn\beta$, com suas respectivas atribuições.	62
Tabela 3: Dados da análise de condutividade elétrica para os complexos $Zn\alpha$ e $Zn\beta$	63
Tabela 4: $IC_{50}(\mu M)$ dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância Entre Grupos

APAF-1 – Apoptotic protease activating factor 1

ATCC – American Type Culture Collection

B16F10 – linhagem celular murina estabelecida de melanoma muito metastático

Bcl-2 – B cell lymphoma 2

BMPA – bis-(2-piridilmetil)amina

cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] – cisplatina

Cis-DDP – cis-diamminedichloridoplatinum (II)

Cu α – [Cu(L α)Cl]Cl.2H₂O

Cu β – [Cu(L β)Cl]Cl. 3H₂O

DD – Death Domain

DISC – Death inducing signaling complex

DL₅₀ – Dose Letal para 50% de um grupo de animais

DMEM-F12 – Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12

DMSO – Dimetilsufóxido

dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatos

D.O – Densidade Óptica

EC₅₀ – Concentração necessária para causar um efeito em 50% das células tratadas

FADD – Fas-Associated Death Domain

GA – Glutaraldeído

Hoechst – (2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1Hbenzimidazol)

HPCINOL – N,N-bis-(piridil-(2-il-metil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina)

HTP – Hematoporfirínicos

IAP – Inhibitor of Apoptosis Protein

INCA – Instituto Nacional do Câncer

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

L α – 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol

L β – 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol

MET – Microscopia eletrônica de Transmissão

MDR – Multiple-drug resistance

MMR – Mismatch repair

MTT – [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

OMI/HtrA2 – Serino protease mitocondrial que ajuda na ativação da apoptose

OMS – Organização Mundial de Saúde

P1 – HBPA, precursor [(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)Amin

P2 – precursor [2-(1-naftiloximetil)oxirano

P3 – precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano

PA – paraformaldeído

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS – Tampão Salina Fosfato

PI – Iodeto de propídio

PMM – Potencial de membrana mitocondrial

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNAase – Ribonuclease A

RR – Recombinação Homóloga

SEB – Staphylococcal enterotoxin b

SKMEL-5 – Skin Melanoma (linhagem celular humana estabelecida de melanoma pouco metastático)

SMAC/DIABLO – second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI

THP-1 – linhagem celular humana estabelecida de leucemia monocítica aguda

TLS – Síntese de Translesão

TNF – Tumor necrosis factor

TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand

U937 – linhagem celular humana estabelecida de linfoma histiocítico

XIAP – X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Zn α – [Zn(L α)Cl]

Zn β – [Zn(L β)Cl]

RESUMO

O câncer é uma das doenças mais importantes na atualidade, constituindo a segunda maior causa de mortes nos países industrializados depois das doenças cardiovasculares. A introdução, a partir de 1978, do composto de coordenação cisplatina, na quimioterapia do câncer, representou um marco na história da Química Inorgânica Medicinal, e constituiu um importante avanço no tratamento de diversos tipos de tumores. Desde então, desenvolveu-se uma intensa busca por novos complexos metálicos que também apresentassem atividade antitumoral, mas com baixa toxicidade para o organismo. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de compostos de coordenação previamente descritos de cobre e de novos compostos de zinco contendo as formas isoméricas do grupo naftol em suas estruturas, frente a duas linhagens de células leucêmicas humanas (U-937 e THP-1) e duas linhagens de melanoma (SKMEL-5 e B16F10). Os ligantes tiveram sua caracterização confirmada através de espectroscopia no infravermelho, RMN¹H e ponto de fusão. Os compostos de coordenação de cobre tiveram sua caracterização confirmada por espectroscopia de infravermelho e análise elementar (CHN). Os compostos de coordenação de zinco foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, análise elementar, condutivimetria e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS). O ensaio de viabilidade por MTT mostrou que o ligante 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L α) e os compostos de cobre, [Cu(L α)Cl]Cl \cdot 2H $_2$ O (Cu α) e [Cu(L β)Cl]Cl \cdot 3H $_2$ O (Cu β) mas não o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L β) e os compostos de zinco, [Zn(L α)Cl] (Zn α) e [Zn(L β)Cl] (Zn β) foram capazes de diminuir a viabilidade de todas as linhagens neoplásicas de maneira concentração-dependente. O composto Cu α foi o mais ativo e os valores de EC $_{50}$ foram de 14, 11, 28 e 35 μ M, para as linhagens U937, THP-1, SKMEL-5 e B16F10, respectivamente. Os compostos de cobre, bem como o ligante L α demonstraram ser mais seletivos para células neoplásicas frente às células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O composto Cu α apresentou EC $_{50}$ de 166 μ M para essas células, contra 44 μ M da cisplatina. Esse composto demonstrou também, *in vivo*, ser menos tóxico do que a cisplatina para camundongos C57BL/6. A dose letal mediana (DL $_{50}$) foi de 55 mg/kg para o composto Cu α contra 6,6 mg/kg da cisplatina. O conjunto de dados fornecido pela microscopia de fluorescência, marcação com anexina V, análise do ciclo celular (sub-G1) e padrão de fragmentação do DNA em gel de agarose, demonstrou que os compostos de cobre induzem morte celular por apoptose nas linhagens celulares testadas de maneira dose e tempo-dependente. A análise do potencial de membrana mitocondrial, juntamente com marcação fluorescente, microscopia eletrônica de transmissão e detecção da liberação de citocromo C mostraram o comprometimento mitocondrial durante o processo de apoptose induzido pelo composto Cu α . No entanto, o ensaio de avaliação de caspases ativadas demonstrou que o sinal apoptótico aparece bem mais cedo do que os efeitos observados na mitocôndria. Esse fato nos levou a propor que o composto Cu α ativa a via de receptores de morte. Esse sinal, então, seria amplificado pela mitocôndria, o que levaria ao processo de morte celular programada por apoptose. Esses resultados mostram que o composto Cu α inibe o crescimento de células neoplásicas *in vitro* por

induzir morte celular por apoptose e que ambas as vias apoptóticas estão ativadas (extrínseca e intrínseca). Além disso, foi possível observar que esse composto foi menos tóxico para células normais do que a cisplatina, o que o torna promissor na busca de novos fármacos com atividade antitumoral que sejam mais potentes e menos tóxicos.

Palavras-chave: Compostos de coordenação, câncer, apoptose.

ABSTRACT

Cancer is one of the most important diseases nowadays, constituting the second mainly cause of death in industrialized countries after heart diseases. The introduction, in 1978, of the coordination compound cisplatin, in cancer chemotherapy, represented a mark in the history of Medicinal Inorganic Chemistry, and it constituted an important progress in the treatment of several types of tumors. Hence, an intense search for new metallic complexes with increased antitumor activity and low toxicity for the organism, has been the goal of several research groups and pharmaceutical companies. Therefore, this study aimed the development, characterization and evaluation of antineoplastic activity of previously described copper complexes and new zinc coordination compounds containing isomeric forms of the naphthol molecule in their structures, against two human leukemic cell lines (U-937 and THP-1) and two melanoma cell lines (SKMEL-5 and B16F10). Characterization of ligands was confirmed by infrared spectroscopy, RMN¹H and melting point. Characterization of copper coordination compounds was carried out by infrared spectroscopy and elemental analysis (CHN). Zinc coordination compounds were characterized by infrared spectroscopy, elemental analysis, conductivimetry and electrospray ionization mass spectrometry (ESI (+)-MS and ESI (+) -MS/MS). The cell viability assay (MTT) showed that ligand 1-{2-hydroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L α) and copper complexes [Cu(L α)Cl]Cl \cdot 2H $_2$ O (Cu α) and [Cu(L β)Cl]Cl \cdot 3H $_2$ O (Cu β) but not the ligand 1-[2-hydroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L β) and the zinc complexes [Zn(L α)Cl] (Zn α) and [Zn(L β)Cl] (Zn β) were able to reduce the viability of all neoplastic cell lines in a dose-dependent manner. The complex Cu α showed the highest activity with EC $_{50}$ values of 14, 11, 28 and 35 μ M for U937, THP-1, SKMEL-5 and B16F10 cell lines, respectively. Copper complexes and the ligand L α demonstrated to be more selective for neoplastic cells facing the peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Complex Cu α showed an EC $_{50}$ value of 166 μ M to these cells against 44 μ M of cisplatin. This complex also showed less toxicity *in vivo* than cisplatin for C57BL/6 mice. The median lethal doses (LD $_{50}$) were 55 mg/kg and 6,6 mg/kg complex Cu α and cisplatin, respectively. The data set supplied by fluorescence microscopy, annexin V staining, cell cycle analysis (sub-G1) and the pattern of DNA fragmentation on agarose gel showed that Cu α induces apoptosis cell death in all cell lines tested in a dose- and time-dependent manner. Analysis of mitochondrial membrane potential, fluorescent labeling, transmission electron microscopy and detection of cytochrome C release showed a mitochondrial commitment during apoptosis process induced by Cu α complex. However, caspase activation assay demonstrated that apoptotic signal appears much earlier than the effects observed on mitochondria. This fact led us to propose that complex Cu α activates the death receptors pathway. This signal would be amplified by mitochondria, leading to the process of programmed cell death by apoptosis. These results show that compound Cu α inhibit neoplastic cell growth *in vitro* by inducing apoptotic cell death and that both apoptotic pathways are activated (intrinsic and extrinsic). Furthermore, it was observed that this compound was less toxic to normal cells than cisplatin, which makes it promising in the search for new drugs with anti-tumor activity that are more potent and less toxic.

Key words: Coordinated compounds, cisplatin, apoptosis.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer: Epidemiologia e Aspectos gerais

Entende-se por câncer, tumor maligno ou neoplasia maligna o conjunto de doenças que têm por característica o crescimento desordenado e difuso de células anormais. No entanto, para atingir a categoria de maligno, o tumor tem de adquirir a capacidade de migrar para sítios adjacentes ou distantes do tumor de origem. Tal processo é conhecido como metástase. O câncer pode ser causado por diversos fatores, sejam eles externos (químicos, tabaco, radiações e infecções por organismos) ou internos (mutações herdadas ou que podem ocorrer durante o metabolismo, devido a hormônios e condições imunológicas). Fatores como esses podem atuar juntos ou em seqüência, promovendo, assim, o início da carcinogênese (Cotran *et al.*, 2000).

O câncer é hoje considerado um dos principais problemas mundiais de saúde e uma das mais importantes causas de enfermidade e morte em crianças e adultos. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os cânceres de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil novos casos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino, figura 1 (INCA, 2012).

Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual		
Próstata	60.180	30,8%	Homens		Mama Feminina	52.680	27,9%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Mulheres		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto		15.960	8,4%	
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide		10.590	5,6%	
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão		10.110	5,3%	
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago		7.420	3,9%	
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário		6.190	3,3%	
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero		4.520	2,4%	
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central		4.450	2,4%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Linfoma não Hodgkin		4.450	2,4%	

Figura 1: Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012/13, exceto pele não melanoma, na população brasileira, por sexo.

Considerando as estimativas mundiais, os números também são alarmantes. O câncer é responsável por 12,5% das mortes, uma porcentagem maior que as estimadas para AIDS, tuberculose e malária juntas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até, 2030, serão registrados cerca de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2012).

Os diversos tipos de cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula dos quais se originam. Cânceres originados de células epiteliais são denominados carcinomas; aqueles originados a partir de tecidos conjuntivos ou células musculares são denominados sarcomas. Cânceres que não se encaixam em nenhuma dessas categorias incluem os vários tipos de leucemia, derivados de células hematopoiéticas, e cânceres derivados de células do sistema nervoso. Aproximadamente 90% dos cânceres humanos são carcinomas, talvez porque a maioria das células em proliferação no corpo se encontram no epitélio, ou porque os tecidos epiteliais são mais expostos a várias formas de danos físicos e químicos que favorecem o desenvolvimento do câncer (Alberts, *et al.*, 2002).

As causas que podem levar ao desenvolvimento do câncer são variadas. Fatores ambientais e o modo de vida, associados à constituição genética do

indivíduo, são responsáveis por governar o desenvolvimento do câncer de uma forma geral (Alberts, *et al.*, 2002).

Após muitos avanços, as pesquisas sobre câncer geraram um rico e complexo corpo de conhecimento, revelando ser o câncer uma doença que envolve importantes mudanças no genoma de uma célula ao longo de sua vida. Tais mudanças passaram a ser elucidadas após a descoberta de mutações que produzem oncogenes com ganho de função e genes supressores tumorais com perda recessiva de função. Ambas as classes de genes foram identificadas em células humanas e animais, através de alterações em suas funções e pela produção do fenótipo cancerígeno em modelos experimentais (Bishop e Weinberg, 1996).

Várias linhas de evidências indicam que a tumorigênese é um processo que ocorre em várias etapas, as quais refletem alterações genéticas que dirigem uma progressiva transformação de células normais em células altamente malignas (Hanahan e Weinberg, 2000). Essa transformação pode ser evidenciada em células em cultura, onde células de roedores requerem pelo menos a introdução de duas mudanças genéticas até que elas adquiram a competência tumorigênica, enquanto células humanas são mais difíceis de transformar (Hahn *et al.*, 1999).

Acredita-se que o vasto genótipo de células tumorais seja resultado da manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular, que coletivamente ditam o crescimento de células malignas: auto suficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibidores de crescimento, evasão do programa de morte celular (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000). Luo e colaboradores (2009) propuseram características adicionais, tais como: evasão do sistema imune, elevada resposta de danos no DNA causada por elevadas taxas de replicação e defeitos no mecanismo de reparo do DNA, estresse proteotóxico (aumento na quantidade de tóxicos desnova proteínas nas células), estresse mitótico / instabilidade cromossômica, estresse metabólico (o aumento da utilização de glicólise, em vez de fosforilação oxidativa, como meio de produção de ATP), e estresse oxidativo (aumento no nível de espécies reativas de oxigênio em células tumorais) (figura 2).



Figura 2: Capacidades adquiridas pelas células tumorais. É sugerido que a maioria não todos os tipos de câncer adquirem o mesmo grupo de capacidades funcionais durante seu desenvolvimento, embora através de várias estratégias diferentes (Modificado de Luo *et al.*, 2009).

Observações de cânceres em humanos e em modelos animais apontam que o desenvolvimento tumoral acontece via um processo formalmente análogo à evolução Darwiniana, no qual uma sucessão de mudanças genéticas, cada uma conferindo vantagens para o crescimento celular, leva à progressiva conversão de células normais em células cancerígenas, quebrando assim a harmonia tecidual e levando a sociedade celular ao colapso através de um processo microevolucionário (Nowell, 1976).

Essa forma peculiar de ação faz do câncer um conjunto de doenças de difícil combate. O sistema imunológico muitas vezes não reconhece as células tumorais como sendo uma perigosa ameaça que deve ser eliminada, pois essas células, mesmo transformadas, ainda possuem um fenótipo muito similar aos das células normais. Dessa forma, as células tumorais acabam por induzir tolerância imunológica através de diversos mecanismos que impede o sistema imunológico de produzir uma resposta imune eficaz contra o tumor, permitindo assim que a massa de células transformadas cresça sem nenhum controle imunológico efetivo (Mapara e Sykes, 2004).

1.2 – A Quimioterapia antineoplásica

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Murad e Katz, 2000). Outros métodos, também utilizados hoje em dia, compreendem a fotoirradiação com derivados hematoporfíricos (HTP) (Machado, 2000) e a imunoterapia (Salmon, 1998). O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais do que um tipo de tratamento. Apenas com os métodos de tratamento citados, um terço dos pacientes alcança a cura total através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Todavia, na maioria dos casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (Chabner e Longo, 1996; Spence e Johnston, 2001).

A quimioterapia contra o câncer ou antineoplásica refere-se à administração de drogas citotóxicas, capazes de promover morte celular ou pelo menos inibir o crescimento celular. O tratamento quimioterápico tem como objetivo erradicar o tumor ou reduzir seu crescimento, diminuindo dessa forma os sintomas relacionados ao câncer, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente (Nygren, 2001).

A quimioterapia para o tratamento do câncer foi introduzida na medicina há setenta anos atrás. Na verdade, o tratamento do câncer com agentes químicos teve início há várias centenas de anos, porém foi só no início da década 1940 que o primeiro uso da quimioterapia sistêmica foi documentado com sucesso. Baseado na experiência da guerra sobre os efeitos do gás mostarda no sistema linfático, esse agente foi utilizado para o tratamento de um paciente com linfoma. Embora o tumor tenha rapidamente crescido após um efeito antitumoral inicial, essa experiência marcou o início da quimioterapia a tumores malignos (Gilman, 1963; Kidwai *et al.*, 2002). O avanço no conhecimento sobre a bioquímica do metabolismo celular levou ao desenvolvimento de antimetabólicos durante as décadas seguintes, como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina e 5-fluorouracil. Nos anos 60 e 70, surgiram os agentes naturais como os antibióticos actinomicina D e

doxorubicina e substâncias puras extraídas de extratos vegetais, como os alcalóides de vinca (Pratt e Ruddon, 1979).

O grande avanço da quimioterapia moderna aconteceu após a introdução da cisplatina durante a década de 70, o que mudou consideravelmente a perspectiva para pacientes com câncer testicular, sendo mais tarde também usada no tratamento de outros tumores sólidos (Johnson *et al.*, 2001).

Durante as décadas seguintes, alguns novos fármacos contribuíram substancialmente como opções para o tratamento do câncer, entre eles o taxol, com alta atividade contra o câncer de mama, e os inibidores de topoisomerase I, como o Irinotecano. Além disso, os antimetabólicos fludarabina e cladribina têm estendido o leque de opções para o tratamento de alguns tipos de linfoma (Nygren, 2001).

Uma grande limitação da quimioterapia no tratamento do câncer são seus frequentes efeitos colaterais. Embora os fármacos com ação antitumoral sejam produzidos com o objetivo de causar danos às células cancerígenas, células hematopoiéticas e células epiteliais intestinais normais, e os queratinócitos da matriz capilar são frequentemente suscetíveis aos efeitos tóxicos desses agentes, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (Almeida *et al.*, 2005). Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (Foye e Sangupta, 1996).

Outra importante limitação da quimioterapia é a resistência específica de alguns tumores a determinados medicamentos aliada ao problema da resistência a múltiplas drogas (MDR), os quais têm sido apontados como uma das principais causas de falha terapêutica e de mortes (Fernandes *et al.*, 2005).

A importância clínica dos agentes antineoplásicos induz a necessidade de estudo sistemático, o que primeiramente deveria ser feito com o uso de classificações químicas, levando-se em conta os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas desses agentes. Contudo, a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia oncológica é tão grande, que tal classificação só pode ser feita indiretamente. Chabner e Calabresi em 1995 descreveram uma classificação conveniente dos fármacos antineoplásicos onde o

critério classificatório baseia-se no ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e tradução. Entretanto, os autores consideram esta classificação arbitrária, já que os agentes hormonais, entre outros, não são classificáveis desta forma.

Os agentes antineoplásicos mais antigos e mais usados são conhecidos como agentes alquilantes que, comprovadamente, interagem quimicamente com o DNA e não são ativos somente no processo de divisão celular. De fato, na quimioterapia são descritos muitos alvos que podem ser estudados com o intuito de se estabelecer novos fármacos antitumorais, sendo que o DNA apresenta-se como um dos alvos mais estudados (Keskin *et al*, 2000). As moléculas com potencial atividade antitumoral mais estudadas interagem de alguma forma com o DNA. Com isso é possível fazer uma subclassificação dos antitumorais em relação ao mecanismo de ação no DNA:

- inibição da síntese de nucleotídeos: através do uso dos análogos das bases nitrogenadas (agentes antimetabólicos);
- efeito direto no DNA: são os agentes alquilantes como as mostardas nitrogenadas, nitrossuréias, complexos tipo cisplatina e outros. A bleomicina forma radicais livres que destroem o DNA, pois fragmenta as hélices, mecanismo diferente dos outros fármacos mostrados;
- ligantes que interagem na fenda menor do DNA: berenil, pentamidina e análogos;
- alteração das propriedades de pareamento de bases: intercalantes como a proflavina, acridina, amsacrina;
- inibição da DNA-girase: doxorubicina.

Desde o sucesso clínico do composto cisplatina, desenvolveu-se uma intensa busca por novos complexos metálicos que também apresentassem atividade antitumoral, o que levou à descoberta de outros complexos de platina bem como complexos que não contém platina. A química de coordenação permitiu a busca por esses novos complexos, dos quais alguns já são utilizados na clínica médica, com diferentes tipos de mecanismos de ação já descritos.

1.3 - Química de coordenação

A fim de entender porque um composto metálico em particular pode ser escolhido para uma determinada aplicação medicinal, é necessário entender as propriedades químicas deste composto. A área da química que estuda tais compostos denomina-se química de coordenação. A origem da química de coordenação como um braço da química clássica data do início do século 20 e é marcado pela atribuição do prêmio Nobel a Alfred Werner em 1913. Dentre outras conquistas, Werner estabeleceu a estrutura do composto de coordenação conhecido hoje como cisplatina, usado amplamente na terapia antitumoral (Kauffman, 1997).

Compostos de coordenação podem ser definidos como substâncias que contêm metais ao qual estão ligados moléculas ou ânions, denominados genericamente de ligantes. O conjunto de ligantes forma a esfera de coordenação do íon metálico. O átomo do ligante que se liga ao íon metálico é o átomo doador. O número de átomos doadores ligados ao íon metálico representa o número de coordenação do íon metálico (Brown *et al.*, 2005).

Compostos de coordenação são instrumentos chave de outra área da química, a inorgânica medicinal. A química inorgânica medicinal busca explorar as propriedades únicas de íons metálicos para a concepção de novos medicamentos. No desenvolvimento de metalofármacos, as moléculas orgânicas (ligantes) apresentam papel importante, uma vez que podem limitar os efeitos tóxicos dos metais e potencializar suas propriedades terapêuticas. Ligantes sintéticos planejados para obtenção de compostos de coordenação podem permitir a obtenção de novos agentes terapêuticos (Storr *et al.*, 2006; Bruijninx & Sadler, 2008).

1.4 - Propriedades desejáveis dos Metalofármacos

Compostos que são candidatos a fármacos devem apresentar algumas importantes características, como carga neutra, baixo peso molecular, estabilidade hidrolítica e termodinâmica, biodisponibilidade oral e, se possível, capacidade bifuncional (Thompson *et al.*, 1999). No entanto, compostos metálicos não são vistos como bons componentes de possíveis fármacos, já que existe uma percepção comum de que metais são tóxicos, instáveis e inadequados para aplicações

farmacêuticas. Apesar dessa desconfiança, nos últimos 30 anos, a boa reatividade química dos metais, suas propriedades magnéticas e nucleares e a variedade estrutural dos seus compostos tornaram os metais extremamente importantes em um grande número de aplicações medicinais (Jones e Thornback, 2007).

Um bom candidato a agente terapêutico deve ser capaz de cruzar membranas biológicas tanto no processo de absorção inicial quanto no processo de captação intracelular. A capacidade dos compostos metálicos serem transportados através da membrana celular está diretamente relacionada com sua toxidez. Essa capacidade depende de diversos fatores, entre os quais se destacam a hidrossolubilidade e a lipossolubilidade, volatilidade, peso molecular e a existência de mecanismos específicos de transporte (Benite *et al.*, 2007). São poucos os íons metálicos que possuem um mecanismo inerente de transporte ativo ou facilitado, com exceção de alguns íons metálicos essenciais, tais como cobre, zinco e ferro (Fairweather-Trait e Hurrell, 1996). A maioria dos outros íons metálicos não essenciais pode atravessar membranas celulares por difusão passiva, o que requer que o complexo metálico tenha baixo peso molecular e usualmente possua carga neutra, além de um grau aceitável de resistência à hidrólise. Como as membranas biológicas possuem uma grande quantidade de lipídios, complexos lipofílicos podem cruzar a membrana muito mais rápido do que os compostos hidrofílicos (Heeg e Jurisson, 1999).

Ligantes sintéticos planejados para síntese de compostos de coordenação podem permitir a obtenção de novos agentes terapêuticos com propriedades biológicas desejadas (Storr *et al.*, 2007; Bruijninx e Sadler, 2008). As moléculas dos ligantes podem ser potencialmente adaptadas para modular sistematicamente o potencial redox, a taxa de transferência de elétrons, e o momento magnético do íon metálico acoplado ao ligante (Guo e Sadler, 1999).

Além dessas características, compostos químicos para uso medicinal devem cumprir um critério tão óbvio quanto primordial: devem exibir um alto efeito benéfico com mínimos efeitos colaterais (Barreiro *et al.*, 2002). O benefício relativo de uma droga em comparação com a sua toxicidade pode ser expresso em termos de seu índice terapêutico. Este índice pode ser definido como a razão entre a dose necessária para matar 50% dos animais em teste (DL_{50}) e a dose necessária para

produzir uma resposta terapêutica eficaz em 50% dos animais testados (ED_{50}), ou seja Índice terapêutico = DL_{50}/ED_{50} . Um índice terapêutico elevado é claramente desejável, indicando que uma dose relativamente grande é necessária para produzir um efeito tóxico em comparação com a dose necessária para produzir um bom efeito terapêutico (Midha e McKay, 2009).

A elucidação do mecanismo de coordenação que envolve a participação de íons metálicos com funções específicas em sistemas biológicos tem impulsionado o crescimento da química bioinorgânica medicinal nos últimos anos. O sucesso do uso de complexos metálicos como agentes terapêuticos depende do controle de suas propriedades cinéticas e termodinâmicas por meio da escolha adequada do estado de oxidação, tipo e número de moléculas ligantes, e geometria de coordenação (Ahmad *et al.*, 2006; Benite *et al.*, 2007). Este mecanismo torna possível encontrar atividade e especificidade biológica e, concomitantemente, minimizar os efeitos colaterais.

Graças a esses estudos racionais na coordenação de metais e seus ligantes, muitos são os exemplos de metalofármacos empregados, com sucesso, na clínica médica (figura 3).

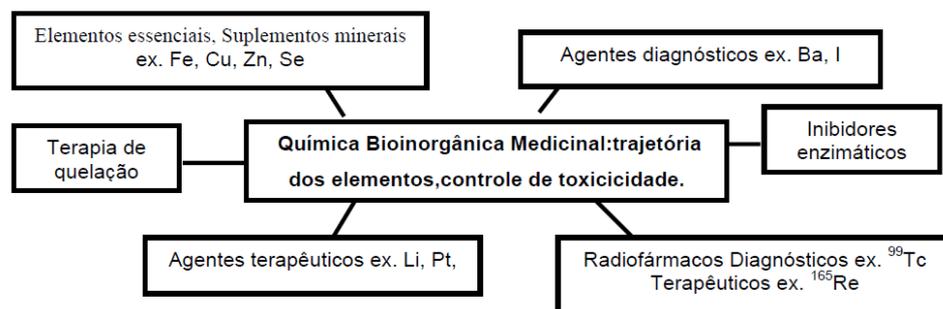


Figura 3: Áreas de atuação da química inorgânica medicinal, mostrando algumas possíveis aplicações dos metais (modificado de Guo e Sadler, 1999).

1.5 - Metalofármacos com atividade antitumoral

Atualmente, muitos compostos de coordenação metálicos, com os mais variados tipos de estruturas, têm sido sintetizados com o objetivo de simularem a ação de nucleases naturais com diferentes aplicações. Entre elas a terapêutica contra o câncer, uma vez que a integridade do material genético é essencial para a sobrevivência da célula. Mas a extraordinária resistência do DNA à hidrólise, que é bioquimicamente essencial para a manutenção da integridade do material genético, torna-se um desafio para a síntese de fosfodiesterases ou nucleases que possam promover a sua hidrólise em uma escala de tempo razoável (Sreedhara e Cowan, 2001).

O desenvolvimento de drogas antitumorais baseadas em metais foi estimulado pelo sucesso clínico do composto de coordenação *cis*-diaminodicloroplatina(II) (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], cisplatina) e seus análogos (Brabec, 2002). Com a descoberta de que este composto inibia o crescimento de células cancerígenas por atuar sobre o DNA, confirmou-se que compostos de coordenação podem interagir com a dupla fita do DNA. Tal interação pode ocorrer de diferentes formas: (a) interações não covalentes (eletrostática); b) interações covalentes; (c) interação por intercalação; (d) interação por oxidação; (e) interação via hidrólise (Hecht, 1996).

Além do DNA, outras macromoléculas, como RNA e proteínas, podem servir como alvo para diferentes tipos de complexos metálicos. No entanto, devido ao grande sucesso clínico da cisplatina, acredita-se que a interação com o DNA seja a principal forma de ação dos compostos de coordenação metálicos. O mecanismo de ação da cisplatina já está completamente descrito na literatura e serve de parâmetro para a elucidação de mecanismos de ação de novos compostos.

1.5.1 – Cisplatina

Em 1964, estudando o efeito de campos elétricos no crescimento bacteriano, Barnett Rosenberg descobriu de forma acidental que compostos de platina inibiam o processo de divisão celular (Rosenberg *et al.*, 1965). Posteriormente, os compostos *cis*-diaminodicloroplatina(II) (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]) e *cis*-diaminotetracloroplatina(IV) (*cis*-[PtCl₄(NH₃)₂]) foram identificados como os compostos de platina responsáveis pelo efeito citotóxico (Rosenberg *et al.*, 1967; Rosenberg, 1971). Em 1978, a cisplatina foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer de ovário e testículo (Reedijk *et al.*, 1987). Desde então, outras gerações de compostos de platina surgiram, com o objetivo de serem menos tóxicos para o organismo e de tratarem tipos de tumores que se tornaram resistentes à cisplatina. O composto cisplatina sem dúvidas foi um marco na introdução de compostos metálicos para o tratamento do câncer e serviu como um estímulo para a pesquisa de uma variedade de outros compostos metálicos com propriedades antitumorais e com grande potencial para serem usados na prática clínica contra o câncer (Thompson e Orvig, 2006).

A Cisplatina e outros compostos relacionados, como a oxaliplatina, carboplatina, nedaplatina e lobaplatina (figura 4) são importantes agentes quimioterapêuticos usados amplamente no tratamento de muitos tumores, incluindo cânceres de testículo, ovário, bexiga, cervical, cabeça, pescoço e pulmão (Weiss e Christian, 1993; Lebwohl e Canetta, 1998; Rosenberg, 1999; Wong e Giandomenico, 1999; Jordan e Carmo-Fonseca, 2000; Gonzalez *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Wang e Lippard, 2005; Jones e Thornback, 2007).

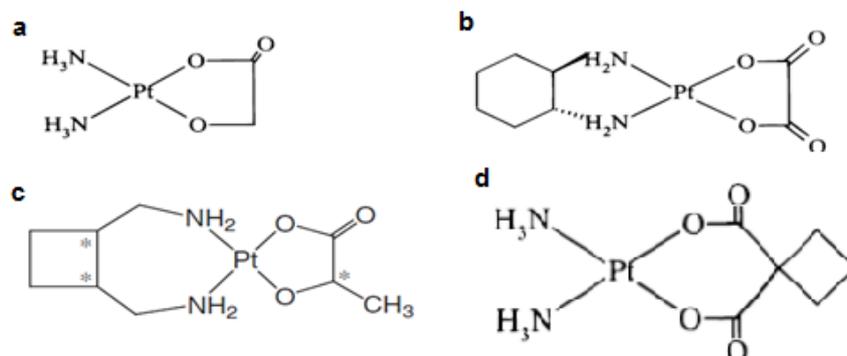


Figura 4: Estrutura dos outros compostos contendo platina: Nedaplatina (a), Oxaliplatina (b), Lobaplatina (c) e Carboplatina (d).

Em alguns casos, como para o câncer de testículo, a taxa de cura pode ultrapassar 90%, chegando a 100% quando detectado precocemente (Zhang e Lippard, 2003; Wang e Lippard, 2005). Apesar do sucesso da cisplatina no tratamento do câncer de testículo, sua efetividade no tratamento de outros cânceres é mais limitada devido aos mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos das células tumorais (Kartalou e Essigmann, 2001).

A molécula de cisplatina apresenta dois ligantes lábeis (íons cloreto) em configuração *cis* e é administrada aos pacientes pela via intravenosa. A concentração de cloreto no sangue é de 100 mM, alta o suficiente para suprimir a hidrólise do composto, permitindo que a droga chegue às células na forma neutra (Reedijk, 2003).

A cisplatina entra na célula por difusão passiva (Jamieson e Lippard, 1999) e também por transporte ativo mediado por transportadores *cooper Ctr1p* em leveduras e mamíferos (Ishida *et al.*, 2002). Dentro da célula, a concentração de cloreto é de 4 mM, o que resulta na hidrólise da cisplatina. Os íons cloreto são então substituídos por moléculas de água, gerando espécies aquosas positivamente carregadas que podem reagir com sítios nucleofílicos de algumas macromoléculas intracelulares, formando aductos em proteínas, RNA e DNA (figura 5). Esses aductos por sua vez, bloqueiam a replicação e a transcrição do DNA induzindo morte celular através de mecanismos de apoptose ou necrose (Fuertes *et al.*, 2003).

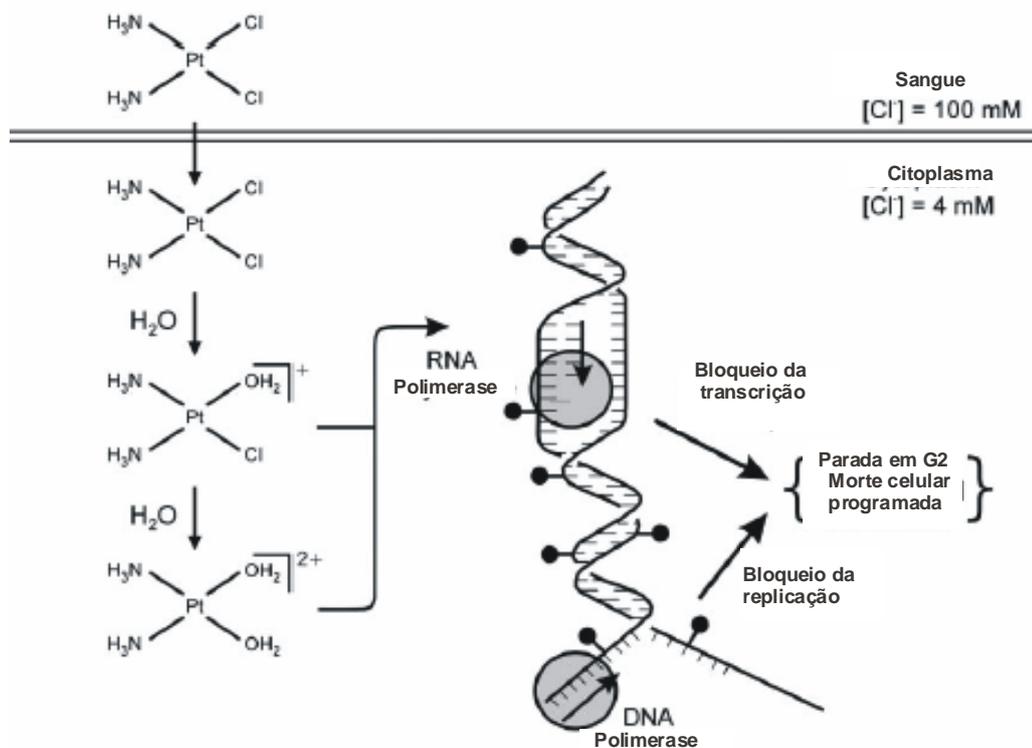


Figura 5: Estrutura molecular da *cis*-diaminodichloroplatina(II) (cisplatina) e seu mecanismo de ação (modificado de Kartalou e Essigmann, 2001).

Vários tipos de aductos podem ser formados entre a cisplatina e o DNA (figura 6). Os principais tipos de aductos formados são:

- Aductos monofuncionais, onde cada átomo de platina faz apenas uma ligação com o DNA.
- Aductos bifuncionais, onde cada átomo de platina se liga a duas posições do DNA. Este tipo de ligação pode ocorrer de três formas:
 - 1 – Intrafitas ou Intracadeias: quando as duas ligações ocorrem na mesma fita do DNA.
 - 2 – Interfitas ou Intercadeias: quando cada ligação é feita em uma fita diferente do DNA.
 - 3 - Intermolecular: quando uma ligação da platina é feita com o DNA e a outra com uma proteína ou aminoácido.

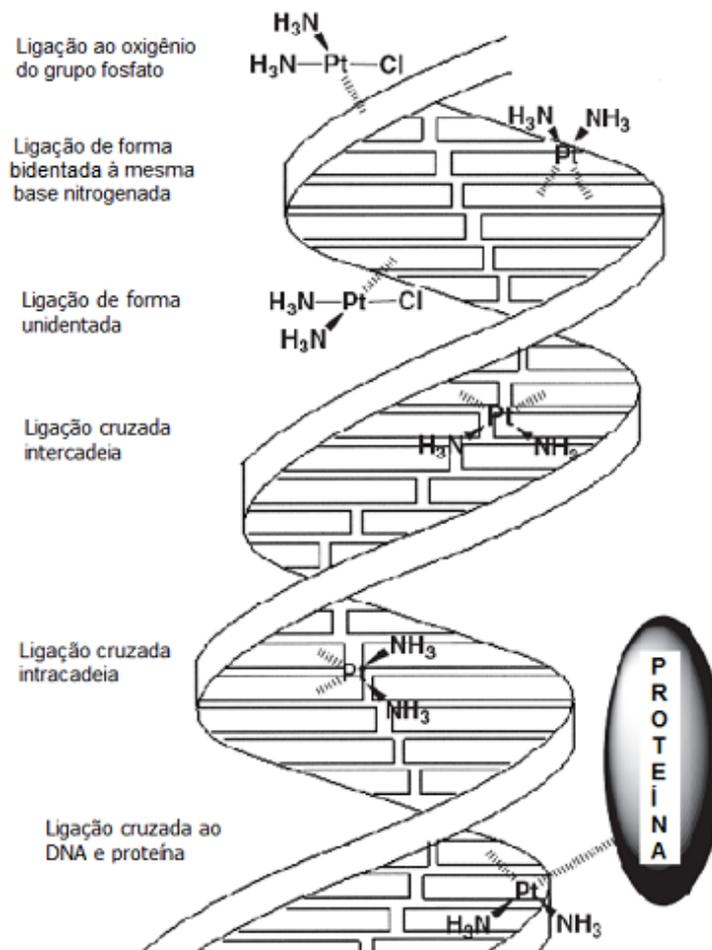


Figura 6: Formação de aductos da cisplatina com o DNA e proteínas (modificado de Jones e Thornback, 2007).

A inibição da síntese de DNA por cisplatina foi inicialmente indicada como a responsável por sua atividade antitumoral. Contudo, subsequentes estudos mostraram que a inibição da síntese de DNA não estava correlacionada com a sensibilidade de diferentes linhagens celulares à droga (Sorenson e Eastman, 1988). Posteriormente, foi proposto que a cisplatina mata as células tumorais por induzir o bloqueio do ciclo celular em G2 e por ativar mecanismos apoptóticos (Chu, 1994).

A proteína supressora tumoral p53 é uma potente ativadora da apoptose, e células cancerígenas deficientes de p53 são menos responsivas à terapia com cisplatina (Gallagher *et. al.*, 1997). O gene que codifica a proteína p53, *TP53*, é o mais frequentemente mutado em cânceres humanos, sendo que a proteína é encontrada inativa em aproximadamente 50% dos tumores. Esse fator de transcrição é considerado um “guardião do genoma”. Ele está presente em uma

forma inativa em células normais, e torna-se funcional quando ativado em resposta ao estresse celular. A ativação de p53 leva à expressão de vários genes alvos responsáveis pela parada do ciclo celular ou apoptose, dependendo do ambiente celular (Bouchet *et al.*, 2006).

Existem evidências de que as células podem ser mortas pela cisplatina de uma maneira independente de p53, o que implica a presença de outras vias apoptóticas (Jordan e Carmo-Fonseca, 2000). Uma das vias alternativas pode envolver o produto de um gene relacionado a p53, a proteína p73. O gene p73 codifica proteínas com habilidade de induzir apoptose. A cisplatina induz a ativação da tirosina cinase c-Abl, um mediador essencial que interrompe o ciclo celular em resposta a um dano causado no DNA, potencializando a atividade pró-apoptótica de p73. Esses resultados sugerem que os sinais de dano no DNA são canalizados através de c-Abl para p73 (Jordan e Carmo-Fonseca, 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos vêm demonstrando que a cisplatina também pode agir de uma maneira independente da interação com o DNA nuclear. Alguns autores inclusive questionam a participação do núcleo no processo de morte celular programada induzida por cisplatina (Sheikh-Hamad, 2008). Liu e Baliga, em 2005, demonstraram que a morte por apoptose induzida por cisplatina de células epiteliais dos túbulos renais (LLC-PK1) ocorre devido ao estresse do retículo endoplasmático e ativação da caspase 12. A procaspase 12 é localizada na fração citoplasmática do retículo e é expressa em altos níveis nos rins. O retículo endoplasmático também regula apoptose por acionar a mitocôndria a partir de diversos estímulos extrínsecos e intrínsecos e por iniciar a morte celular por conta própria (Breckenridge *et al.* 2003). Dentre esses estímulos está o complexo ciclina Cdk2, que mostrou promover estresse do retículo endoplasmático com concomitante morte por apoptose em células do túbulo proximal dos rins de camundongos (TKPTS). O estudo mostrou que a morte por apoptose não ocorre nessas células quando o complexo ciclina Cdk2 é inibido (Yu *et al.* 2007). Isso demonstra a importância de sinais citoplasmáticos para promoção de morte celular programada induzida por cisplatina.

Cullen e colaboradores, 2007, ressaltam a importância da interação da cisplatina diretamente com o DNA mitocondrial para indução de apoptose em células

de câncer de cabeça e pescoço. De fato alguns estudos recentes demonstram que a cisplatina forma aductos preferencialmente com o DNA mitocondrial, sendo esses aductos muito mais comuns do que os formados com o DNA nuclear (Yang *et al.*, 2011; Podratz *et al.*, 2011). Isso pode ser atribuído ao fato da mitocôndria não possuir um sistema de reparo do DNA, semelhante ao existente no núcleo.

Outros prováveis reguladores da apoptose induzida por cisplatina incluem a expressão de proteínas da família Bcl-2, ativação de cascatas de quinases induzidas por estresse e a perda dos telômeros (Stresser *et al.*, 1994; Sanches-Perez *et al.*, 1998; Ishibashi e Lippard, 1998).

1.5.2 – Resistência à cisplatina

A principal limitação na aplicação clínica da cisplatina e dos outros derivados de platina tem sido o desenvolvimento de resistência dos tumores a essas drogas (Boulikas e Vougiouka, 2003).

Sabe-se hoje que alguns tipos de câncer são insensíveis ao tratamento com cisplatina, enquanto outros desenvolvem resistência somente durante a quimioterapia. A resistência a drogas baseadas em platina pode ocorrer por diversos mecanismos, incluindo aumento do efluxo da droga, sua inativação, alterações no seu alvo, processamento do dano induzido pela droga (reparo de aductos) e evasão da via de apoptose (figura 7) (Brabec e Kasparkova, 2002; Morin, 2003; Siddik, 2003; Torigoe, 2005).

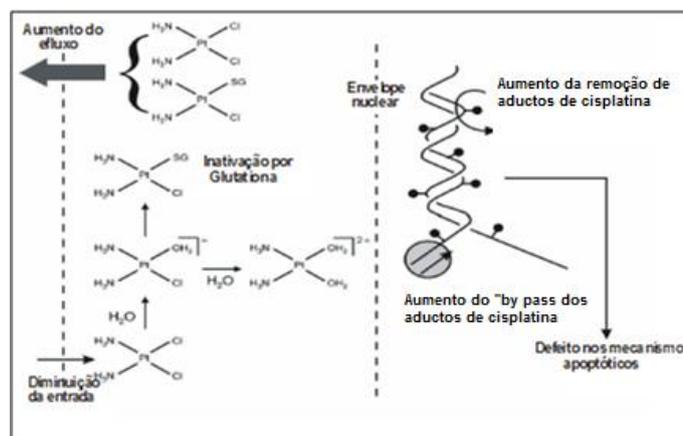


Figura 7: Mecanismos de resistência à cisplatina (modificado de Katalou & Essigmann, 2001).

O acúmulo reduzido de cisplatina intracelular pode surgir devido à diminuição da captação ou pelo aumento do efluxo da droga, o que é frequentemente observado em linhagens de células resistentes à cisplatina. O inibidor da sódio-potássio ATPase, ouabaína, inibe a captação da droga. O acúmulo de cisplatina é potássio-dependente (mesmo que a cisplatina não seja transportada para células pela bomba de sódio-potássio), o que sugere que o acúmulo é dependente do potencial de membrana celular (Andrews *et. al.*, 1988). Além disso, vários aldeídos inibem a captação, presumivelmente formando bases de Schiff com proteínas de membrana. De forma interessante, uma proteína de membrana de 48 kDa é expressa em níveis mais baixos nas células resistentes à cisplatina, apontando um decréscimo na acumulação intracelular da droga (Bernal *et. al.*, 1990).

Além dos mecanismos para captação reduzida da cisplatina, a diminuição do acúmulo celular de cisplatina pode acontecer por um aumentado efluxo da droga pelas células. Algumas células resistentes à cisplatina superexpressam uma proteína de 200 kDa. Estas células exibem um acúmulo reduzido de cisplatina, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida no efluxo da cisplatina (Kawai *et al.*, 1990). Além disso, a bomba de extrusão glutaciona S-conjugada dependente de ATP pode expulsar a cisplatina conjugada à glutaciona e pode estar envolvida na redução da concentração de cisplatina intracelular em células resistentes a esta droga (Chen *et. al.*, 1998).

O reparo do DNA é tido como o principal mecanismo de resistência à quimioterapia baseada em cisplatina. Em células humanas, a maioria das ligações cruzadas entre as fitas de DNA feitas pela cisplatina é removida principalmente pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (*NER-Nucleotide Excision Repair*) (Zamble *et. al.*, 1996, Kartalou e Essigmann, 2001). Esse mecanismo atua nos aductos cisplatina-DNA da cromatina. Por isso, a maneira como os nucleossomos modulam o NER nos aductos formados pela cisplatina no DNA é de grande interesse. Modificações pós-traducionais de histonas, como fosforilação e acetilação, podem modular NER a partir de um dano na cromatina, causando mudanças na estrutura do nucleossomo, aumentando a acessibilidade de outras proteínas. Esses eventos facilitam a ligação de complexos remodeladores e proteínas de reparo ao

nucleossomo, estimulando dessa forma o reparo do DNA e ajudando as células a sobreviverem ao estresse induzido pela cisplatina (Brabec e Kasparkova, 2005).

Embora o mecanismo de NER seja o principal meio pelo qual as células tumorais adquirem resistência à cisplatina, há evidências de mecanismos celulares de reparo adicionais que também podem afetar a eficácia antitumoral desta droga (Beljanski *et. al.*, 2004).

O reparo por recombinação homóloga (RR) e a síntese de translesão (TLS) fornecem rotas pelas quais células podem continuar o processo de replicação mesmo na presença dos aductos, bloqueando a forquilha de replicação. RR e TLS são consideradas vias de tolerância a danos no DNA, pois elas permitem que as células completem a replicação e mitose, aumentando, assim, a frequência de mutações e recombinações. Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que eram deficientes em RR e TLS individualmente foram hipersensíveis quando expostas à cisplatina (Doetsch *et. al.*, 2001).

Outro mecanismo importante de resistência à cisplatina ocorre devido a um sistema de reparo celular intrínseco conhecido como *Mismatch repair* (MMR). O papel primário do MMR é a correção de erros durante a replicação do DNA, supressão da recombinação, interação com outras vias de reparo do DNA, regulação dos pontos de checagem do ciclo celular e indução de apoptose (Meyers *et. al.*, 2004). O *status* do MMR de uma célula pode influenciar sua resposta a uma variedade de agentes quimioterapêuticos. Observações recentes sustentam a visão de que o mecanismo de MMR pode mediar a citotoxicidade da cisplatina frente às células tumorais e que uma disfunção nesse tipo de reparo do DNA pode resultar em resistência ou tolerância de células tumorais à cisplatina (Papouli *et. al.*, 2004).

Alterações na expressão de oncogenes (como c-fos, c-myc, H-ras, c-jun, e c-abl) e de genes supressores tumorais (como p53) também têm sido relacionadas com a resistência celular à cisplatina. Porém, como uma mudança na expressão destes genes pode levar a efeitos pleiotrópicos sobre a homeostase celular, o mecanismo relacionado à resistência não está completamente esclarecido (Kartalou e Essigmann, 2001).

1.5.3 - Compostos metálicos que não contêm platina

A utilização de compostos de platina no tratamento do câncer levantou a hipótese de que outros metais de transição pudessem ser usados para o mesmo fim. Como as propriedades químicas dos metais de transição variam bastante, é de se esperar que efeitos sobre células tumorais, bem como o mecanismo de ação, sejam diferentes daqueles observados para a cisplatina. Contudo, o movimento de outros compostos metálicos, da bancada para a clínica médica, para o tratamento do câncer, ainda é bastante lento (Clarke *et al.* 1999).

Muitos grupos de pesquisa, incluindo o grupo de química bioinorgânica da UENF, têm direcionado esforços para o desenvolvimento racional de novos compostos metálicos que possam ser usados contra diferentes tipos de células tumorais (Clarke *et al.* 1999; Brabec, 2002; Brabec e Kasparkova, 2005; Sun *et al.*, 2007; Ohlschlager *et al.*, 2011). Vantagens teóricas da utilização de íons metálicos de transição que não a platina envolvem: 1) Sítios de coordenação adicionais, 2) mudanças no estado de oxidação, 3) alterações na afinidade pelo ligante e na cinética de substituição, 4) abordagens para terapia fotodinâmica e 5) baixo custo (Brabec e Nováková, 2006).

Dentre os vários íons metálicos conhecidos, compostos contendo gálio, rutênio e titânio já demonstraram efeitos contra células tumorais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e estão sendo testados clinicamente. Outros como ferro, zinco, cobre, cobalto e ouro estão em fase pré-clínica, porém resultados satisfatórios podem ser destacados frente a diversas linhagens tumorais (Jones e Thornback, 2007; Ott e Gust, 2007).

O gálio é o segundo metal, depois da platina, mais usado no tratamento do câncer. Compostos de gálio têm demonstrado efeitos positivos em ensaios clínicos de fase II para o tratamento de linfomas e câncer de bexiga, e em combinação com outros agentes (vimblastina), para o tratamento de carcinoma metastático urotelial e câncer de ovário resistente à cisplatina (Chitambar, 2010). Pode ser ainda usado em conjunto com o paclitaxel, para tratar cânceres de prognóstico reservado (Clarke *et al.* 1999; Collery *et al.*, 2002). Outros estudos também demonstraram que compostos de gálio possuem atividade antitumoral contra metástase originada de neoplasia medular (Warrel, 1997), contra células de neuroblastoma resistentes à

cisplatina (Shekya *et al.*, 2006) e, mais recentemente, contra carcinoma escamoso de pescoço e cabeça (KaluDerović *et al.*, 2011).

Um dos primeiros complexos de gálio a ser avaliado foi o maltolato de gálio, $[\text{GaIII}(\text{L}^{\text{maltolato}})_3]$ (figura 8a). Este composto apresenta uma absorção oral de 75%, muito superior à do nitrato de gálio (25%), o que permite obter concentrações terapêuticas de gálio no sangue, sem ser necessário administrar grandes quantidades do fármaco. Recentemente, foi demonstrado que o maltolato de gálio apresenta efeitos antiproliferativos significativos em células de carcinoma hepatocelular, induzindo apoptose em concentrações de 30 μM . Este efeito de apoptose se verificou em células do carcinoma hepatocelular mas não em células normais do fígado (Chua *et al.*, 2006).

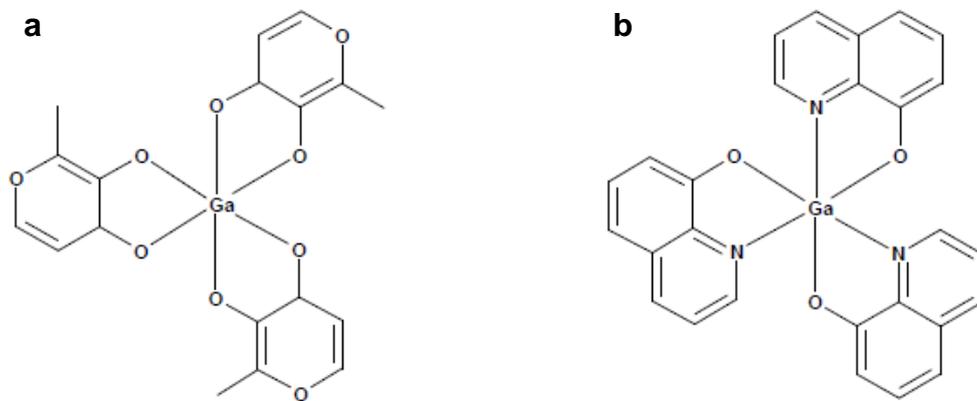


Figura 8: Dois dos compostos de gálio mais utilizados em ensaios clínicos. (a) $[\text{GaIII}(\text{L}^{\text{maltolato}})_3]$ e (b) $[\text{GaIII}(\text{L}^{\text{quinolinato}})_3]$ ou KP46.

O composto $[\text{GaIII}(\text{L}^{\text{quinolinato}})_3]$, conhecido como KP46 (figura 8b) e estabilizado com o ligante bidentado 8-hidroxiquinolinato, mostrou-se um ótimo candidato a fármaco antitumoral, devido ao seu elevado grau de biodisponibilidade. Ensaio clínicos de fase I demonstraram que este composto apresenta potencial terapêutico contra o câncer renal (Chitambar, 2010). Foi ainda observado *in vitro* que o KP46 apresenta efeitos citotóxicos em células H549, de carcinoma pulmonar humano (Ott e Gust, 2007) e que sua atividade citotóxica é dez vezes superior à do GaCl_3 . Outros resultados promissores foram obtidos *in vitro* através da combinação do KP46 com compostos de Pt, sugerindo que pode existir um efeito sinérgico de diferentes regimes quimioterapêuticos. Do ponto de vista biológico, sabe-se que o

KP46 tem afinidade para a transferrina e promove a inibição da ribonucleotídeo redutase (Collery *et al.*, 2002).

Muitos compostos de rutênio com estado de oxidação +2 ou +3 mostraram atividade antitumoral, especialmente contra cânceres metastáticos (Zhang e Lippard, 2003; Allessio *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2007). Acredita-se que, assim como o gálio, o rutênio também possui similaridades físico-químicas com o ferro, o que permitiria que o organismo conseguisse se proteger do excesso de rutênio através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro como a transferrina e a albumina (Allardyce e Dyson, 2001).

Complexos de rutênio são de grande interesse, pois as propriedades destes compostos podem ser moduladas pela escolha do ligante, o que significa que estes complexos podem ser preparados visando uma vasta gama de aplicações (Beirith *et al.*, 1999). Dentre as vantagens de se usar complexos de rutênio, principalmente com ligantes piridínicos, no desenvolvimento de drogas está a possibilidade de sintetizar complexos estáveis com maior previsibilidade de estruturas (Clarke, 2002). No entanto, os compostos de rutênio mais utilizados são aqueles que contém ligantes heterocíclicos do tipo (HL)[*trans*-RuCl₄L₂] sendo L um ligante nitrogenado heterocíclico (Bratsos *et al.*, 2007).

Alguns complexos de rutênio demonstraram ter um efeito similar às drogas de platina(II) já utilizadas no tratamento de tumores, porém apresentam uma toxicidade mais baixa, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Brabec e Nováková, 2006; Harris *et al.* 2009). Como a estrutura octaédrica dos complexos de Ru(II) e Ru(III) difere da estrutura plano quadrática da Pt(II), acredita-se que compostos de rutênio possuam mecanismos de ação diferentes dos derivados de platina, porém mantendo o DNA como alvo principal (Brabec e Nováková, 2006). No entanto, já foi demonstrado que compostos de rutênio podem interagir com proteínas, como a transferrina (Allardyce e Dyson, 2001).

Até o momento somente dois compostos heterocíclicos de Ru(III) são utilizados em ensaios clínicos, [ImH][*trans*-RuCl₄(DMSO)Im] , conhecido como NAMI-A (figura 9a), onde *Im* = *imidazol*, e [InH][*trans*-RuCl₄In₂], conhecido como KP1019 (figura 9b), onde *In* = *indazol*. Ambos já aprovados em ensaios clínicos de Fase I (Hartinger *et al.*, 2008; Levina *et al.*, 2009).

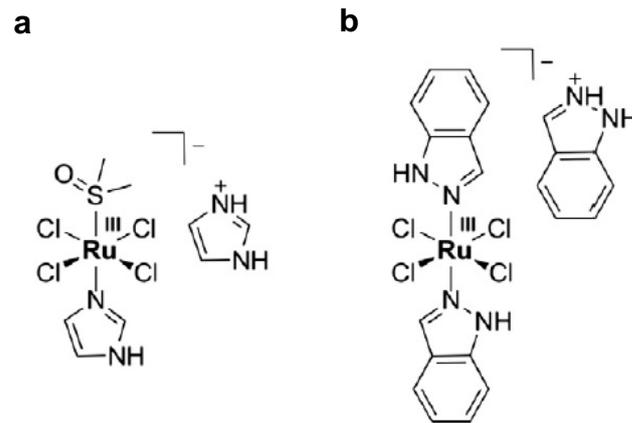


Figura 9: Os principais compostos de Ru(III) utilizados em ensaios clínicos. (a) [ImH][*trans*-RuCl₄(DMSO)Im] ou NAMI-A e (b) [InH][*trans*-RuCl₄In₂] ou KP1019.

O composto NAMI-A mostrou ser eficiente contra metástases de tumores experimentais (Zorzet *et al.*, 2000), metástases de tumores bem estabelecidos (Sava *et al.*, 2002), além de prevenir o aparecimento de novos focos metastáticos (Sava *et al.*, 2003; Bergamo e Sava, 2007). Além disso, esse composto vem se mostrando menos tóxicos, para o organismo, do que a cisplatina (Bergamo *et al.*, 1999). Já o complexo KP1019 apresentou atividade contra uma ampla gama de modelos tumorais, incluindo carcinoma de cólon (Kaptiza *et al.*, 2005).

O complexo de rutênio NAMI-A pertence a uma classe de compostos de rutênio sintetizados com o objetivo de, seletivamente, atingir a massa de um tumor sólido e somente ser ativado no microambiente tumoral, reduzindo a toxicidade para os tecidos normais. Quando foi testado sobre linhagens tumorais *in vitro*, mostrou-se pouco efetivo. Apesar desta baixa atividade *in vitro*, NAMI-A apresenta atividade antitumoral bastante significativa *in vivo* (Pluim *et al.*, 2004). Em estudo clínico de fase I, observou-se que a infusão de NAMI-A (300mg/dia; cinco dias durante três semanas) mostrou-se segura para 24 pacientes com câncer de pequenas células de pulmão, sendo que um paciente permaneceu estável por 21 semanas (Rademaker-Lakhai *et al.*, 2004). Este efeito antitumoral é atribuído a propriedades antimetastáticas deste agente que, *in vivo*, demonstra efeito antiangiogênico pela inibição do fator de crescimento para células endoteliais (VEGF), que pode ser resultado da inativação do óxido nítrico (Vacca *et al.*, 2002).

O composto KP1019 apresenta efeitos inibitórios na proliferação celular *in vitro* e, quando é internalizado pelas células, induz apoptose predominantemente por ativação do processo apoptótico através da via intrínseca mitocondrial, causando estresse oxidativo e um conseqüente dano ao DNA. A captação do KP1019 pelas células é mediada por mecanismos dependentes ou independentes da transferrina (Piccioli *et al*, 2004). Após incubação das células com este agente, 55% do rutênio intracelular é encontrado na região do núcleo da célula. Este valor é significativamente elevado, se compararmos com a cisplatina, onde apenas 10% do metal intracelular é encontrado no núcleo das células (Heffeter *et al*, 2004). Resultados promissores em ensaios clínicos de fase I são demonstrados utilizando este composto. Cinco de seis pacientes com tumores sólidos, submetidos a este quimioterápico, permaneceram com a doença estabilizada. Apenas alguns efeitos colaterais foram observados (Clarke, 2002).

Titânio e paládio também se destacam como metais promissores na síntese de complexos com atividade antitumoral, com alguns complexos já aprovados para ensaios clínicos. O dicloreto de titanoceno (figura 10) mostrou atividade *in vitro* e *in vivo* contra uma gama de linhagens de carcinomas humanos, incluindo gastrointestinal e mama (Köpf-Maier, 1994).

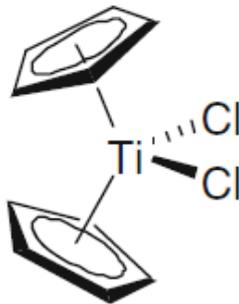


Figura 10: Estrutura molecular do dicloreto de titanoceno, $[\text{Ti}(\text{Cp})_2\text{Cl}_2]$.

O dicloreto de titanoceno foi aprovado para ensaios clínicos de fase I em 1998, com dose máxima tolerada de 140 mg/m² por semana. No entanto, esse composto mostrou certos efeitos colaterais como nefrotoxicidade e elevação nos níveis de creatina e bilirrubina (Christodoulou *et al.*, 1998). Além disso, o dicloreto

de titanoceno mostrou baixa eficácia em ensaios clínicos de fase II em pacientes com carcinomas renal ou de mama metastáticos (Luemmen *et al.*, 1998).

Alguns compostos de paládio são sintetizados com os mesmos ligantes utilizados para síntese de compostos de platina (Butour *et al.*, 1997). Entretanto, complexos de paládio, principalmente Pd(II), são aproximadamente 10^5 vezes mais reativos que seus análogos de platina, o que leva a uma baixa atividade antitumoral, devido à rápida hidrólise do composto em condições fisiológicas. Isso leva à formação de espécies muito reativas que são incapazes de atingir seus alvos farmacológicos (Alberto *et al.*, 2011).

Devido à similaridade com os compostos de platina, acredita-se que os compostos de paládio possuam mecanismo de ação similares aos seus análogos de platina (Curic *et al.*, 1996; Butour *et al.*, 1997).

Os compostos de paládio de maior interesse para a clínica médica são os ciclopaladados, devido à sua baixa toxicidade quando comparados aos compostos de platina, sugerindo que podem ter uma atividade antitumoral mais específica *in vivo* (Alberto *et al.*, 2011). A atividade citotóxica de diversos compostos ciclopaladados foi testada *in vitro* contra várias linhagens tumorais humanas, e os resultados mostraram que a maioria desses complexos são mais eficientes que a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, levando as células a um processo de morte por apoptose (Caires, 2007). Um dos compostos de paládio mais promissores é o organopaladado contendo o ligante derivado da tiosemicarbazona, $[Pd(C_9H_{11}N_3S)Cl_2]$, que apresentou atividade citotóxica *in vitro* frente a certos tipos de células cancerígenas, sendo a mesma superior àquela do análogo com platina(II) (Ananias *et al.*, 2003; Moro *et al.*, 2004).

Dentre os compostos metálicos com atividade antitumoral, acredita-se que complexos contendo metais endógenos como o ferro, zinco e cobre, sejam menos tóxicos ao organismo.

Os primeiros complexos de ferro que mostraram alguma atividade antitumoral foram os sais de ferroceno, picrato e tricloroacetato, com o íon ferro em estado de oxidação +3 (Köpf-Maier *et al.*, 1979). Estes compostos apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* em modelo animal do tumor de Ehrlich, observando-se uma redução de 48% no tamanho dos tumores subcutâneos dos animais tratados

com o composto. A atividade citotóxica destes compostos não é baseada na ligação direta com o DNA, e sim na capacidade de formar espécies reativas de oxigênio, levando ao dano no DNA (Ott e Gust, 2007). Outros compostos contendo ferro (figura 11) foram sintetizados e testados, mostrando efeito apoptótico ou antiproliferativo *in vitro*, como, por exemplo, um derivado ferroceno do tamoxifeno (Ott e Gust, 2007).

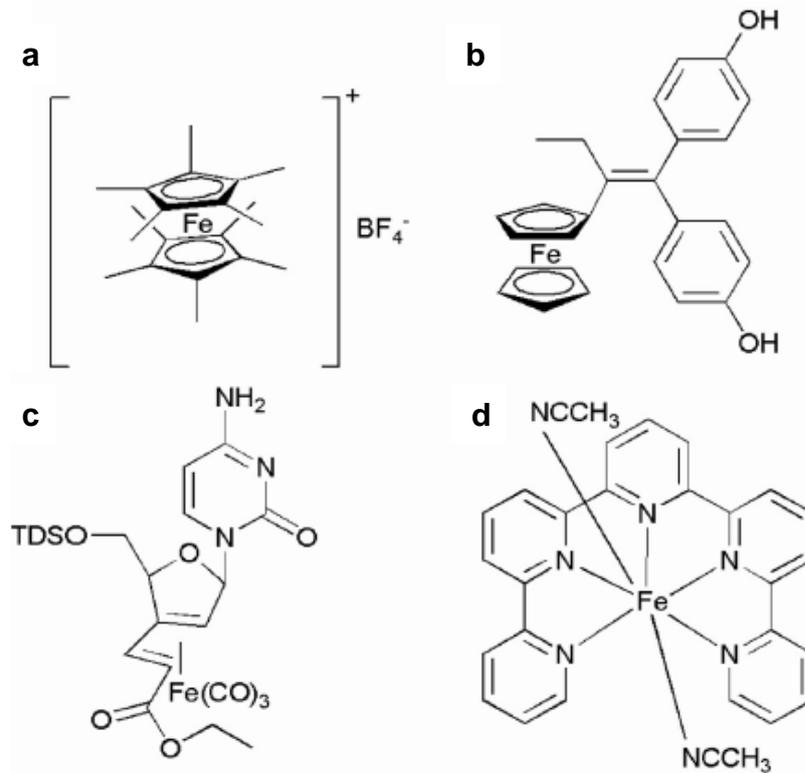


Figura 11: Alguns complexos de ferro com atividade antitumoral. (a) $DEMFc^+$. (b) derivado ferroceno do tamoxifeno. (c) derivado ferro nucleosídeo. (d) complexo de ferro com ligante piridil pentadentado.

Nos últimos anos, várias famílias de complexos de cobre têm sido estudadas como potenciais agentes antitumorais. No entanto, pouco ainda é compreendido sobre o mecanismo de ação desses compostos. Em 2009, Marzando e colaboradores publicaram uma revisão que apresenta mais de 50 compostos de cobre com atividade contra os mais variados tipos de células neoplásicas.

Um dos principais grupos de compostos de coordenação de cobre é conhecido como Casiopeínas®, que possui a estrutura genérica $[Cu(N-N)(O-N)]^+$ ou $[Cu(N-N)(O-O)]^+$, onde N-N denota uma molécula de bipyridina ou fenantrolina,

N–O indica um α -aminoacidato ou peptídeo e O–O representa acetilacetionato ou salicilaldeído. Alguns desses compostos já tiveram sua citotoxicidade comprovada contra diversas linhagens sensíveis e resistentes à cisplatina e contra tumores xenográficos em camundongos. (Avelar e Martínez, 2012). O mecanismo de ação das casiopeínas ainda esta sob investigação. No entanto, alguns trabalhos mostram que esses compostos podem interagir com a molécula de DNA, provomendo clivagem da molécula *in vitro* como *in vivo* através da liberação de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Müller *et al.*, 2007; Murillo *et al.*, 2011)).

Em 2008 Bull verificou que os compostos de coordenação de cobre obtidos a partir do BMPA e HBPA (figura 12), além de apresentarem maior atividade biológica do que os seus respectivos ligantes, mantiveram a característica dos ligantes de partida induzindo morte celular por apoptose em células de origem leucêmica. Esses ligantes também foram testados por nosso grupo, complexados aos metais zinco e ferro. No entanto, a atividade antitumoral foi muito inferior quando comparada aos compostos de cobre.

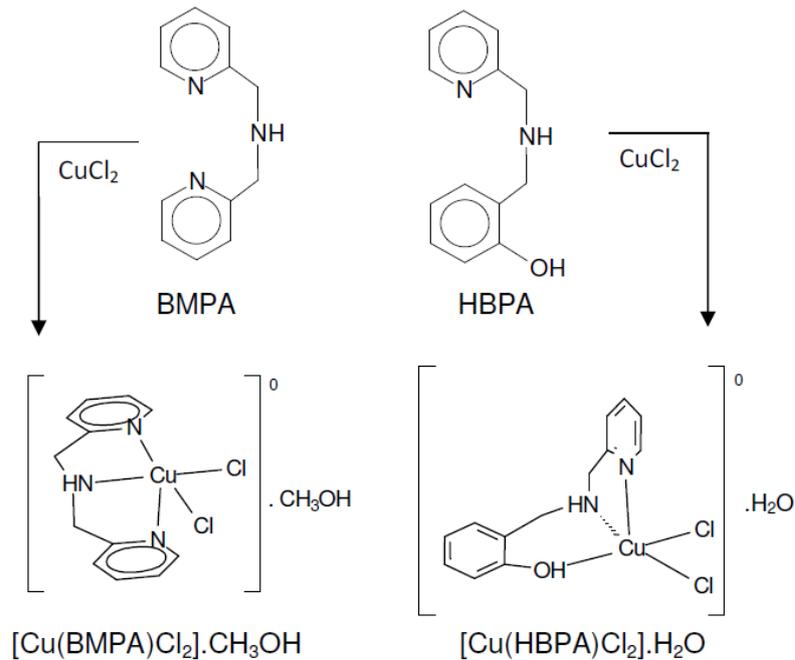


Figura 12: Compostos orgânicos e de coordenação com atividade antitumoral avaliados pelo grupo de Bioinorgânica da Universidade Estadual do Norte Fluminense, (BMPA) bis-(2-piridilmetil)amina, (HBPA) (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (Bull, 2008).

Em outro trabalho, Borges demonstrou que um composto mononuclear e dois compostos binucleares de ferro complexados ao ligante *N,N*-bis-(piridil-(2-il-metil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina) (HPCINOL) possuem atividade antineoplásica com indução de apoptose em cinco linhagens de células leucêmicas *in vitro* (Borges, 2008).

Em 2010, Jiang e colaboradores realizaram um estudo sobre as atividades antitumorais de diversos compostos de coordenação com diferentes centros metálicos (Cu, Zn, Co, e Ni), frente a linhagens de células tumorais de pulmão e fígado (Jiang, *et al.*, 2010). Neste trabalho, foi sintetizado um novo pró-ligante que apresenta em sua estrutura anéis aromáticos conjugados visando à interação por intercalação na molécula de DNA. Os resultados foram promissores, e mostraram que os compostos de cobre foram os mais ativos quando comparado aos demais.

Rocha, 2011, demonstrou que complexos de zinco contendo os ligantes que possuem em sua estrutura anéis aromáticos fundidos, como no caso a ftalimida e β -naftol possuem atividade antineoplásica frente às linhagens leucêmicas THP-1 e U937.

Atualmente, nosso grupo vem testando compostos de cobre, ferro, zinco, cobalto, gálio e platina complexados a ligantes híbridos. Os novos ligantes obtidos foram reagidos com os respectivos sais metálicos para a obtenção dos compostos de coordenação. Lopes demonstrou em 2012 que compostos de cobre contendo esses ligantes híbridos possuem uma potente atividade antineoplásica, similar à do composto cisplatina para as linhagens de células leucêmicas U937 e THP-1 *in vitro*.

Além dos compostos já mencionados, outros compostos metálicos que vêm se mostrando promissores para o tratamento do câncer são: Compostos de ródio, como os compostos $Rh_2(\mu-O_2CR)_4$ (onde R=Me, Et, Pr) que exibem significativa atividade antitumoral *in vivo* contra tumores L1210, carcinoma ascítico de Ehrlich, sarcoma 180 e linhagens tumorais P388 (Chifotides e Dunbar, 2005). Alguns grupos de compostos de vanádio também apresentam atividade antitumoral, sendo o principal exemplo o dicloreto de vanadoceno (Cp_2VCl_2), que demonstrou atividade contra certos tipos de tumores comparável ao observado com o composto cisplatina (Noblía *et al.*, 2005). Além de compostos contendo lantânio (Kostova *et al.*, 2005),

cério (Kostova *et al.*, 2005) e zircônio (Kostova e Momekov, 2006), que também apresentaram bons resultados frente a diferentes tipos de células tumorais.

Os mecanismos de ação desses compostos ainda não são bem documentados. No entanto, estudos mostram que alguns deles podem interagir com o DNA, enquanto outros possuem mecanismos de ação distintos, tendo como alvos outras moléculas, como proteínas e RNA. De qualquer forma, esses compostos disparam mecanismos variados de morte celular. Dentre todos os mecanismos de morte celular, três são os mecanismos de morte mais estudados: necrose, autofagia e apoptose.

1.6 - Mecanismos de Morte Celular

1.6.1 – Necrose

A necrose é o mecanismo pelo qual as células morrem de modo não-fisiológico, promovendo lesões tissulares e a sintomatologia de várias doenças. A morte é patológica ou "acidental" quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e falta de oxigênio, como no infarto do miocárdio e na gangrena (Alberts *et al.*, 1997; Junqueira e Carneiro, 2000).

As lesões podem ter ainda origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus. Esse tipo de morte celular foi a única conhecida pelos cientistas mais antigos e é morfológicamente caracterizada por um inchaço celular e de organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons (em especial sódio e cálcio), normalmente bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que incha e se rompe. A ruptura libera no tecido vizinho o conteúdo celular, rico em proteases e outras substâncias tóxicas. Além da toxicidade direta para as células vizinhas, o derrame gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória: alguns tipos de glóbulos brancos convergem para o tecido em necrose

e fagocitam as células mortas. A inflamação, típica da necrose, é importante para limitar infecções e remover restos de células, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem também danificar tecidos normais vizinhos, às vezes de maneira devastadora (Kanduc *et al.*, 2002).

1.6.2 – Autofagia

Autofagia é uma via, evolutivamente conservada, para degradação em massa de proteínas na qual um sistema de vesículas autofagocíticas engolfa proteínas-alvo ou organelas e os entregam aos lisossomos para serem degradadas (Carew, *et al.* 2008). Por ser um processo fisiológico a autofagia possui um papel chave para a regulação da homeostasia do organismo, gerando energia durante processos como a fome prolongada e outras situações de estresse celular extremo (Yorimitsu e Klionsky 2005). Além disso, alguns estudos com modelos de camundongo nocautes demonstraram a importância da autofagia no desenvolvimento dos mamíferos. A ausência dos genes *Atg5* ou *Atg7*, que são chaves para o sistema semelhante a ubiquitina da via autofágica, mostrou ser letal para os camundongos ainda na fase embrionária (Komatsu *et al.* 2005).

Alguns trabalhos vêm demonstrando que o processo de autofagia possui um papel importante na biologia do câncer. Contudo, ainda há controvérsia sobre a maneira em que a autofagia age no desenvolvimento do câncer, na progressão da doença, manutenção do tumor e durante a resposta terapêutica. Coletivamente, os dados nessa área indicam que o processo autofágico funciona como uma via supressora tumoral, que bloqueia o desenvolvimento do câncer por prevenir a proliferação das células alteradas. Por exemplo, camundongos, mesmo que heterozigotos para *Becn1-1* (iniciador chave da via autofágica) são mais propensos ao desenvolvimento de tumores (Yue *et al.* 2003). Assim, agentes que estimulam a autofagia possuem um valor potencial na quimioprevenção do câncer.

De maneira paradoxal, uma vez que o câncer tenha se desenvolvido, o processo autofágico torna-se desnecessário. A degradação de material citoplasmático e organelas por autofagia é essencial para prevenir falha

bioenergética quando as células tumorais se encontram em ausência de nutrientes e oxigênio, um microambiente tumoral característico. Neste caso, o processo autofágico promoveria a sobrevivência das células tumorais e conseqüentemente, a progressão da doença (Lum *et al.* 2005).

Mesmo com esse papel controverso no desenvolvimento do câncer, diversos estudos demonstram que a autofagia pode ser ativada por diferentes agentes terapêuticos, incluindo trióxido de arsênio, rapamicina, inibidores de histona deacetilases, tamoxifeno e irradiação ionizante (Shao *et al.* 2004; Takeuchi *et al.* 2005; Ertmer *et al.* 2007). Embora alguns desses estudos tenham demonstrado que a eficácia desses agentes está relacionada com a morte celular por autofagia, tais conclusões precisam ser rigorosamente testadas, principalmente porque muitos desses agentes também induzem o processo de morte celular por apoptose. De uma forma geral, a maioria das investigações vêm demonstrando que o processo de apoptose é um processo de morte celular mais eficiente do que o processo de morte por autofagia (Carew, *et al.* 2008).

1.6.3 – Apoptose

A principal forma de suicídio celular é conhecida como apoptose ou morte celular programada. Tal mecanismo é central para vários processos biológicos e pode ser ativado em resposta a estímulos específicos ou a várias formas de injúria ou estresse celular (Hannun, 1997). A apoptose é essencial para a regulação do desenvolvimento, geração do sistema imune e, posteriormente, para a manutenção da homeostase em tecidos adultos, sendo conseqüência de uma taxa balanceada de morte versus proliferação celular (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

Igualmente, ou talvez mais importante, é o papel da apoptose como causa de doenças. A desregulação da taxa apoptótica pode resultar em severas síndromes patológicas. Ataque cardíaco ou falência do fígado estão associados à “morte súbita” de áreas ou órgãos inteiros, enquanto certas síndromes degenerativas são resultados de uma morte celular neuronal progressivamente mais lenta. De maneira

controversa, a baixa taxa de apoptose pode promover a sobrevivência e o acúmulo de células anormais que, por sua vez, podem evoluir para a formação de um tumor ou levar a doenças autoimunes (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

Atualmente, muitos dos eventos moleculares necessários para a ativação, amplificação e execução dos mecanismos apoptóticos já foram elucidados (Johnstone *et al.*, 2002). O processo de apoptose é caracterizado por distintas mudanças morfológicas e bioquímicas, incluindo *blebbing* de membrana, encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, externalização de fosfatidilserina e inicialização de transdução de sinais apoptóticos. A cascata de reações bioquímicas pode incluir novos mRNA e síntese de proteínas, expressão de p53, ativação de caspases, ação de endonucleases ativadas por caspases e ativação de Fas ligante ou receptor de TNF. Esse processo é seguido por uma rápida fagocitose das células apoptóticas por células vizinhas. Distinguindo-se assim, da morte por necrose, pela ausência de uma resposta inflamatória (Renehan *et al.*, 2001; Kiechle e Zhang, 1998).

A morte por apoptose é definida por distintas mudanças morfológicas e bioquímicas mediadas por uma família de proteínas conhecida como caspases, que são expressas como zimogênios e são proteoliticamente processadas a um estado ativo seguindo um estímulo apoptótico (Johnstone *et al.*, 2002). Examinando os padrões de ativação de caspases seguido de diferentes estímulos apoptóticos, pelo menos duas vias distintas foram elucidadas. A via intrínseca e a via extrínseca de morte, que podem ser divididas em três estágios: sinalização, ativação e execução (figura 13) (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998; Yu e Zhang, 2003).

Sinais de morte originados por estresse celular, incluindo radiação e drogas quimioterapêuticas, ativam um programa intrínseco de apoptose que é amplamente mediado pelas mitocôndrias. A liberação de citocromo C por essas organelas no citoplasma induz a formação de um complexo oligomérico contendo citocromo C e Apaf-1. Este complexo, chamado de apoptossomo, promove a ativação catalítica da caspase-9, que posteriormente cliva e ativa a caspase-3 efetora resultando em uma subsequente degradação de substratos de morte celular. Juntamente com o citocromo C, as proteínas SMAC/DIABLO e Omi/HtrA2, localizadas nas mitocôndrias, também são liberadas no citoplasma. Uma vez liberadas, essas duas

proteínas se ligam a uma proteína inibidora de caspases conhecida como XIAP, essa ligação ajuda a ativar os mecanismos de apoptose por neutralizar a função inibitória dessa proteína (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

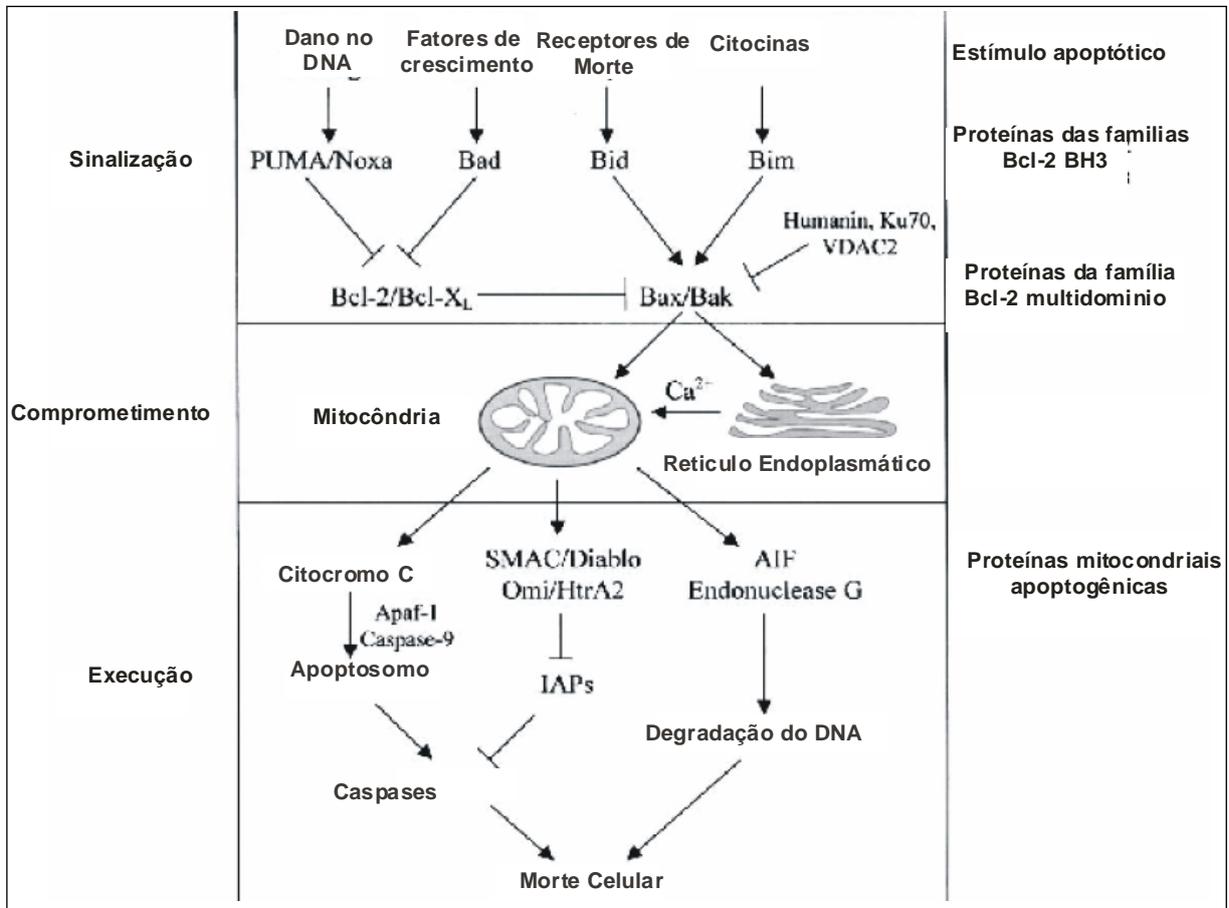


Figura 13: Vias de ativação e mecanismos centrais da apoptose (modificado de Yu e Zhang, 2003).

Em contraste à via intrínseca, a estimulação de receptores de morte ativa um programa extrínseco de apoptose que, frequentemente, não necessita do envolvimento mitocondrial. Receptores de morte formam um subgrupo da superfamília de receptores para fator de necrose tumoral (TNF) que incluem TNF-R1, CD95, e receptores de ligantes indutores de apoptose relacionados a TNF (TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligands). Todos os receptores de morte são caracterizados por possuírem um motivo intracelular chamado de domínio de morte (DD – *Death domain*). Após o reconhecimento do ligante, os receptores de morte interagem via seus domínios de morte com os domínios de morte de proteínas adaptadoras tais como FADD. Essas proteínas adaptadoras também contêm um

segundo motivo de interação, o domínio efetor de morte, que facilita a ligação dessas proteínas à caspase-8 iniciadora, para formar o complexo sinalizador indutor de morte (DISC – *Death inducing signaling complex*). Depois de ser ativada por DISC, a caspase-8 cliva e ativa a caspase-3, resultando em futura clivagem de alvos celulares. Em alguns tipos de células, contudo, a progressão linear da formação de DISC até a ativação da caspase-3 é insuficiente para completar o programa de morte celular, e a amplificação do estímulo gerado pelos receptores de morte torna-se necessária. Isso é feito pela participação da via mitocondrial (Zimmerman, 2001; Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

Um mecanismo conhecido pelo qual a via mitocondrial auxilia na apoptose após ativação dos receptores de morte é através da clivagem de Bid (um membro pró-apoptótico da família Bcl-2) mediada pela caspase-8. Uma vez clivada, tBid (*Truncated Bid*) transloca-se para a mitocôndria, aonde ela pode induzir a liberação de citocromo C, SMAC e Omi/HtrA2. Desta maneira, os sinais gerados pelos receptores de morte podem ser amplificados através da formação de ativação do apoptossomo, o qual aumenta a ativação das caspases efetoras (Zimmerman, 2001; Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

A falha em ativar a apoptose representa o principal obstáculo no tratamento do câncer com drogas antitumorais. Adicionalmente, acredita-se que defeitos na maquinaria apoptótica possuem um papel importante na sobrevivência e proliferação de células neoplásicas na ausência de quimioterapia, por permitir que subpopulações de células danificadas e geneticamente instáveis evitem ser eliminadas. O reconhecimento de discretas anormalidades em células tumorais que ocorrem no centro da maquinaria apoptótica e em suas vias regulatórias de sinalização tem destacado a maquinaria apoptótica como um novo e interessante alvo potencial para o desenvolvimento racional de drogas antitumorais (Cummings *et al.*, 2004; Kamb e Lassota, 2004).

1.7 – Apoptose, câncer e quimioterapia

Uma característica marcante da tumorigênese é o crescimento desordenado de uma população clonal de células que se tornam insensíveis a certos sinais apoptóticos (Hanahan e Weinberg, 2000). O mecanismo de apoptose é um paradigma para o entendimento de como as drogas antitumorais funcionam e como os tumores evadem sua ação. A descoberta de que a apoptose contribui para a atividade antitumoral de muitas drogas quimioterapêuticas permitiu repensar como um mecanismo de resistência intrínseca para a maioria das drogas poderia surgir. Defeitos na maquinaria apoptótica permitem às células neoplásicas sobreviverem além do período normal de vida, acumular mutações genéticas, sustentar o crescimento sob condições de hipóxia e estresse oxidativo, e ainda promover a angiogênese tumoral. Além disso, essa célula também deve evadir a resposta imune antitumoral do hospedeiro (Yu e Zhang, 2003).

A apoptose é regulada em muitos níveis, incluindo os estágios de iniciação, transdução, amplificação e execução, e mutações que afeta cada um desses estágios foram encontradas em células tumorais. A expressão alterada ou a mutação de genes que codificam proteínas chaves da maquinaria apoptótica podem fornecer às células cancerígenas uma vantagem intrínseca de sobrevivência e uma inerente resistência a drogas quimioterapêuticas. Essa dupla modificação resulta em crescimento e expansão de células neoplásicas em primeira instância e pode frustrar uma subsequente terapia (Johnstone *et al.*, 2002).

Drogas com diferentes estruturas e especificidades induzem mudanças morfológicas características associadas com apoptose, e agora acredita-se que vias apoptóticas contribuem para a ação citotóxica da maioria das drogas quimioterapêuticas (Lowe e Lin, 2000). Em conjunto, essas observações indicam que células podem interpretar um estímulo induzido por droga da mesma maneira que um estímulo fisiológico, tais como hipóxia e privação de fatores de crescimento (Johnstone *et al.*, 2002). Por isso, proteínas que regulam as vias de apoptose são

potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas e de outras abordagens para o tratamento do câncer (Vermeulen *et. al.*, 2005).

2 – JUSTIFICATIVA

Dentre as várias enfermidades que acometem o homem, o câncer tem mostrado ser uma das doenças de mais difícil tratamento, visto que ainda não estão disponíveis no mercado fármacos ou métodos de controle mais práticos e efetivos.

A quimioterapia ainda continua sendo a principal forma de tratamento para a maior parte dos cânceres, onde aliada a outros tratamentos como a radioterapia e a cirurgia alcança boas taxas de cura e regressão do tumor. Em relação à quimioterapia, a grande limitação continua sendo o problema gerado pelos efeitos tóxicos dos fármacos usados durante o tratamento, os quais não são seletivos para o tumor e acabam provocando fortes efeitos colaterais no organismo do paciente, como náuseas, perda de cabelo e imunodeficiência, que estão entre os mais comuns.

Outro problema muito comum é resistência dos tumores às principais drogas, intrínseca a alguns tumores e adquirida por outros durante o tratamento, elevando o número de falhas terapêuticas e mortes.

Por isso, a identificação de novos agentes antitumorais mais potentes, seletivos, e menos tóxicos, permanece como uma das mais urgentes metas para o combate ao câncer.

O Grupo de Pesquisa em Química de Coordenação e Bioinorgânica da UENF vêm obtendo novos compostos com centros metálicos de ferro, gálio, cobalto, platina, cobre e zinco que podem atuar hidroliticamente sobre o DNA, ou que apresentam as características estruturais necessárias à atividade de nuclease sintética e atividade antineoplásica (Fernandes, *et al.*, 2006; Parrilha, *et al.*, 2008; Borges, 2008).

Tais resultados tem servido de motivação para a continuação das pesquisas na busca de novos compostos capazes de interagir com diferentes alvos celulares, como DNA, RNA e proteínas, visando a obtenção de novos metalofármacos com potenciais aplicações terapêuticas futuras.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo a síntese e a caracterização de compostos de coordenação de cobre(II) e zinco(II) contendo ligantes N,O-doadores e a unidade naftoil, bem como a avaliação da atividade antineoplásica dos mesmos frente a 2 linhagens de células de câncer de pele melanômico e 2 linhagens de células leucêmicas.

3.2 - Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os ligantes apresentados nas figuras 17 e 18.
- Sintetizar complexos de cobre(II) e zinco(II) com os ligantes propostos.
- Caracterizar os compostos de coordenação obtidos pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho, análise elementar, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e medidas de condutividade.
- Avaliar o efeito dos compostos na viabilidade celular.
- Avaliar a porcentagem do tipo de morte celular induzida pelos compostos frente as linhagens leucêmicas U937 e THP-1 (humanas) e melanômicas B16F10 (murina) e SK-MEL5 (humana), através de técnicas quantitativas e qualitativas.
- Determinar a toxicidade dos compostos frente a células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) e a Dose Letal Mediana (DL₅₀) dos compostos em camundongos C57/BL6.
- Analisar a provável via de apoptose pela qual os compostos atuam.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Caracterização Físico-Química dos precursores, ligantes e complexos

As sínteses dos ligantes e dos complexos foram realizadas utilizando-se solventes de grau PA adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck) sem prévia purificação. As reações orgânicas foram acompanhadas por análise cromatográfica em camada delgada (TLC) (sílica gel 60 F254 – Merck) utilizando-se solvente adequado. As reações foram realizadas sob agitação magnética e, para aquelas que necessitaram de aquecimento, foram utilizadas placas de agitação com aquecimento marca Fisatom ou Fisher e termômetro para o controle da temperatura do banho. Quando necessário, as soluções foram concentradas no evaporador rotatório marca Fisatom.

4.1.1 - Espectroscopia no infravermelho

As análises de infravermelho dos compostos sintetizados foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de infravermelho Shimadzu FT-IR 8300 (Laboratório de Ciências Químicas - UENF). As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr, já as amostras oleosas foram analisadas na forma de filme sobre pastilhas de KBr, utilizando diclorometano como solvente. A região do espectro analisada foi de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.1.2 - Análise elementar

As determinações das porcentagens do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um analisador elementar Thermo Scientific, modelo FLASH 2000 CHNS/O Analyzer, no LCQUI-UENF.

4.1.3 - Condutivimetria

As medidas de condutividade foram realizadas em um condutivímetro de bancada microprocessado Biocristal modelo PHN. Os compostos foram analisados a 25 °C na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/dm³, utilizando-se dimetilformamida grau espectroscópico como solvente. O condutivímetro foi previamente calibrado com uma solução padrão de KCl ($1412 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25 °C). As medidas foram realizadas no LCQUI-UENF.

4.1.4 - Espectrometria de massas com ionização por electrospray [ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS]

Os espectros de massas foram obtidos empregando-se um espectrômetro de massas (MicroTOF LC *Bruker Daltonics*) do Laboratório de Ciências Químicas – UENF. A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray* em modo positivo [ESI(+)-MS]. As amostras foram dissolvidas em uma solução de MeOH/H₂O (1:1) e aplicadas no aparelho por infusão direta.

4.2. Sínteses dos Compostos Orgânicos

4.2.1 - Síntese do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1)

O precursor P1 (figura 14) foi sintetizado a partir da reação de condensação entre 2-(aminometil)piridina (3,0 mL; 28,5 mmol; A) e salicilaldeído (3,0 mL; 28,5 mmol; B) e posterior redução com borihidreto de sódio, em 40 mL de metanol, utilizando-se a rota sintética previamente descrita na literatura (Neves *et al.*, 1993). Rendimento: 5,0 g (83%).

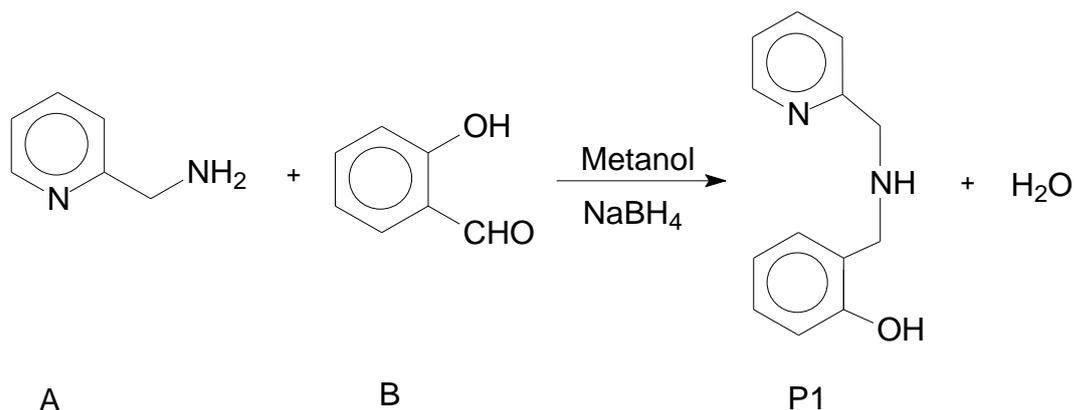


Figura 14: Esquema de síntese do precursor P1 (Neves *et al.*, 1993).

4.2.2 - Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2)

O precursor P2 (figura 15) foi sintetizado segundo Corrêa (2006). Em um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 200 mL de álcool etílico, 10,0 g de α -naftol (0,07 mol; D) e 4,0 g de KOH. Após 10 minutos sob agitação magnética à temperatura ambiente, foram adicionado lentamente 33,6 mL de 1-cloro-2,3-epoxipropano (E). A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 48h, sendo acompanhada por TLC, empregando hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 9:1. em seguida, a solução foi concentrada no evaporador rotatório a 50 °C, dissolvida em 30 mL de água, transferida para um funil de separação e extraída 4 vezes com 20 mL de éter etílico gelado. A fase etérea foi isolada e seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. A solução foi concentrada no evaporador rotatório a 50 °C, sendo obtido um óleo castanho-avermelhado. Rendimento: 7,0 g (50%).

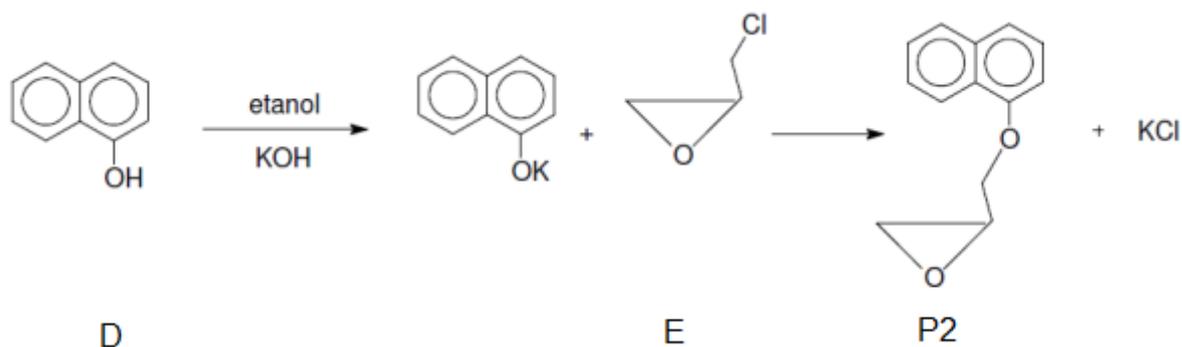


Figura 15: Esquema de síntese do precursor P2 (Corrêa, 2006).

4.2.3 - Síntese do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P3)

A rota sintética do precursor P3 (figura 16) foi realizada a partir da reação do β -naftol (F) com 1-cloro-2,3-epoxipropano (E), em meio básico, segundo Corrêa (2006), descrito no item 4.2.2. A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 h e a reação foi acompanhada por TLC, empregando-se hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 9:1. O óleo obtido solidificou após 3 dias em repouso. O produto foi recristalizado em hexano a quente, originando um sólido branco. Rendimento: 7,32 g (52%).

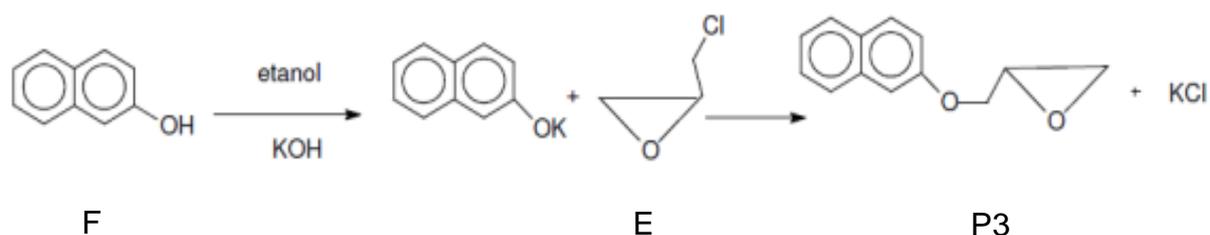


Figura 16: Esquema de síntese do precursor P3 (Corrêa, 2006).

4.2.4 - Síntese do composto 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L α)

O composto L α foi sintetizado segundo Lopes (2012), conforme a rota sintética mostrada na figura 17. A um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 100 mL de etanol, foram adicionados 5,00 g (0,025 mol) do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2) e 5,35 g (0,025 mol) do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1). A solução foi mantida sob agitação magnética a 75 °C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC empregando-se hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 6:4. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório a 50 °C obtendo-se um óleo castanho-escuro. Este foi dissolvido em clorofórmio e sucessivas extrações foram realizadas empregando-se solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica, adicionou-se MgSO₄ anidro e, após 20 minutos, a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50 °C até a secura. Obteve-se um óleo castanho-avermelhado. Rendimento: 7,3 g (69%).

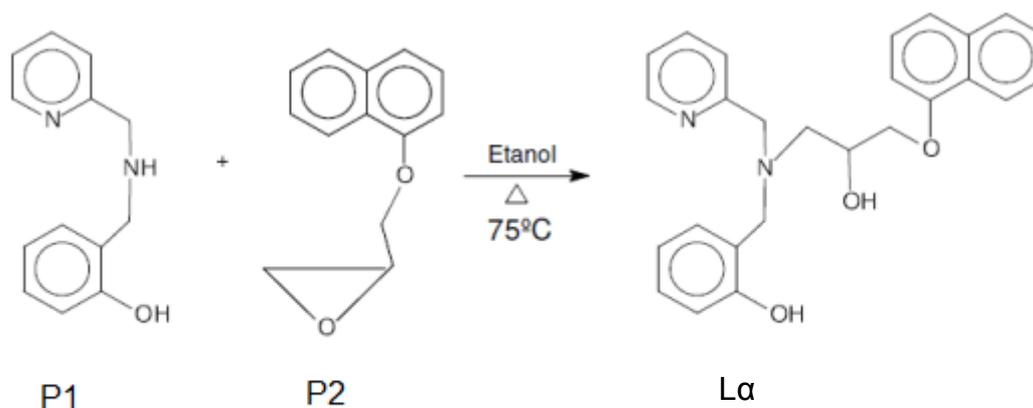


Figura 17: Esquema de síntese do composto L α (Lopes, 2012).

4.2.5 - Síntese do composto 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L β).

O composto L β foi sintetizado segundo Lopes (2012), conforme a rota sintética mostrada na figura 18. A um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 130 mL de etanol, foram adicionados 5,00 g (0,025 mol) do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P3) e 5,35 g (0,025 mol) do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1). A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente (27 °C) e a reação foi acompanhada por TLC, empregando-se acetato de etila e hexano como eluentes na proporção de 6:4. Após 24 horas, ocorreu a precipitação de um sólido branco, o qual foi filtrado a vácuo e recristalizado em hexano a quente. O composto cristalino obtido foi mantido em dessecador. Rendimento: 6,0 g (58%).

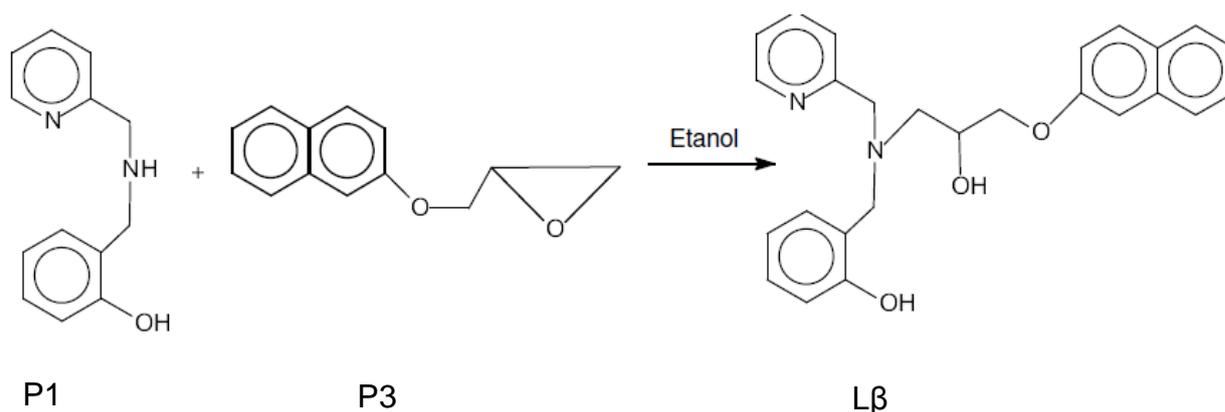


Figura 18: Esquema de síntese do composto L β (Lopes, 2012).

4.3. Síntese dos compostos de coordenação

4.3.1 - Síntese do complexo $[Cu(L\alpha)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ ($Cu\alpha$)

O complexo $Cu\alpha$ foi obtido de acordo com Lopes (2012). Para sua obtenção (figura 19), reagiu-se uma solução de 10,0 mL de acetato de etila e metanol, na proporção de 3:2, contendo 0,414 g (1,0 mmol) do pró-ligante 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol ($L\alpha$) e 0,1705 g (1,0 mmol) de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$. A solução de coloração verde foi mantida em repouso à temperatura ambiente. Após três dias, foi obtido um sólido microcristalino verde. Rendimento: 0,488 g (84%). Ponto de fusão: 140 °C. Análise elementar de C, H e N calculada C = 53,72%, H = 5,90%, N = 4,45%; encontrada: C = 53,49%, H = 5,59%, N = 4,58%.

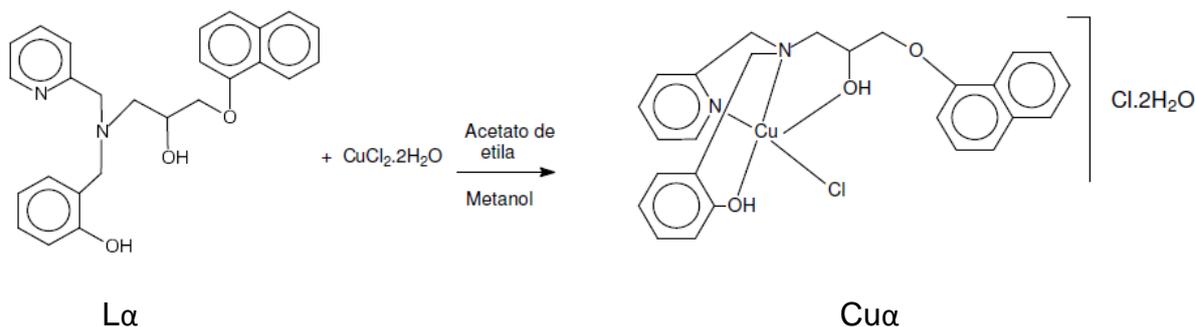


Figura 19: Rota sintética para obtenção do complexo $Cu\alpha$ (Lopes, 2012).

4.3.2 - Síntese do complexo $[Cu(L\beta)Cl]Cl \cdot 3H_2O$ ($Cu\beta$)

O complexo $Cu\beta$ foi obtido de acordo com Lopes (2012). Para sua obtenção (figura 20), reagiu-se 10,0 mL de uma solução de acetato de etila e metanol (3:2) contendo 0,414 g (1,0 mmol) do pró-ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol ($L\beta$) e 0,1705g (1,0 mmol) de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$. A solução de coloração verde foi mantida em repouso à temperatura ambiente e, após um dia, foi obtido um sólido microcristalino verde. Rendimento: 0,519 g (87%). Ponto de fusão: 110 °C. Análise elementar

de C, H e N calculada C = 51,82%, H = 5,30%, N = 4,75%; encontrada: C = 52,01%, H = 5,61%, N = 4,98%.

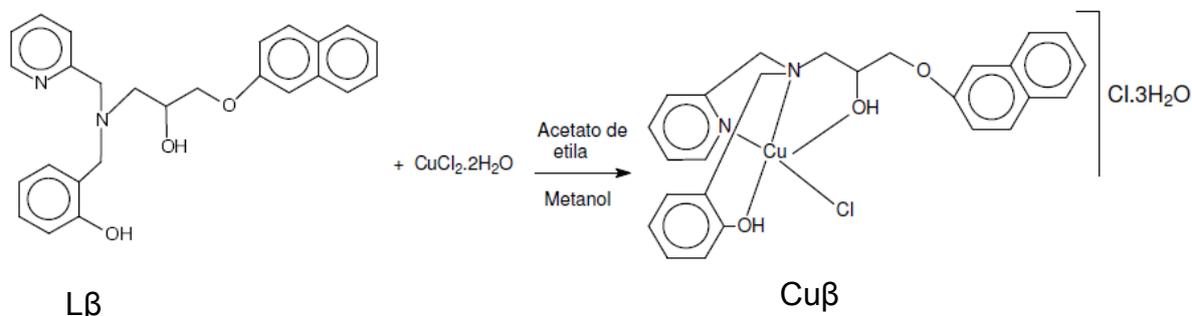


Figura 20: Rota sintética para obtenção do complexo $Cu\beta$ (Lopes, 2012).

4.3.3 - Síntese do complexo $[Zn(L_\alpha)Cl]$ ($Zn\alpha$)

Para a obtenção do complexo $Zn\alpha$ (figura 21), reagiu-se o ligante L_α (0,414 g; 1,0 mmol) e o sal de zinco $ZnCl_2$ (0,136 g; 1,0 mmol), ambos em solução etanólica (20 mL cada). A solução resultante, de aspecto branco leitoso foi mantida sob refluxo por 48 h. Ao final deste tempo, a solução foi filtrada e o complexo isolado na forma de um pó branco. Rendimento: 0,126 g (23%). Ponto de fusão: 230 °C. Análise elementar de C, H e N calculada: C = 60,72%, H = 4,90%, N = 5,45%; encontrada: C = 61,09%, H = 5,19%, N = 5,58%.

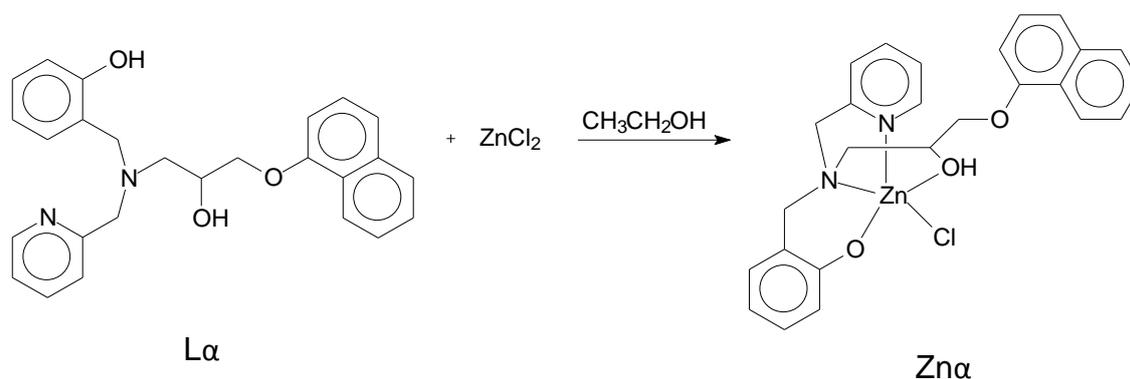


Figura 21: Esquema de síntese do complexo $Zn\alpha$.

4.3.4 - Síntese do complexo $[Zn(L_{\beta})Cl]$ (Zn_{β})

Para a obtenção do complexo Zn_{β} (figura 22), reagiu-se o ligante L_{β} (0,414 g; 1,0 mmol) e o sal de zinco $ZnCl_2$ (0,136 g; 1,0 mmol), ambos em solução etanólica (20 mL cada). A reação foi mantida sob agitação e a formação de um pó de coloração esbranquiçada foi observada. O complexo (pó) obtido foi isolado através de filtração. Rendimento: 0,1446 g (26,5%). Ponto de fusão: 235 °C. Análise elementar de C, H e N calculada: C = 60,72%, H = 4,90%, N = 5,45%; encontrada: C = 60,98%, H = 5,19%, N = 5,63%.

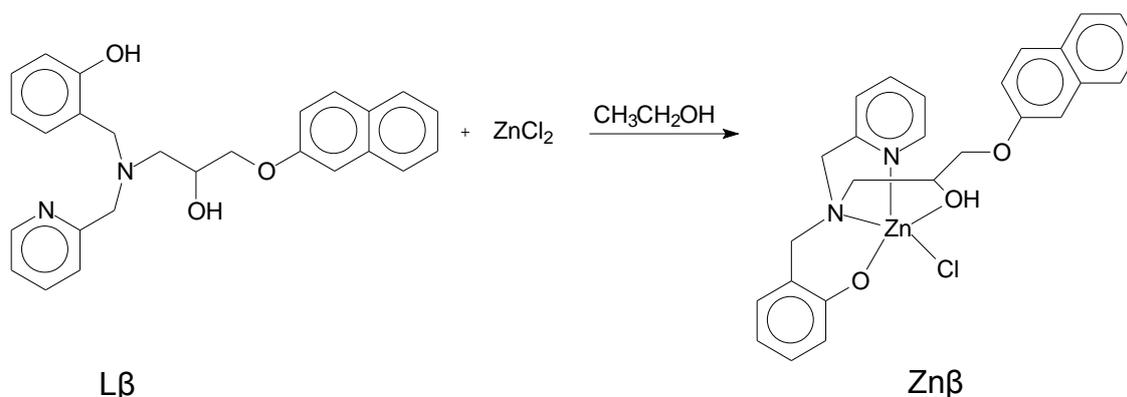


Figura 22: Esquema de síntese do complexo Zn_{β} .

4.4. Atividade biológica, *in vitro*, dos compostos

4.4.1 – Diluição, concentrações de trabalho e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação

Para a realização dos testes biológicos foram preparadas soluções, na concentração de 0,3 M dos compostos sintetizados (orgânicos e inorgânicos) e dos sais utilizados nas reações inorgânicas ($CuCl_2$ e $ZnCl_2$), empregando-se DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. Os compostos foram então diluídos até as concentrações de trabalho (200, 100, 50 e 25 μM). Para alcançar as concentrações de trabalho os compostos, previamente solubilizados em DMSO, foram diluídos em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20 $\mu g/mL$ de gentamicina (Gibco, BRL) a fim de reduzir ao máximo a concentração do DMSO, que passa a ser tóxico para

células quando acima de 5% em volume. As soluções dos compostos (em DMSO) mantiveram-se estáveis armazenadas na geladeira de 2 a 6 °C pelo período de aproximadamente 45 dias ou de -5 a -25 °C em *freezer* por tempo indeterminado.

O composto de coordenação Cisplatina foi utilizado como controle positivo em quase todos os testes biológicos.

4.4.2 - *Cultura das linhagens de células de origem neoplásica*

As linhagens de células de linfoma histiocítico (U-937), leucemia monocítica aguda (THP-1), melanoma murino (B16F10) e melanoma humano (SK-MEL5) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Todas as linhagens foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As células foram mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada e o meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.

4.4.3 - *Cultura das linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)*

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas do sangue de voluntários saudáveis. O sangue venoso foi coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (*Becton Dickinson*) contendo heparina sódica e processado pela metodologia descrita por Bennett e Breit (1994). O sangue total coletado foi lentamente adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08 g/mL), na proporção de 2:1 (20 mL de sangue para 10 mL de Ficoll), em tubos de 50 mL, e centrifugado (Centrifuga Sorval, RT7) a 1500 rpm por 40 min, a 20 °C. O plasma, que compõe a primeira camada do gradiente obtido, foi descartado e o anel de células mononucleares foi removido, lavado três vezes com meio de cultura (DMEM/F12) gelado e centrifugado a 1500 rpm por 10 min a 4 °C. Após o processo de lavagem o "pellet" formado foi ressuscitado em DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20 µg/mL de gentamicina e 0,25 µg/mL de enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) (Sigma,

S0812). As células foram mantidas em garrafas de cultura e em estufa (37 °C e 5% de CO₂) por duas horas para aderência dos monócitos. Após este período as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), presentes no sobrenadante, foram recolhidas e utilizadas para realização do teste de viabilidade celular por metabolização do MTT.

4.4.4 - Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio]

A viabilidade celular foi determinada através de microensaio colorimétrico utilizando MTT (Sigma, M2128). Tal metodologia foi descrita por Mosmann (1983), e consiste na redução do MTT a formazam, composto de cor púrpura, pela succinato desidrogenase mitocondrial. Para esse ensaio, as células leucêmicas (U937 e THP-1), melanômicas (B16F10 e SKMEL) e normais (PBMC) foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço (1x10⁶ cels/mL) em placas de 96 poços e tratadas com os compostos nas concentrações finais de trabalho (200, 100, 50 e 25 µM). Após 36 horas de incubação com os compostos foram adicionados 10 µL de MTT (Sigma, 5 mg/mL) para cada 100 µL de cultivo. As placas foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período, foram retirados 150 µL do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 µL de uma solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.5 - Determinação da Dose Letal Mediana (DL₅₀) do composto Cuα

A fim de verificar a toxicidade do composto Cuα *in vivo*, camundongos C57BL/6, de ambos os sexos, entre 18 g e 25 g foram separados em grupos de 4 animais. O composto foi inoculado na cavidade peritoneal, de modo que cada grupo recebeu uma das respectivas concentrações do composto (25, 50, 100,

200 mg/Kg⁻¹). Todos os animais foram inoculados no infectório do LBCT/CBB/UENF, com seringa de 3 mL SR e agulha hipodérmica 0,45 mm x 13 mm, NIPRO estéril. O veículo utilizado para administração do composto foi água-ultrapura. A mortalidade dos animais foi avaliada em intervalos de 24 horas por 30 dias, quando então foi determinada a Dose Letal Mediana, ou seja, capaz de matar 50% dos animais (DL₅₀).

4.4.6 - Avaliação do tipo de morte celular por Microscopia de fluorescência

Todas as linhagens neoplásicas (U937, THP-1, SKMEL-5 e B16F10), na concentração de 1x10⁶ células/mL, foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço, em placas de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de cada composto em estudo e as células foram incubadas por 12, 24 e 36 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Para células leucêmicas (não aderentes), após o período de incubação, uma alíquota de 20 µL foi retirada de cada poço, transferida para lâmina de microscopia, corada com 10 µL de solução contendo laranja de acridina, 5 µg/mL (Sigma, A6529) e brometo de etídio, 10µg/mL (Sigma E8751) e recoberta com lamínula para serem analisadas quanto à sua morfologia no microscópio de fluorescência (Axionplan – Carl Zeiss) com objetiva de 40x. Para células de melanoma (aderentes), após o período de incubação, foi adicionado 20 µL da mesma solução de brometo/laranja utilizada para células não aderentes. As células foram levadas ao microscópio invertido (Axiovert – Carl Zeiss) e contadas diretamente na placa com objetiva de 40x. Para ambos os casos (células não aderentes e aderentes) foram contadas 300 células em campos aleatórios, com diferenciação entre células normais, apoptóticas e necróticas de acordo com os parâmetros de Coligan *et al.* (1996). As células controle (branco) foram cultivadas apenas em meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL), não sofrendo assim qualquer estímulo de morte. O experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de células apoptóticas.

Foram adotados padrões convencionais com relação à morfologia e coloração das células (figura 23):

- Células vivas: possuem morfologia do núcleo intacta, DNA corado por laranja de acridina (coloração verde).
- Células em necrose: morfologia do núcleo necrótico (volumoso), corado por brometo de etídio (coloração vermelha), o que demonstra a permeabilização da membrana plasmática e permite a entrada do brometo de etídio.
- Células em apoptose: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (coloração verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não permeável ao brometo de etídio.
- Células em apoptose tardia: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (coloração vermelha), o que demonstra a permeabilização da membrana plasmática e permite a entrada do brometo de etídio.

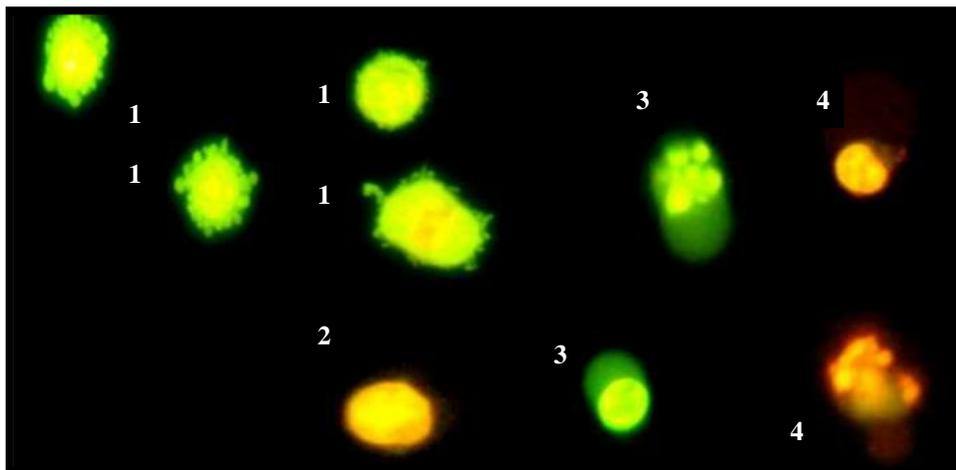


Figura 23: Microscopia de Fluorescência de células U937 evidenciando as características para classificação das células como mencionadas acima em: 1 – Normais, 2 – Necrose, 3 – Apoptose Primária e 4 – Apoptose tardia (Apoptose-necrose).

4.4.7 – Confirmação do processo de morte celular programada através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)

As linhagens U937, THP-1, B16F10 e SKMEL-5 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 em placas de 24 poços e tratadas com 50 e 100 μM do composto $\text{Cu}\alpha$, durante 12 horas. A marcação com Anexina V/PI foi feita de

acordo com o protocolo do kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit* (SIGMA-ALDRICH). Brevemente, após incubação as células foram lavadas 2 vezes em PBS e ressuspensas no tampão de ligação fornecido pelo kit (100mM HEPES/NaOH, pH 7,5, contendo 1400 mM de NaCl e 25 mM de CaCl₂). A 500 µL da solução de tampão de ligação com as células foram adicionados 5µL de Anexina V e 10 µL de Iodeto de Propídio (PI) para cada amostra. As amostras foram deixadas no escuro por exatamente 10 minutos. Imediatamente após esse tempo, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur).

4.4.8 - Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)

Células U937, THP-1, SKMEL-5 e B16F10 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 em placas de 24 poços, tratadas com 50 e 100 µM do composto Cu α e incubadas por 24 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Em seguida as células foram processadas segundo método descrito por Gong *et al.*, (1994). As células controle foram incubadas apenas com meio DMEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (2 mL) foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugado por 10 minutos a 200 xg. As células foram lavadas duas vezes com PBS. Após a lavagem foi adicionado lentamente 1 mL de etanol 70% gelado e as células foram submetidas a fixação por 30 minutos a 4 °C. Após o período de fixação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 200 xg por 5min e lavadas com tampão fosfato-citrato (200 mM, pH = 7,8). O sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 50 µL de RNase A (100 µg/mL Sigma, R4875) à temperatura ambiente por 15 min. A seguir, foram adicionados 400 µL de iodeto de propídio (concentração final 50 µg/mL; Sigma, P4170). As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur) onde foram contados 10.000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em sub-G1 foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

4.4.9 – Avaliação de fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose

As linhagens U937, THP-1, B16F10 e SKMEL-5 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 em placas de 6 poços e tratadas com 50 e 100 μM do composto $\text{Cu}\alpha$, durante 24 horas. Após incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em etanol a 70%, à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 h. Após a centrifugação, o etanol foi totalmente removido e evaporado à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 50 μL de tampão de extração (Na_2HPO_4 200mM e $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 100mM, pH 7,8) e incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Após esse tempo, foram adicionados 5 μL de RNase (1 mg/mL) em cada amostra, e uma nova incubação foi realizada a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Na última etapa, foram adicionados 5 μL de Proteinase K (1mg/ml) em cada amostra. As amostras de DNA isoladas foram então sujeitas a eletroforese durante 60 min a 60 V em gel de agarose a 1% e coradas com *GelRed Nucleic Acid Stain* (Biotium). A fragmentação do DNA foi observada e fotodocumentada em um transiluminador UV (Bio-Rad, Gel Doc™ XR+).

4.4.10 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)

Células U937, THP-1, SKMEL-5 e B16F10, foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 em placas de 24 poços, tratadas com 50 e 100 μM do composto $\text{Cu}\alpha$, e incubadas por 12 horas em estufa ($37\text{ }^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (1 mL) foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugado por 5 minutos a 400 xg. O sobrenadante foi desprezado e as células incubadas por 15 minutos em estufa ($37\text{ }^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2) com 500 μL de solução de JC-1 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluído 1:1000 em meio de cultura D-MEMF12). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 400 xg e lavadas duas vezes com 2 mL de meio de cultura D-MEMF12. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 μL de meio D-MEMF12 sem soro. A leitura das amostras foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os gráficos *Dot-plot* e a

porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

4.4.11 - *Análise ultraestrutural das mitocôndrias de células U937 por Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)*

Para verificar alterações morfológicas nas mitocôndrias das células tumorais tratadas com os compostos, as mesmas, após tratadas, foram processadas para análise por M.E.T. Células U937 foram descongeladas e deixadas crescer durante 24 horas de acordo com o item 4.4.2. Após esse tempo, o composto Cu α foi adicionado diretamente no meio das células nas concentrações de 50 e 100 μ M. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada durante 12 e 24 horas. Após o período de incubação com os compostos, as células foram centrifugadas, por 10 min a 100 xg e lavadas 3 vezes com Tampão Salino Fosfato (PBS, pH 7,2). O *pellet* foi fixado por 1 h com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato (CaCo 100 mM). Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes em uma solução de 5% de sacarose e tampão CaCo (100 mM) e pós-fixadas por 2h, protegidas da luz, em solução 1:1 de ósmio e ferrocianeto de potássio. Após o período de pós-fixação, as células foram lavadas 2x, desidratadas sequencialmente em soluções de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e deixadas *overnight* em uma solução 1:1 de acetona e resina epóxi (EPON). A solução foi então trocada por epon puro e os tubos, colocados em estufa para polimerização da resina durante 48 horas. Os blocos polimerizados foram seccionados em ultramicrótomo e as seções ultrafinas colocadas em grades de cobre. As micrografias foram tiradas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

4.4.12 – Análise do padrão de distribuição mitocondrial por Microscopia de Fluorescência

A fim de confirmar se as alterações morfológicas condiziam com um padrão de distribuição mitocondrial diferenciado e com a perda de potencial de membrana, células da linhagem leucêmica U937, na concentração de 1×10^6 células/mL, foram plaqueadas em volume de 500 μ L/poço em placas de 24 poços. Em seguida, foram adicionados 500 μ L/poço do composto $\text{Cu}\alpha$ (50 e 100 μ M) e as células foram incubadas por 12 horas em estufa (37 °C e 5% de CO_2). Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (1mL) foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugado por 5 minutos a 400 xg. O sobrenadante foi desprezado e as células, incubadas por 45 minutos em estufa (37 °C e 5% de CO_2) com 500 μ L de solução do corante para núcleo Hoechst (Invitrogen, Molecular Probes™, 1 μ g/mL em meio de cultura) e 500 μ L de solução do corante para mitocôndria MitoTracker (Invitrogen, Molecular Probes™, concentração final de 0,1 μ M em meio de cultura). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 400 xg, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 μ L de meio de cultura D-MEMF12. As amostras foram levadas ao microscópio de fluorescência (Axionplan – Carl Zeiss), analisadas em objetiva de 100x (com óleo de imersão) e fotografadas utilizando o *software* AxioVision 4.6.3 (câmera McR5).

4.4.13 – Fracionamento celular e Detecção da liberação de citocromo C

A linhagem leucêmica U937, na concentração de 1×10^6 células/mL, foi incubada com o composto $\text{Cu}\alpha$ na concentração de 50 μ M por 6, 12, 24, e 36 horas. A fração mitocondrial foi separada da fração citoplasmática para a quantificação do citocromo c em ambas as frações (Waterhouse *et. al*, 2001). O fracionamento celular foi feito de acordo com as recomendações do Kit *Cytochrome C ELISA* (Calbiochem®). Após incubação com os compostos, células U937 foram centrifugadas a 800 xg, lavadas em PBS pH 7,2 e centrifugadas novamente. As células (3×10^6 /mL) foram então permeabilizadas

em 400 μL tampão de extração citosólico contendo digitonina (sacarose, 250 mM, KCl, 70mM dm^{-3} , NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM pH 7,2, inibidor de protease 1 mg/mL e digitonina, 200 mg/mL) por 5 min no gelo. A permeabilização da membrana plasmática foi confirmada através da marcação das células com azul de trypan (0,2%). As células foram então centrifugadas a 1000 xg por 5 min a 4°C. O sobrenadante (fração citosólica) foi separado em tubo de 1,5 mL e o *pellet* foi solubilizado em 400 μL de tampão de lise mitocondrial (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton X-100 0,2%, NP-40 0,3% e inibidor de protease 1 mg/mL) seguido de centrifugação a 10,000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante contendo a fração mitocondrial foi separado em tubo de 1,5 mL e o *pellet* restante foi descartado. A quantificação de Citocromo C em ambas as frações foi feita através do ensaio de ELISA de acordo com o kit *Cytochrome C ELISA KIT* (Calbiochem®). A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.4.14 - Avaliação da atividade de caspases

Para verificar se o composto $\text{Cu}\alpha$ induz apoptose pela via mitocondrial ou pela via dos receptores de morte, foi utilizado o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)* contendo substratos para as caspases 3 e 6 (efetoras para ambas as vias), caspases 2 e 9 (ativadoras da via mitocondrial) e para as caspases 4 e 8 (ativadoras da via dos receptores de morte). O protocolo para detecção das caspases seguiu os procedimentos descritos pelo fabricante. Culturas de células da linhagem U937, contendo 1×10^6 células/mL, foram incubadas com uma concentração de 50 μM do composto $\text{Cu}\alpha$ por 3, 6, 12 horas. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 200 xg e resuspendidas em 50 μL do tampão de lise. As amostras foram centrifugadas por 1 min (10.000 xg) e, em seguida, foram adicionados 50 μL do tampão de reação contendo 10 mM de DTT (ditiotreitól) a cada amostra e 5 μL do substrato (4 mM). As amostras foram incubadas a 37 °C por 12 horas, no escuro, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek®

Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 405 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.4.15 – Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas para os testes de viabilidade, indução de apoptose e caspases utilizando o programa Graph Pad versão 5.0. Para todos os experimentos, foi utilizado o teste estatístico One-way ANOVA. As diferenças significativas foram consideradas como $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

5. RESULTADOS

5.1 - Caracterização dos compostos de coordenação

Os compostos de coordenação de cobre(II) foram caracterizados por análise elementar (C, H e N), espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS, voltametria cíclica, condutivimetria e tiveram os seus pontos de fusão determinados. Essas caracterizações foram relatadas previamente por Lopes, 2012. Portanto, serão apresentados para os compostos de cobre apenas os valores da análise elementar e ponto de fusão (ambos apresentados na metodologia), e os espectros de infravermelho, obtidos novamente com a finalidade de confirmar se tratar dos mesmos compostos caracterizados por Lopes.

Os compostos de zinco, por serem inéditos na literatura, foram caracterizados pela primeira vez através de análise elementar, espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS, condutivimetria e tiveram os seus pontos de fusão determinados.

5.1.1 - Análise na região do infravermelho do ligante $L\alpha$ e dos complexos de cobre ($Cu\alpha$) e zinco ($Zn\alpha$)

Os espectros no infravermelho do ligante $L\alpha$ e de seus complexos de cobre e zinco são apresentados na figura 24. Os valores das principais absorções são apresentados na tabela 1.

O espectro vibracional na região do infravermelho do ligante $L\alpha$ apresenta uma banda larga entre 3550 e 2800 cm^{-1} referente ao grupo O-H do fenol e do álcool presentes na molécula deste ligante. Na região de 3057 cm^{-1} observa-se uma banda atribuída ao estiramento C-H dos anéis aromáticos. A região entre 2930 e 2833 cm^{-1} apresenta bandas atribuídas à deformação axial C-H oriundas dos carbonos alifáticos da molécula. As bandas referentes às deformações axiais dos grupos aromáticos (C=C e C=N) são observadas na região entre 1581 e 1489 cm^{-1} . Em 1269 cm^{-1} , observa-se uma banda que indica a vibração assimétrica do grupo C-O-C da função éter. Observa-se

também uma banda em 1242 cm^{-1} , sendo está atribuída tentativamente a sobreposição da vibração simétrica do grupo éter (C-O-C) com a vibração C-O do fenol (Silverstein e Webster, 2000). No espectro do ligante, a intensidade das bandas em 1269 e 1242 são praticamente iguais.

Os espectros no infravermelho dos compostos $\text{Cu}\alpha$ e $\text{Zn}\alpha$ apresentam bandas referentes ao ligante $\text{L}\alpha$, confirmando a presença deste na estrutura dos complexos, sendo que algumas bandas sofreram deslocamento após a complexação. Acima de 2400 cm^{-1} , o espectro é dominado por duas bandas alargadas, uma centrada aproximadamente em 2700 cm^{-1} e a outra em 3330 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas as vibrações O-H do grupo álcool e do grupo fenol. Já no composto $\text{Zn}\alpha$, a banda alargada está deslocada para menor número de onda, estando centrada aproximadamente em 2600 cm^{-1} , sendo típica de vibração O-H, formando ligação de hidrogênio, o que estaria caracterizando que o grupo álcool está protonado.

São observadas também bandas referentes a deformação C-H dos grupos aromáticos em 3051 e 3048 cm^{-1} , referentes a $\text{Cu}\alpha$ e $\text{Zn}\alpha$, respectivamente. As bandas referentes a deformações axiais C-H alifático nos dois compostos são observadas na região entre 2930 e 2702 cm^{-1} . São observadas bandas referentes a deformações axiais dos grupos C=C e C=N na região entre 1612 e 1500 cm^{-1} .

Assim como observado no ligante, nos espectros dos complexos são observadas bandas intensas em 1269 e 1240 cm^{-1} , sendo estas atribuídas as vibrações do grupo éter. Nos espectros dos complexos surgiram novas bandas em 1298 e 1302 para o complexo de cobre e de zinco, respectivamente. Estas bandas são atribuídas a vibração do grupo C-O do fenol coordenado aos íons metálicos e por isso não foram observadas nos espectro do ligante. É importante verificar que no espectro do ligante as bandas em 1269 e 1242 apresentam a mesma intensidade. Já no caso dos complexos, as bandas próximas a 1240 possuem intensidade inferior a banda em 1269. Por isso, propõe-se que a banda observada em 1242 cm^{-1} no espectro do ligante deve ser composta pela sobreposição de duas vibrações, C-O-C (éter) e C-O (fenol), sendo que esta última se desloca para 1300 cm^{-1} após a complexação, resultando na diminuição da intensidade da banda próxima a 1240 cm^{-1} .

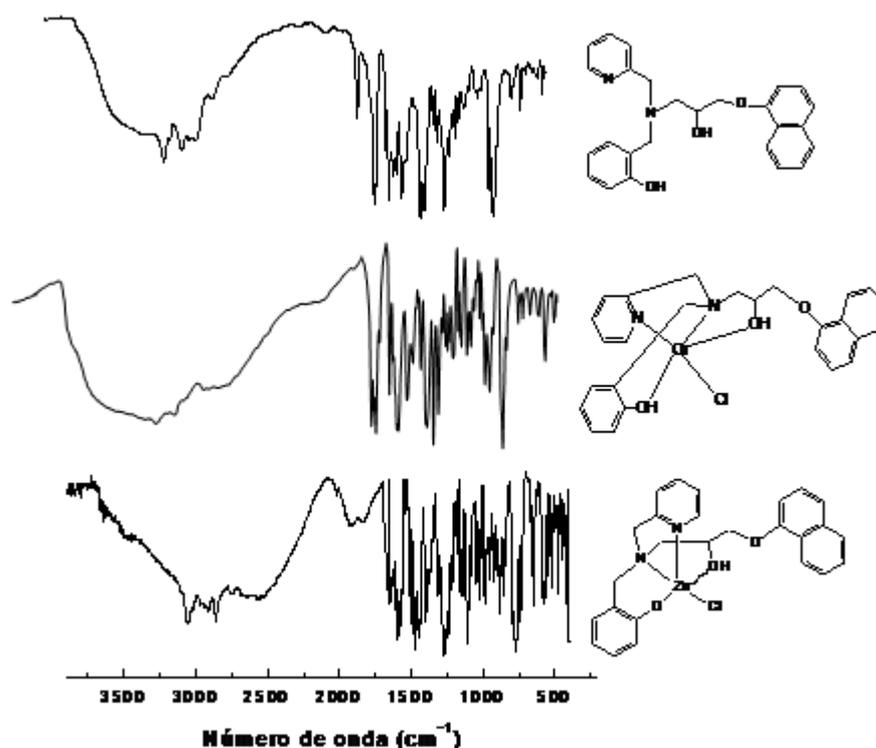


Figura 24: Espectros na região do infravermelho para o ligante La e seus complexos Cu α e Zn α .

Tabela 1: Principais absorções observadas no espectro de infravermelho do ligante La e dos complexos Cu α e Zn α , com suas respectivas atribuições

Absorção (cm ⁻¹)	La	Cu α	Zn α
ν OH	3500 - 2800	3450 e 3381	3350
ν CH _{aromático}	3053	3051	3048
ν_{as} CH ₂	2928, 2833	2965, 2872	2930, 2857
ν_s CH ₂	2833, 2721	2872, 2733	2702
ν C=C; ν C=N	1595, 1581, 1508, 1489	1612, 1595, 1577, 1508,	1606, 1594, 1576, 1508
ν_{as} C-O-C	1269	1269	1269
ν C-O-C + C-O ^a	1242	1240	1242
ν C-O ^a	1242	1298	1302
δ CH _{aromático}	1103	1111	1119
γ -CH ^b ; β -anel ^c	792, 756	791, 766	799, 760

a= deformação axial de C-O de fenol; b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; c= deformação do anel heteroaromático.

5.1.2 - Análise na região do infravermelho do ligante $L\beta$ e dos complexos de cobre ($Cu\beta$) e (Zn β)

Na figura 25, são apresentados os espectros no infravermelho do ligante $L\beta$ e de seus complexos de cobre e zinco. Os valores das principais absorções são apresentados na tabela 2.

O espectro vibracional na região do infravermelho do ligante $L\beta$ apresenta uma banda estreita em 3452 cm^{-1} , sendo típica de vibração O-H sem ligação de hidrogênio. Em 3053 cm^{-1} observa-se uma banda referente a deformação C-H dos grupos aromáticos. Na região entre 2949 e 2835 cm^{-1} , observam-se bandas intensas atribuídas à deformação axial C-H oriundas dos carbonos alifáticos da molécula. Na região entre 1627 e 1508 cm^{-1} são observadas bandas referentes às deformações axiais dos grupos C=C e C=N. Em 1269 cm^{-1} e 1217 cm^{-1} observam-se as bandas atribuídas as vibrações assimétrica e simétricas do grupo éter. Assim como proposto para o ligante $L\alpha$, sugere-se que a vibração C-O do grupo fenol esteja sobreposta pelas bandas do grupo éter (Silverstein e Webster, 2000).

Os espectros no infravermelho dos compostos $Cu\beta$ e $Zn\beta$ são similares. Apresentam bandas referentes ao ligante $L\beta$, confirmando a presença deste na estrutura do complexo. Entre 3350 e 2500 cm^{-1} , observam-se duas bandas alargadas, sendo as mesmas atribuídas aos grupos O-H do álcool e do fenol, formando ligação de hidrogênio no composto $Cu\beta$. Já no composto $Zn\beta$, o grupo O-H apresenta uma banda estreita em 3464 cm^{-1} .

São observadas bandas referentes a deformação C-H dos grupos aromáticos em 3051 e 3059 cm^{-1} , referentes a $Cu\beta$ e $Zn\beta$, respectivamente. As bandas referentes a deformações axiais C-H alifático de $Cu\beta$ e $Zn\beta$ são observadas na região entre 2962 e 2729 cm^{-1} . São observadas bandas referentes a deformações axiais dos grupos C=C e C=N na região entre 1612 e 1500 cm^{-1} nos espectros dos dois compostos. A presença do grupo C-O-C é confirmada pela presença de bandas em 1260 cm^{-1} e 1217 no composto $Cu\beta$ e 1263 cm^{-1} e 1214 no composto $Zn\beta$. Em 1300 cm^{-1} e 1301 cm^{-1} observa-se uma banda referente ao grupo C-O do fenol nos compostos $Cu\beta$ e $Zn\beta$, respectivamente.

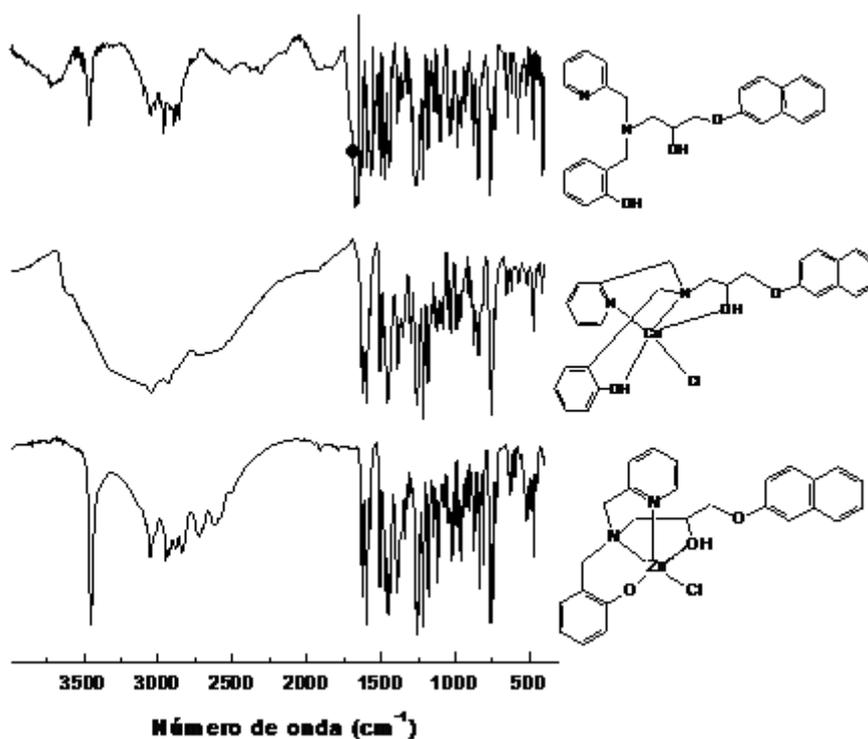


Figura 25: Espectros na região do infravermelho para o ligante $L\beta$ e seus complexos $Cu\beta$ e Zn

Tabela 2: Principais absorções observadas no espectro de infravermelho do ligante $L\beta$ e dos complexos $Cu\beta$ e $Zn\beta$, com suas respectivas atribuições.

Absorção (cm^{-1})	$L\beta$	$Cu\beta$	$Zn\beta$
ν OH	3452	3350 – 2500	3464
ν $\text{CH}_{\text{aromático}}$	3053	3051	3059
ν_{as} CH_2	2949, 2872	2962, 2893	2930
ν_{s} CH_2	2835	2833	2858, 2729
ν $\text{C}=\text{C}$; ν $\text{C}=\text{N}$	1627, 1599, 1508	1612; 1582, 1558, 1508	1612, 1593, 1507,
ν_{as} e ν_{ass} $\text{C}-\text{O}-\text{C}$	1269, 1217	1260, 1217	1263, 1214
ν $\text{C}-\text{O}^{\text{a}}$	1269	1300	1302
δ $\text{CH}_{\text{aromático}}$	1118	1111	1184
γ - CH^{b} ; β -anel ^c	839, 763	844, 766	847, 757

a= deformação axial de C-O de fenol; b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; c= deformação do anel heteroaromático.

5.1.3 - Análise de Condutividade elétrica dos compostos de zinco

As medidas de condutividade elétrica dos complexos foram realizadas em solução de dimetilformamida, na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Segundo Geary (1971), as espécies presentes nas soluções dos complexos podem ser consideradas como não-eletrólitas, pois apresentaram condutividade inferior a $65,0 \text{ } \mu\text{S/cm}$. Os valores obtidos nas medidas de condutividade dos complexos são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Dados da análise de condutividade elétrica para os complexos $\text{Zn}\alpha$ e $\text{Zn}\beta$

Complexo	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Espécie de eletrólito ¹
$\text{Zn}\alpha$	14,99	não-eletrólito
$\text{Zn}\beta$	15,65	não-eletrólito

¹ Atribuição segundo Geary (1971).

5.1.4 - Espectrometria de massas com ionização por electrospray [ESI-(+)-MS] dos compostos de coordenação de zinco

Os espectros de ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para os complexos $\text{Zn}\alpha$ (Figura 26) e $\text{Zn}\beta$ (Figura 27) são bastante semelhantes, ambos os espectros apresentam sinais de m/z 309, 415, 477, 957 e 993. Os sinais de m/z 309 e 415 são referentes ao ligante $\text{L}\alpha$, correspondendo, respectivamente, ao cátion formado pelo ligante protonado após a perda de um metileno e um fenol $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2]^+$ e ao cátion do ligante protonado $[\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3]^+$.

O sinal de m/z 477 representa o cátion mononuclear formado por um centro metálico de Zn(II) coordenado a uma molécula do ligante monodesprotonado $[\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3\text{Zn}]^+$. Os sinais de m/z 957 e 993 representam cátions binucleares, o primeiro deles é formado por dois centros de Zn(II) coordenados a duas moléculas do ligante, onde um dos ligantes está com o fenol desprotonado e o outro com o fenol e o álcool desprotonados (m/z 957) $[\text{C}_{52}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}_2]^+$. A outra espécie é formada por dois centros de Zn(II)

coordenados a duas moléculas do ligante com o fenol desprotonado e a um cloreto (m/z 993) $[\text{C}_{52}\text{H}_{50}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{Zn}_2]^+$.

Além destes sinais, o espectro do complexo $\text{Zn}\alpha$ apresenta um sinal de m/z 371, referente ao cátion formado por uma molécula do ligante após a perda de um metileno e um fenol coordenado a um centro metálico de $\text{Zn}(\text{II})$ $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{Zn}]^+$. O espectro obtido para o complexo $\text{Zn}\beta$ também apresenta sinais adicionais de m/z 437, 513 e 891. O cátion de m/z 437 é formado por uma molécula do ligante e um íon sódio $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}]^+$, o de m/z 513 é formado por um centro metálico de $\text{Zn}(\text{II})$ coordenado a uma molécula do ligante e um íon cloreto $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{Zn}]^+$ e o de m/z 891 é formado por um centro de $\text{Zn}(\text{II})$ coordenado a duas moléculas do ligante, estando uma delas monodesprotonada, $[\text{C}_{52}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}]^+$. As Figuras 28 e 29 apresentam propostas para as estruturas das principais espécies observadas nos espectros de ESI-(+)-MS para os dois complexos. Todas as estruturas apresentadas foram confirmadas através da conferência dos perfis isotópicos teóricos e experimentais.

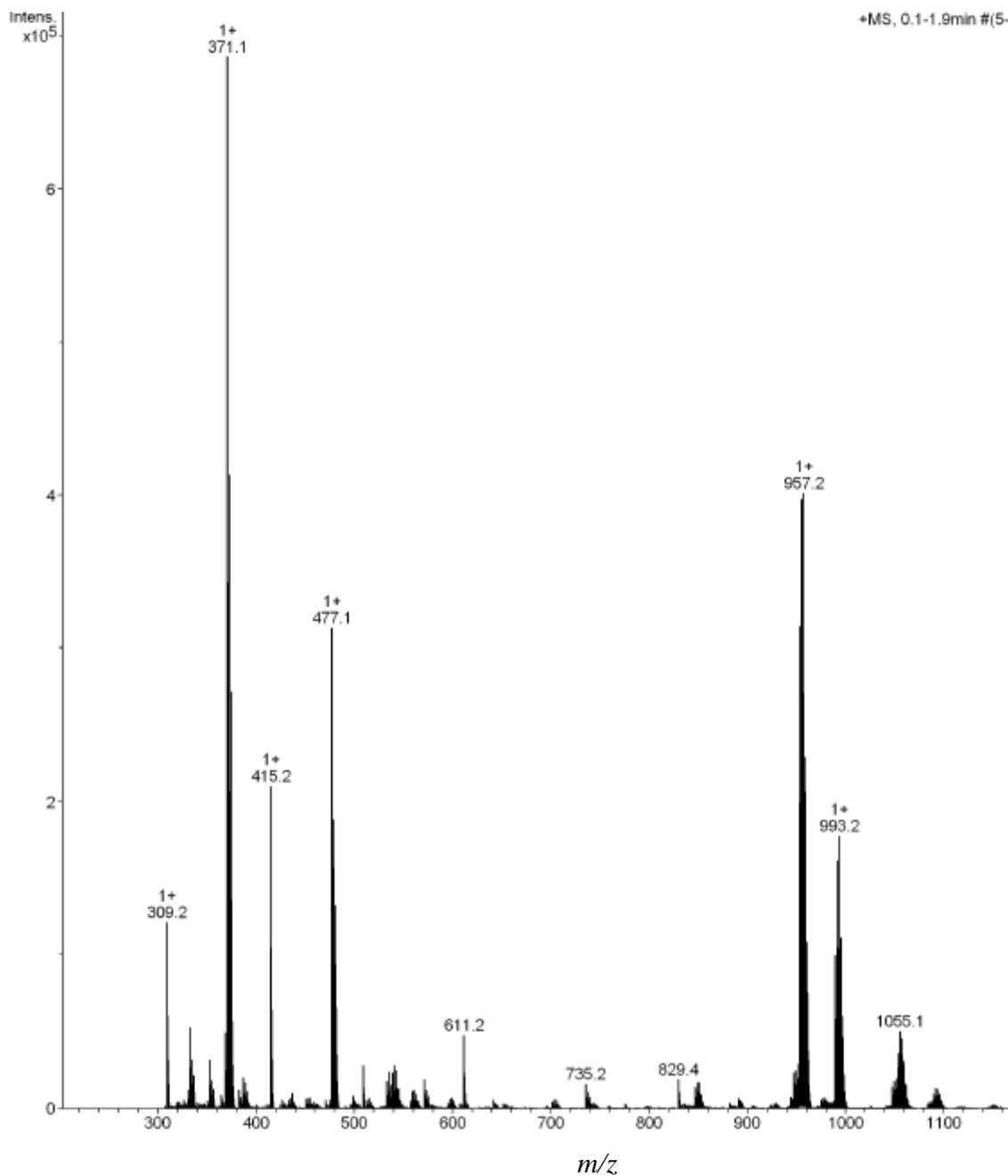


Figura 26: Espectro de ESI(+)-MS obtido para o composto Zn α em água:metanol (1:1).

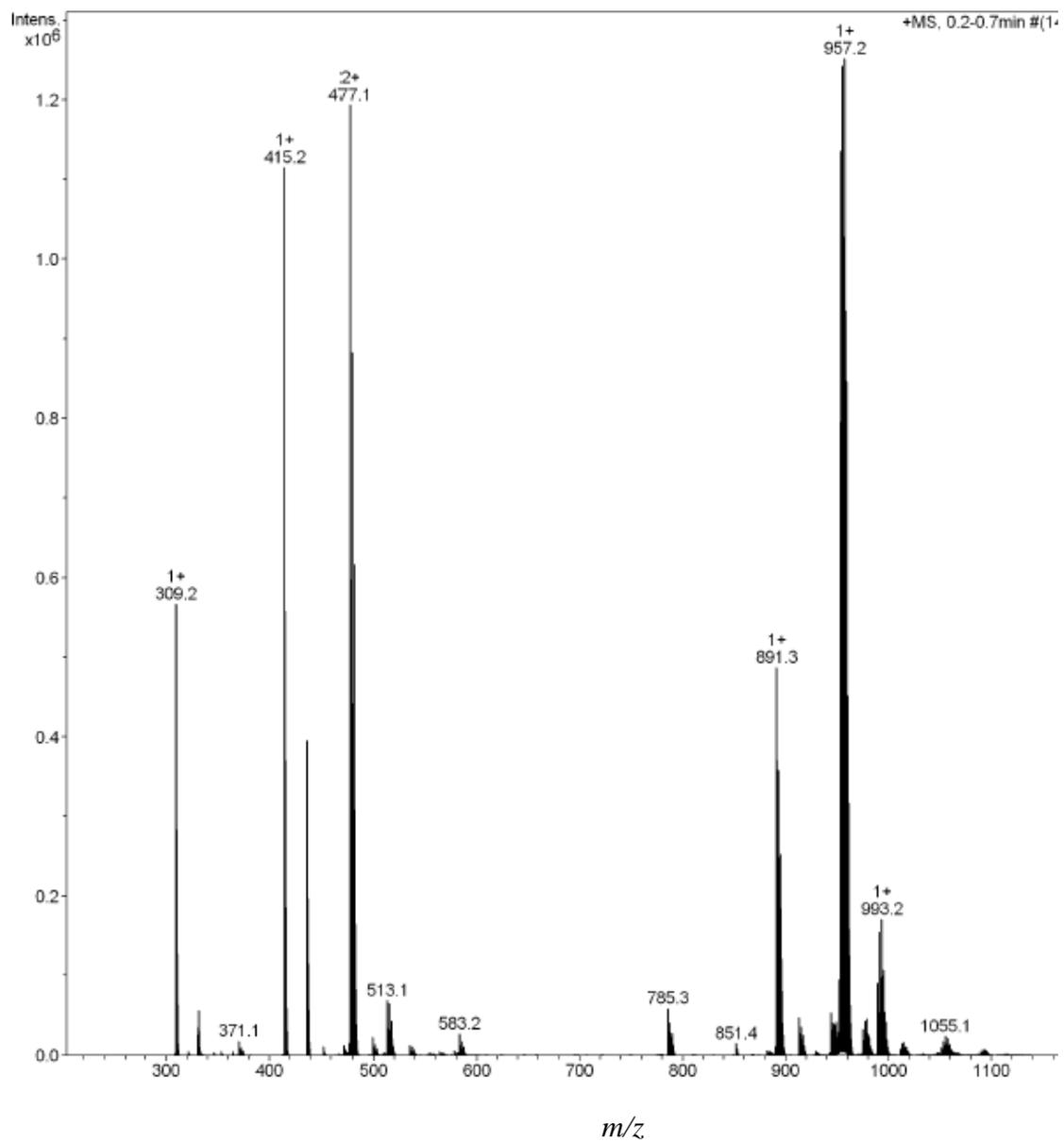


Figura 27: Espectro de ESI(+)-MS obtido para o composto Zn β em água:metanol (1:1).

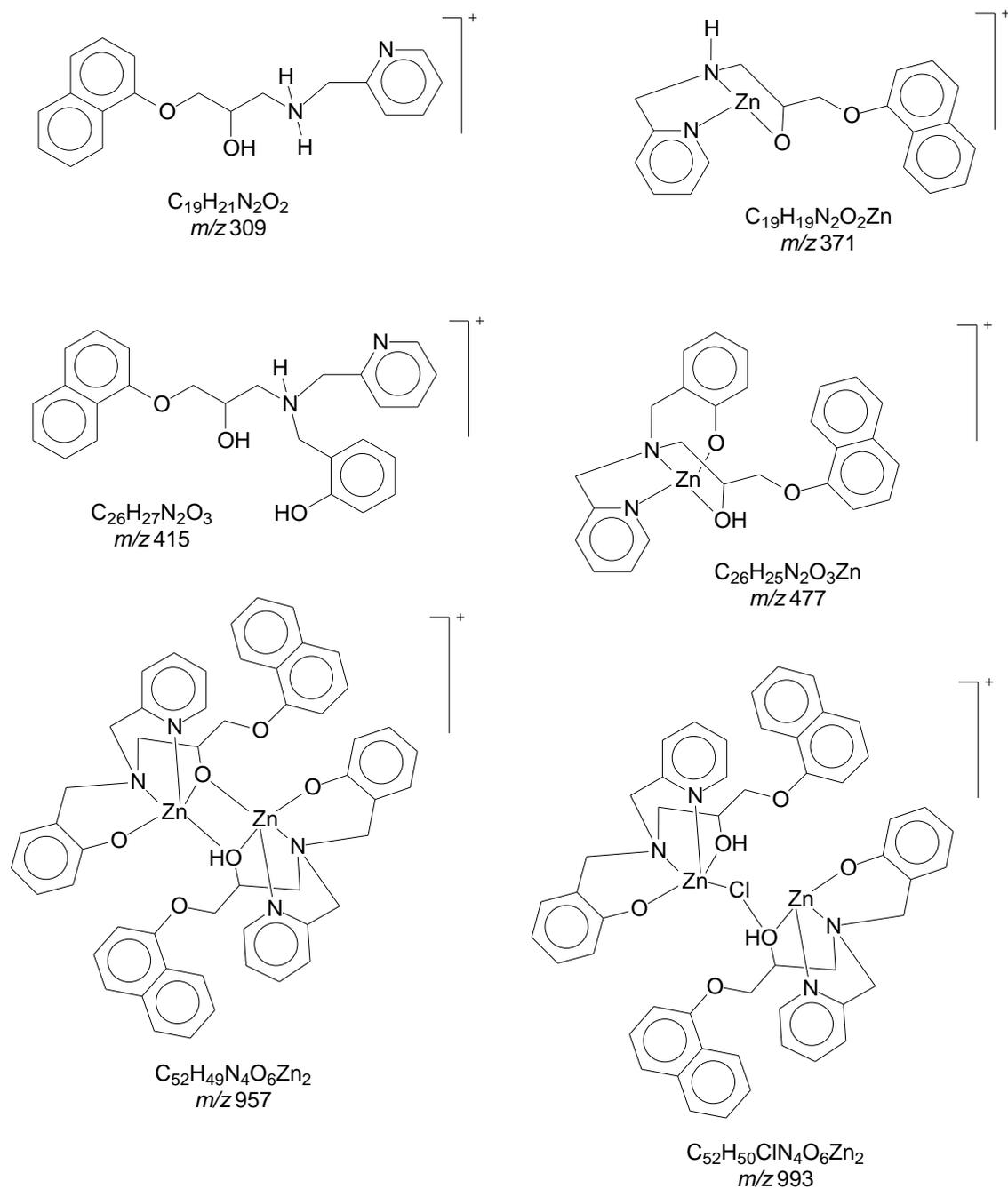


Figura 28: Propostas estruturais para as principais espécies presentes no espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto Zn α .

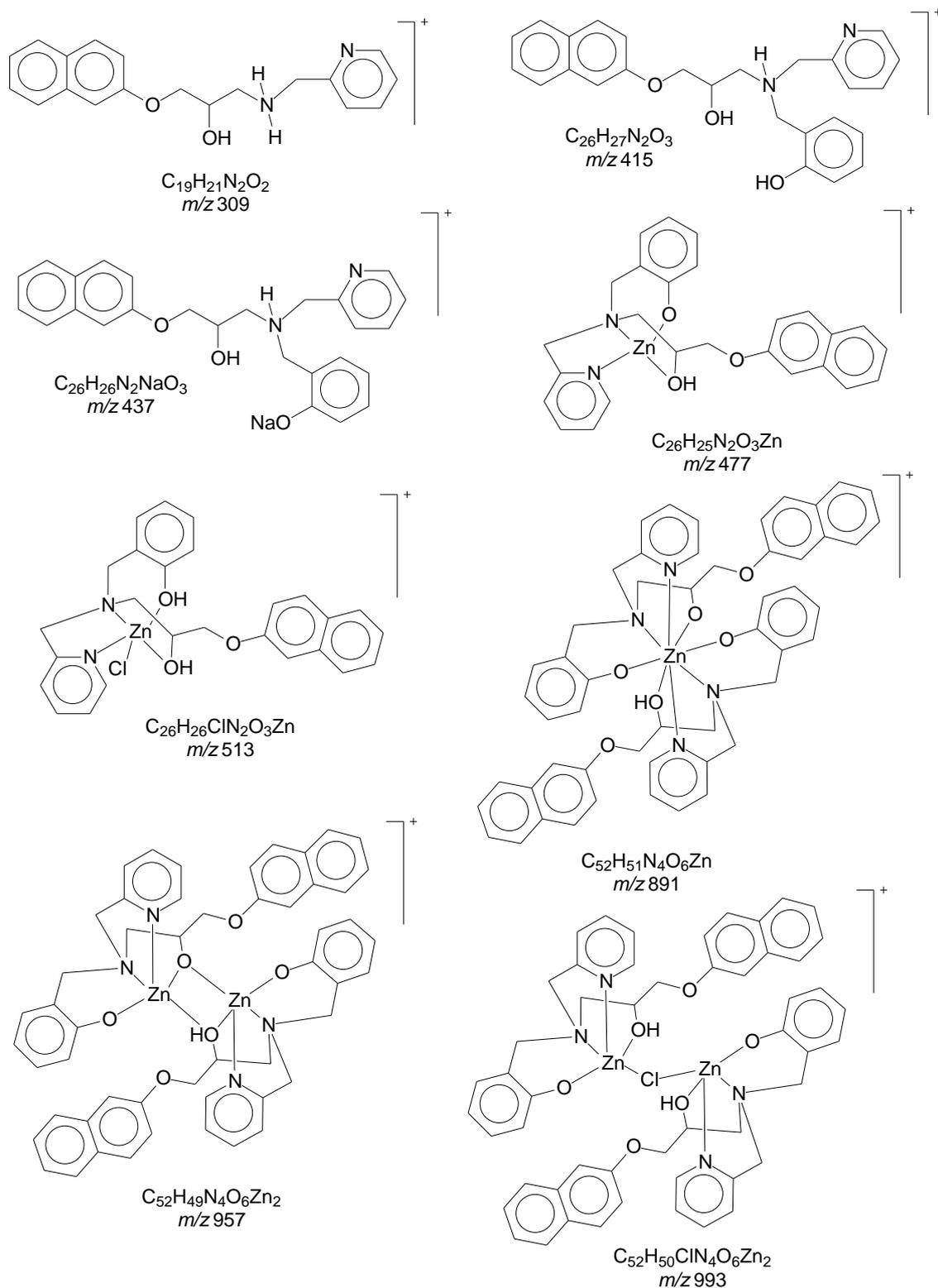


Figura 29: Principais espécies presentes no espectro de ESI(+)-MS obtido para o composto Znβ.

5.2 - Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular

O experimento para avaliação do efeito citotóxico dos compostos foi realizado através do microensaio colorimétrico utilizando MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). Este teste é utilizado como teste padrão para avaliar a atividade citotóxica e tem se mostrado promissor para a predição “*in vitro*” de atividade biológica de novos compostos frente a linhagens de células cancerígenas humanas. Neste ensaio, o MTT é reduzido pela succinato desidrogenase, presente na mitocôndria, formando um precipitado de cor púrpura, chamado formazam, quantificado por espectrofotometria. O resultado deste ensaio é dependente da população de células metabolicamente ativas capazes de reduzir o MTT, o que reflete o estado geral da mitocôndria e conseqüentemente a viabilidade celular (Albrecht *et al.*, 2004).

Os resultados mostraram que os compostos de coordenação de cobre, mas não os de zinco, foram capazes de reduzir de maneira significativa a viabilidade celular tanto das linhagens leucêmicas U937 e THP-1 (Figura 30) quanto das linhagens melanômicas SKMEL-5 e B16F0 (Figura 31) após 36 horas de incubação de maneira concentração dependente. O ligante $L\alpha$ também demonstrou ser muito ativo frente as linhagens testadas, porém o mesmo não acontece com seu isômero $L\beta$, que não foi capaz de reduzir a viabilidade de nenhuma das linhagens. O DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para a dissolução dos compostos, não afetou a viabilidade celular das linhagens testadas. O sal de cobre utilizado para a reação de complexação com os ligantes também demonstrou não afetar a viabilidade das células (Lopes, 2012).

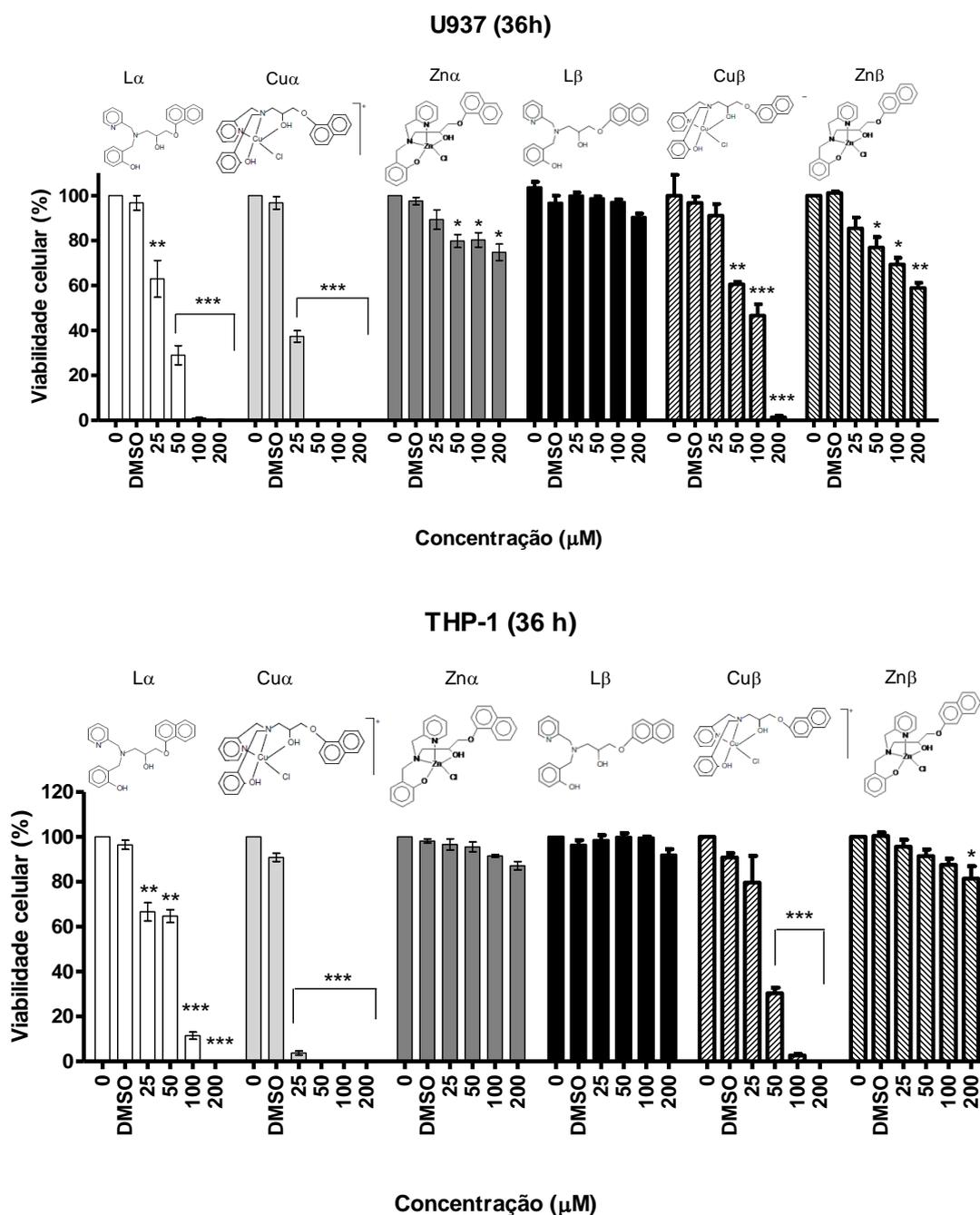


Figura 30: Avaliação da viabilidade celular das linhagens leucêmicas U937 e THP-1, pelo ensaio de MTT ($n = 3$), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos ($L\alpha$ e $L\beta$) e com os compostos de coordenação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

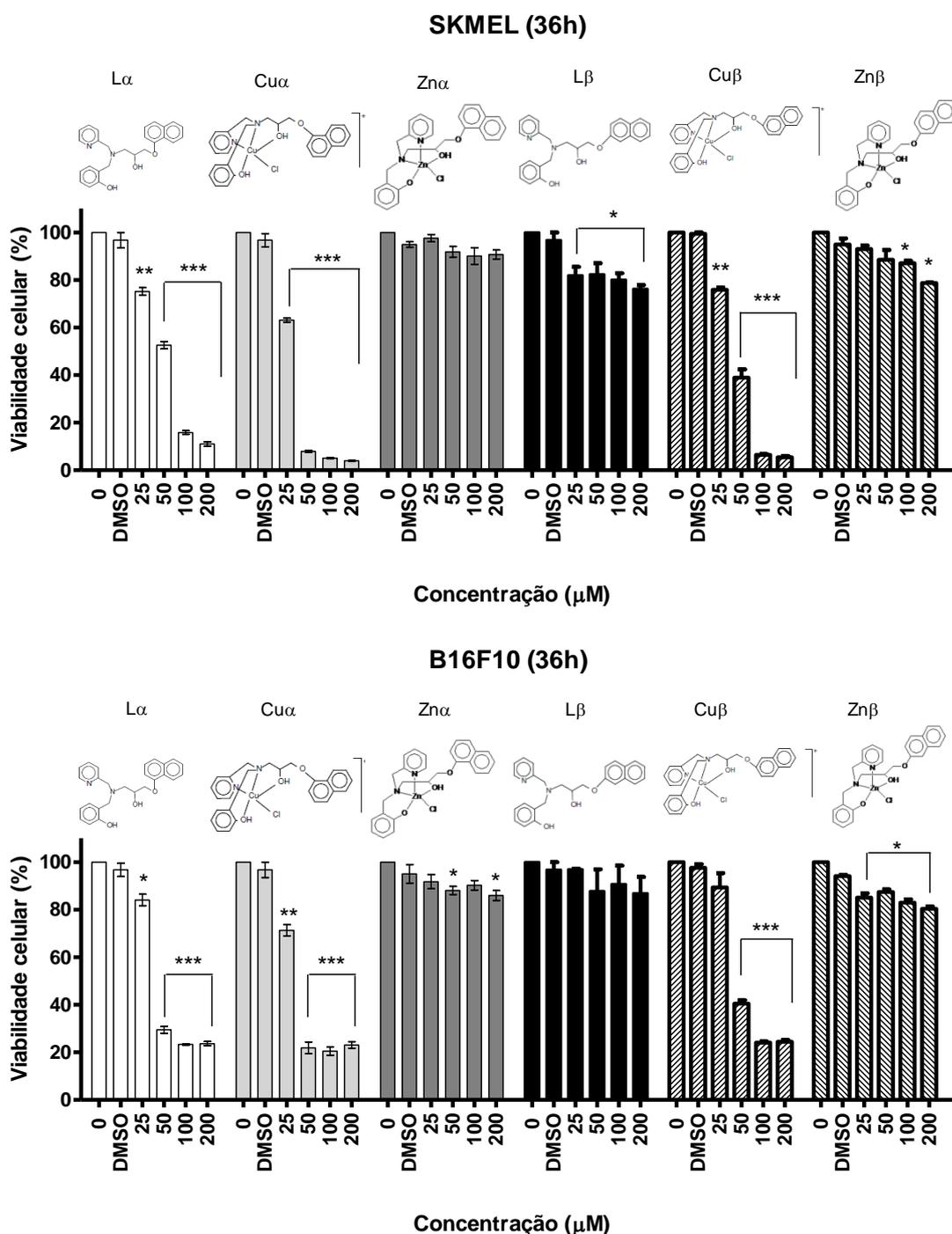


Figura 31: Avaliação da viabilidade celular das linhagens melanômicas SK-MEL-5 e B16F10, pelo ensaio de MTT ($n = 3$), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos ($L\alpha$ e $L\beta$) e com os compostos de coordenação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Com a finalidade de verificar a seletividade (normal x tumoral) dos compostos mais ativos ($L\alpha$, $Cu\alpha$, $Cu\beta$ e cisplatina), foi avaliada a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) nas mesmas condições e concentrações utilizadas para as células neoplásicas. Os resultados mostram que somente o composto $Cu\alpha$ reduziu de maneira muito discreta, quando comparado a cisplatina, a viabilidade das células normais (PBMC), como mostrado na figura 32.

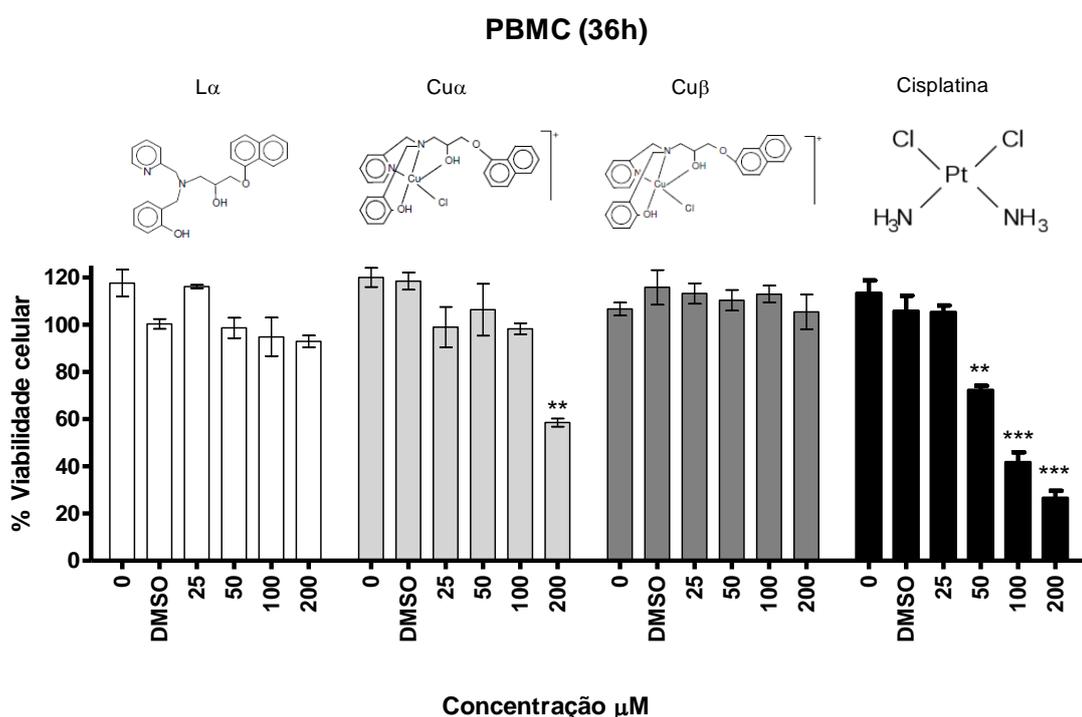


Figura 32: Avaliação da viabilidade celular de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com o composto orgânico ($L\alpha$) e com os compostos de coordenação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Para efeito de uma melhor comparação da atividade entre os compostos foi calculado o índice de citotoxicidade 50% (EC_{50}), ou seja, a concentração capaz de matar ou reduzir a viabilidade celular em 50%. A EC_{50} foi determinada a partir das curvas dose resposta (figuras 30, 31 e 32) utilizando o programa *GraphPad Prism versão 5.0*. Os resultados da EC_{50} estão apresentados na tabela 4.

Pode ser observado na tabela que o composto $\text{Cu}\alpha$ foi o mais ativo e teve atividade superior a da cisplatina para todas as linhagens. Para linhagem de melanoma B16F10 esse composto foi 3 vezes mais ativo que a cisplatina. O composto $\text{Cu}\beta$ e o ligante $\text{L}\alpha$ tiveram atividade similar a da cisplatina para as linhagens U937, THP-1 e SKMEL-5, porém foram cerca de 2 vezes mais ativos para linhagem B16F10 do que a cisplatina. Já para células normais (PBMC) podemos observar na tabela que os compostos de cobre bem como o ligante $\text{L}\alpha$ foram cerca de 4 vezes menos tóxicos quando comparados a cisplatina, o que demonstra uma maior seletividade desses compostos para células cancerígenas.

Tabela 4: EC_{50} (μM) dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT

Linhagens	Compostos (μM)						Cisplatina
	$\text{L}\alpha$	$\text{Cu}\alpha$	$\text{Zn}\alpha$	$\text{L}\beta$	$\text{Cu}\beta$	$\text{Zn}\beta$	
U937	$26 \pm 1,06$	$14 \pm 1,05$	>200	>200	$35 \pm 1,04$	>200	$16 \pm 1,02$
THP-1	$37 \pm 1,12$	$11 \pm 1,01$	>200	>200	$27 \pm 1,13$	>200	$29 \pm 1,06$
SK-MEL-5	$50 \pm 1,04$	$28 \pm 1,07$	>200	>200	$40 \pm 1,03$	>200	$39 \pm 1,1$
B16F10	$45 \pm 1,13$	$35 \pm 1,15$	>200	>200	$53 \pm 1,12$	>200	$100 \pm 1,07$
PBMC	>200	$166 \pm 1,1$	ND*	ND*	>200	ND*	$44 \pm 1,04$

*ND - Não determinado

5.3 - Determinação da toxicidade dos compostos *in vivo* (DL_{50})

A fim de verificar se a baixa toxicidade do composto $\text{Cu}\alpha$ (que foi o mais ativo nos ensaios de MTT) em relação a cisplatina também se mantinha *in vivo*, camundongos da linhagem C57BL/6, com 4-5 semanas de vida, foram separados em grupos de 4 animais para cada condição de tratamento. As concentrações utilizadas para o composto $\text{Cu}\alpha$ foram: 13.75, 27.5, 55 e 110 mg kg^{-1} . A figura 33 mostra a porcentagem de animais vivos de acordo com a concentração crescente do composto. Os animais foram acompanhados por até 30 dias. A DL_{50} (dose capaz de matar 50% dos animais) para o composto $\text{Cu}\alpha$ foi de 55 mg kg^{-1} ou $9,40 \times 10^{-2} \text{ mmol kg}^{-1}$ contra 6,6 mg kg^{-1} ou $2,2 \times 10^{-2} \text{ mmol kg}^{-1}$ da cisplatina (dados obtidos para camundongos pelo biotério da

USP, 2005). Esse resultado corrobora os dados do MTT com as células normais, demonstrando que o composto $Cu\alpha$ é cerca de 4 vezes menos tóxico do que a cisplatina também *in vivo*.

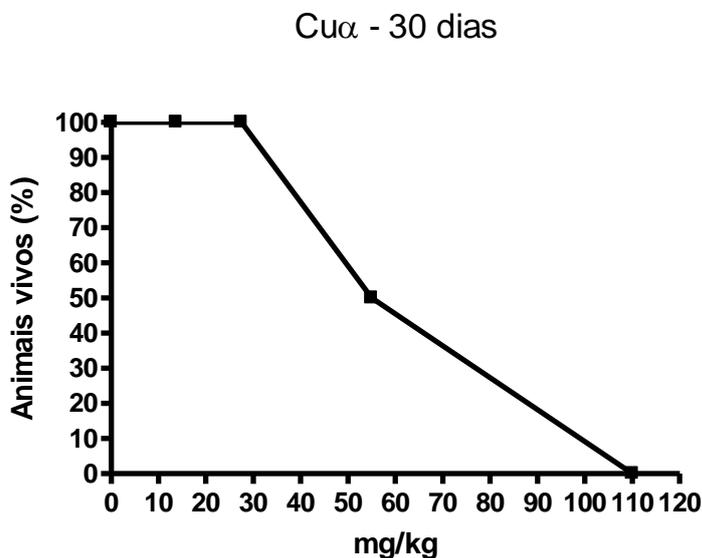


Figura 33: Ensaio de toxicidade *in vivo* do composto $Cu\alpha$. Os animais foram inoculados via intraperitoneal com diferentes concentrações do composto. O gráfico mostra a porcentagem de animais vivos de acordo com a concentração do composto $Cu\alpha$.

O ensaio de viabilidade celular (MTT) e o ensaio *in vivo* da DL_{50} permitem uma avaliação da atividade e seletividade dos compostos frente as células cancerígenas e normais. Entretanto, apesar de serem ensaios padrões esses testes não fornecem informações mais precisas sobre os mecanismos de ação dos compostos e se limita apenas a fornecer um *screening* inicial de atividade com o intuito de fazer uma triagem dos compostos mais ativos e promissores.

5.4 - Avaliação do tipo de morte celular mediada pelos compostos

5.4.1 – Avaliação de morte celular por microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência para visualização de morte celular utiliza fluorocromos que se intercalam no DNA. Para este ensaio foi realizada uma dupla marcação com os corantes laranja de acridina e brometo de etídio. Este é um método simples e preciso para se avaliar o tipo de morte de um determinado composto (Remoize *et al.*, 1998; Nafisi *et al.*, 2007).

Laranja de acridina, um corante vital, entra nas células através da membrana intacta e interage com o DNA pelo intercalamento de bases ou interações eletrostáticas. Quando ligada ao DNA se torna espectralmente similar a fluoresceína, com um máximo de excitação em 502nm e máximo de emissão em 525 nm, resultando em uma coloração verde. Ao contrário o brometo de etídio é capaz de penetrar apenas em células com membrana rompida e deixa o núcleo com uma coloração alaranjada (Kosmider *et al.*, 2004).

Para este ensaio apenas os compostos que demonstraram atividade nos testes de MTT foram utilizados (Cu α , Cu β , L α e Cisplatina). As características morfológicas do núcleo das linhagens neoplásicas foram observadas nos tempos de 12, 24 e 36 horas e as células foram discriminadas em normais, necróticas ou apoptóticas. Os parâmetros para discriminação das células estão descritos na metodologia (figura 23). A fim de facilitar a visualização dos resultados apenas os dados para apoptose são apresentados.

Avaliando-se as diferentes concentrações nos tempos estudados, observou-se que, de forma geral, a indução de apoptose é um processo tempo e concentração dependente, e que os compostos Cu α e Cu β induziram aproximadamente 100% de apoptose na maior concentração testada após 24 horas de incubação em todas as linhagens estudadas (figuras 34-37). Para o composto Cu α , frente a linhagem SK-MEL, concentrações acima de 100 μ M são tóxicas induzindo altas taxas de necrose (dados não mostrados). O ligante L α também foi capaz de induzir apoptose nas linhagens testadas de maneira tempo e concentração dependente.

A atividade do sal de cobre já foi demonstrada separadamente em outros trabalhos do nosso grupo (Bull, 2008), com a IC_{50} , baseada no ensaio de MTT, ficando acima de 200 μ M. Isso demonstra que o cloreto de cobre sozinho tem uma atividade muito inferior a dos complexos ($Cu\alpha$ e $Cu\beta$) e a do ligante $L\alpha$.

Esses resultados reforçam os resultados de MTT, demonstrando que os compostos de cobre são mais ativos do que a droga cisplatina para as linhagens de melanoma e igualmente ativos para linhagens leucêmicas. Além disso, mostra que a complexação dos ligantes α e β como o sal de cobre foi eficaz em aumentar atividade dos compostos finais ($Cu\alpha$ e $Cu\beta$).

U937

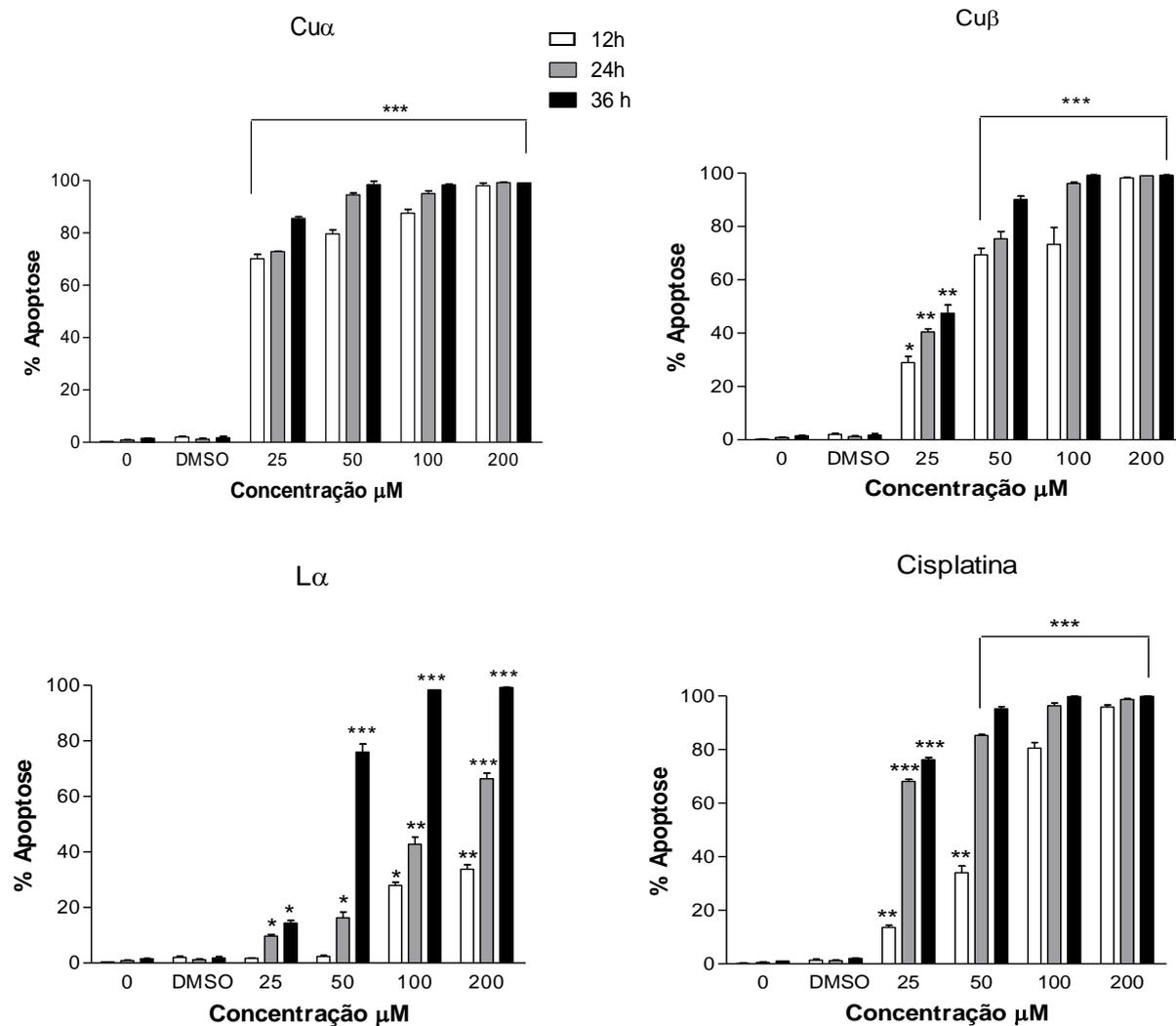


Figura 34: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico La e pelos compostos de coordenação em células leucêmicas U937 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

THP-1

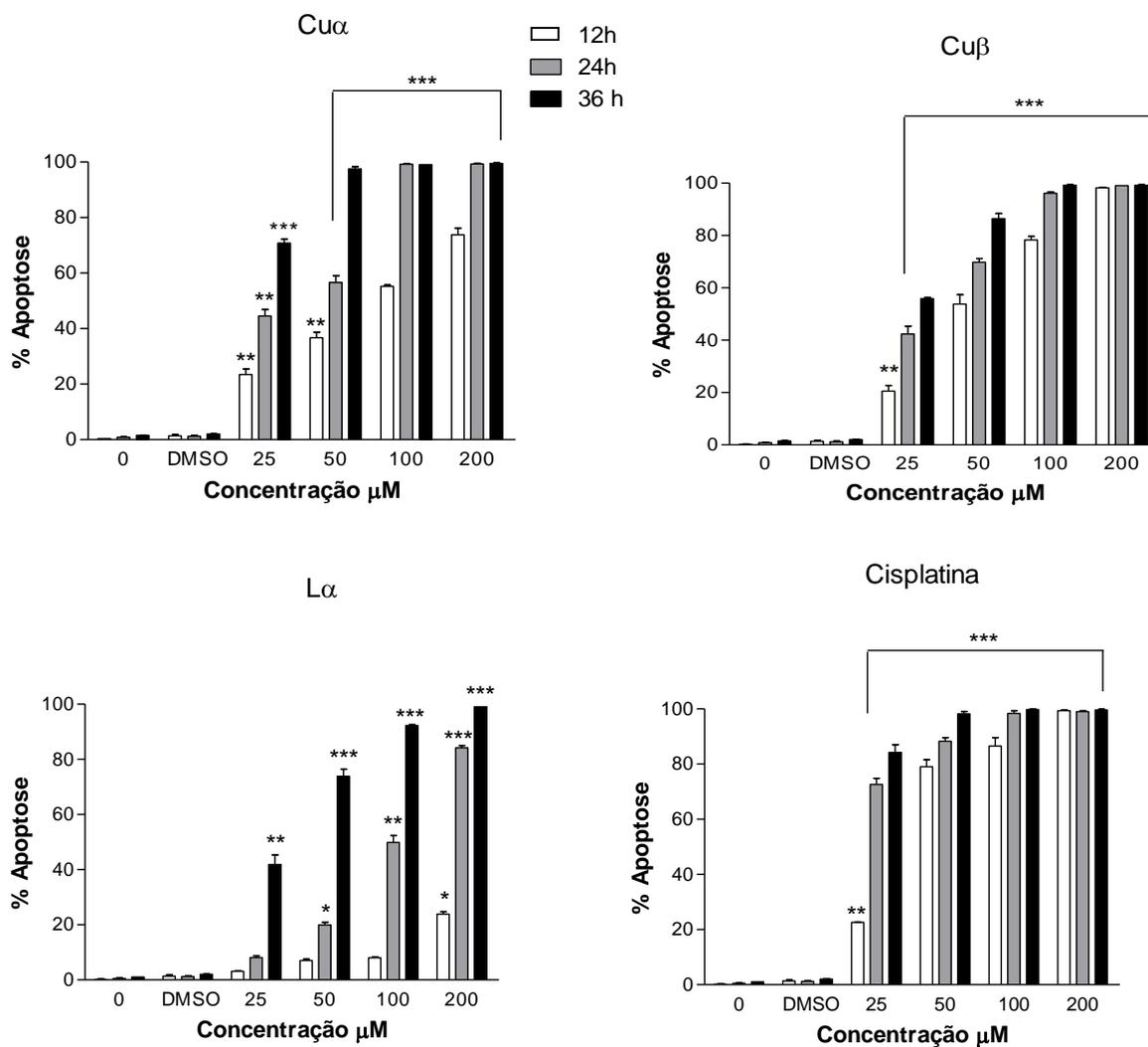


Figura 35: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células leucêmicas THP-1 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

B16F10

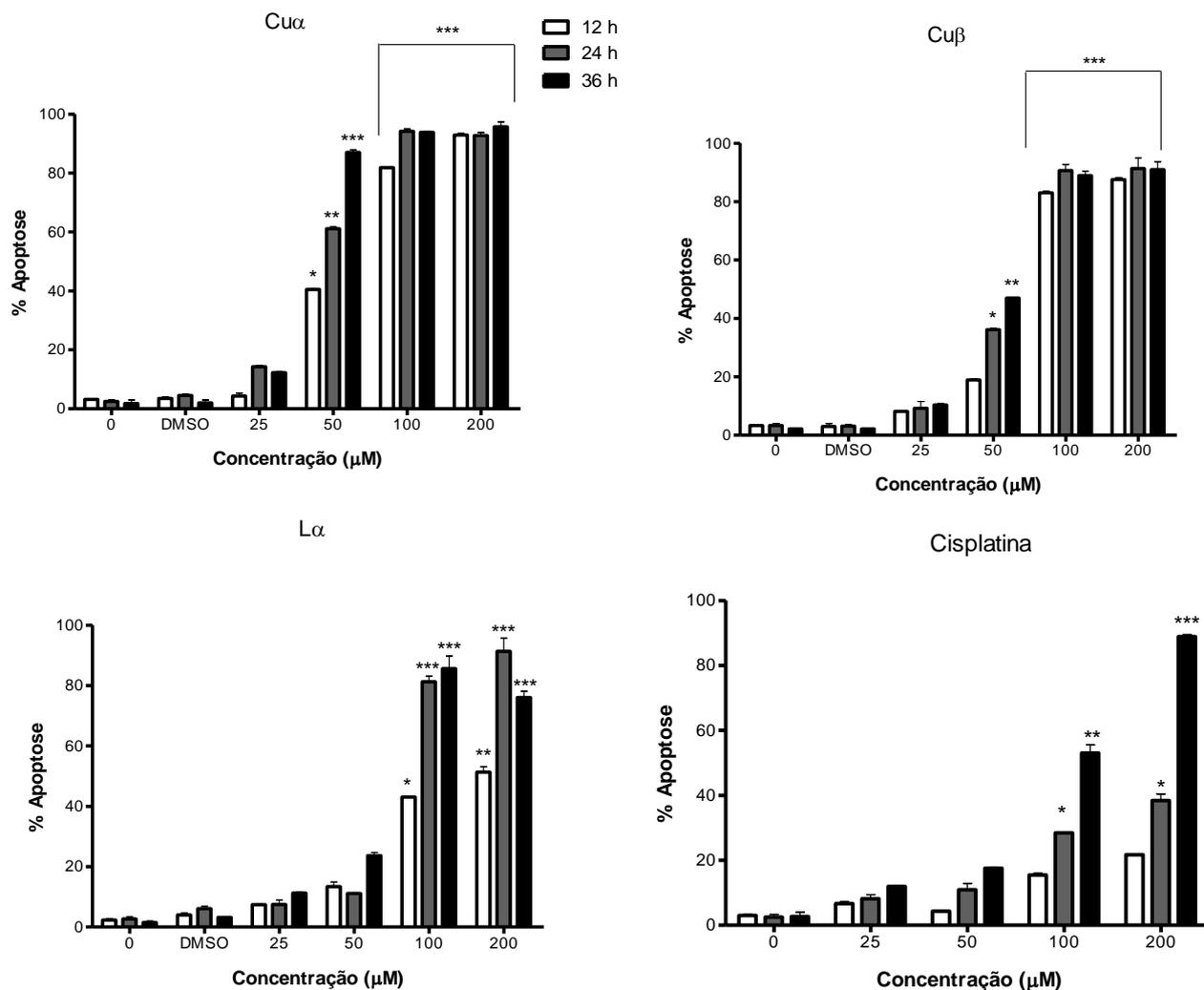


Figura 36: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células de melanoma B16F10 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

SKMEL-5

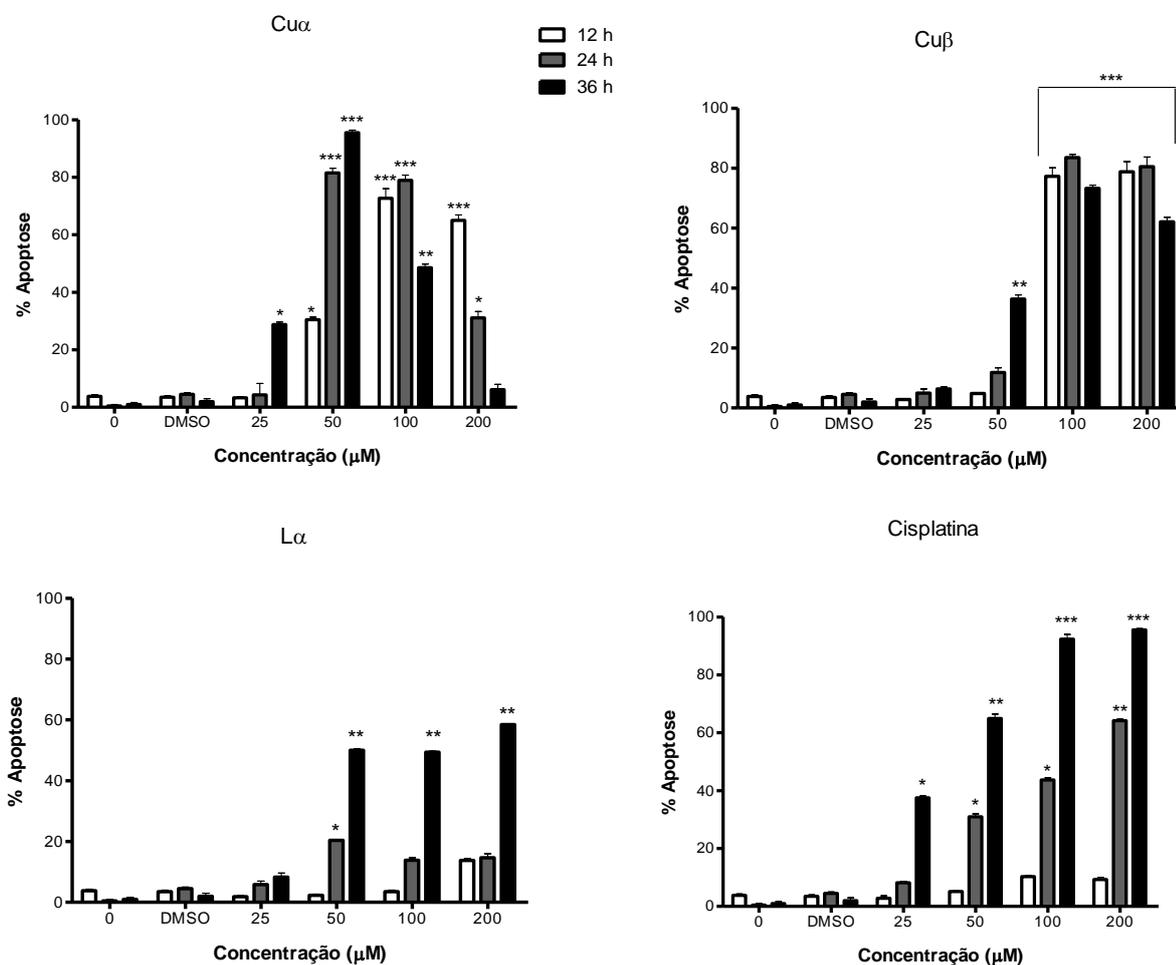


Figura 37: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto orgânico L α e pelos compostos de coordenação em células de melanoma SKMEL-5 (n=2). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

5.3.2 – Avaliação da Externalização de fosfatidilserina (marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio)

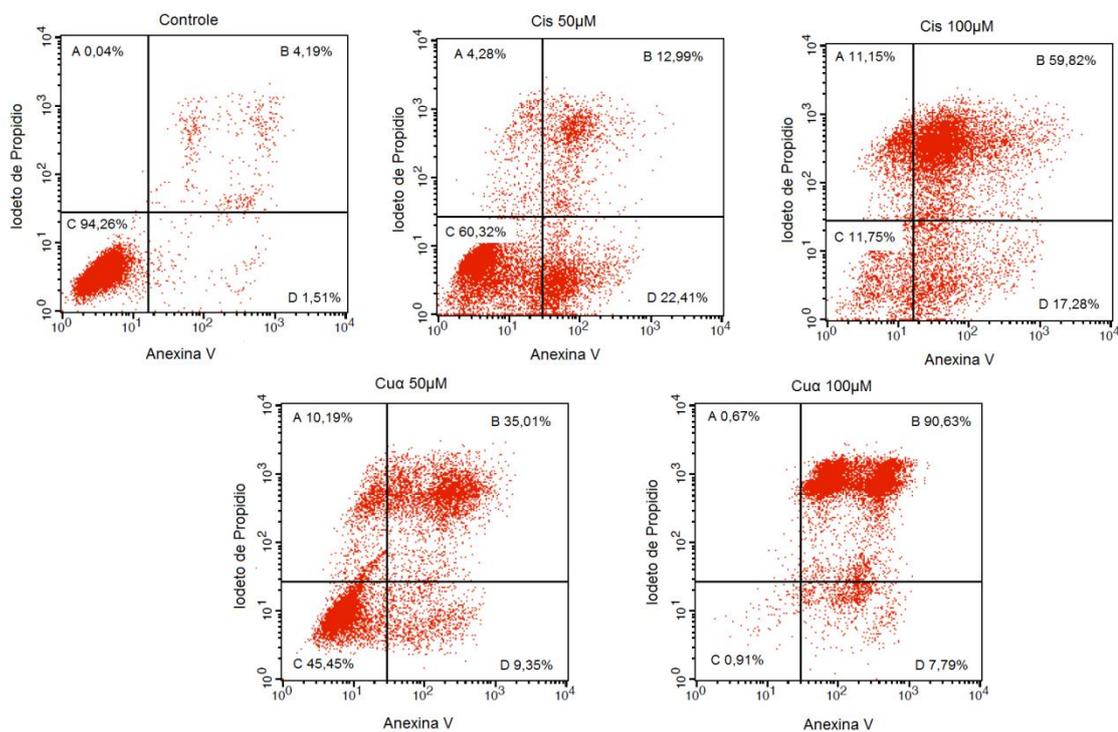
A fim de confirmar o processo de apoptose observado pela microscopia de fluorescência, todas as linhagens foram submetidas a dupla marcação com Anexina V e PI. A partir desse item as 4 linhagens foram tratadas apenas com o composto Cu α (50 e 100 μ M) por ter se mostrado como mais ativo, tanto nos ensaios de MTT quanto nos ensaios de microscopia de fluorescência e também com a cisplatina para fins comparativos. Após 12 horas de incubação as células foram marcadas e analisadas no citometro de fluxo. Células que estão em apoptose primária, são marcadas com anexina V somente. Células em necrose secundária (apoptose-necrose) são marcadas com Anexina V e PI. Células em necrose são marcadas somente com PI e células normais não sofrem nenhum tipo de marcação.

As figuras 38 e 39 mostram que o composto Cu α foi capaz de induzir apoptose em todas as quatro linhagens de maneira concentração dependente, corroborando com os dados de microscopia de fluorescência.

Para as linhagens leucêmicas (THP-1 e U937) 100 μ M do composto Cu α foi capaz de induzir mais de 90% de morte celular por apoptose, chegando a valores similares aos do composto cisplatina (figura 38).

Para ambas as linhagens melanômicas o composto Cu α foi mais ativo do que a cisplatina nas duas concentrações testadas. No entanto, para linhagem de melanoma humano SK-MEL-5, 100 μ M desse composto induziu 56,11% de necrose (figura 39), mostrando que concentrações acima desse valor podem ser muito tóxicas para essas células, como visto também pela microscopia de fluorescência (figura 37).

THP-1



U937

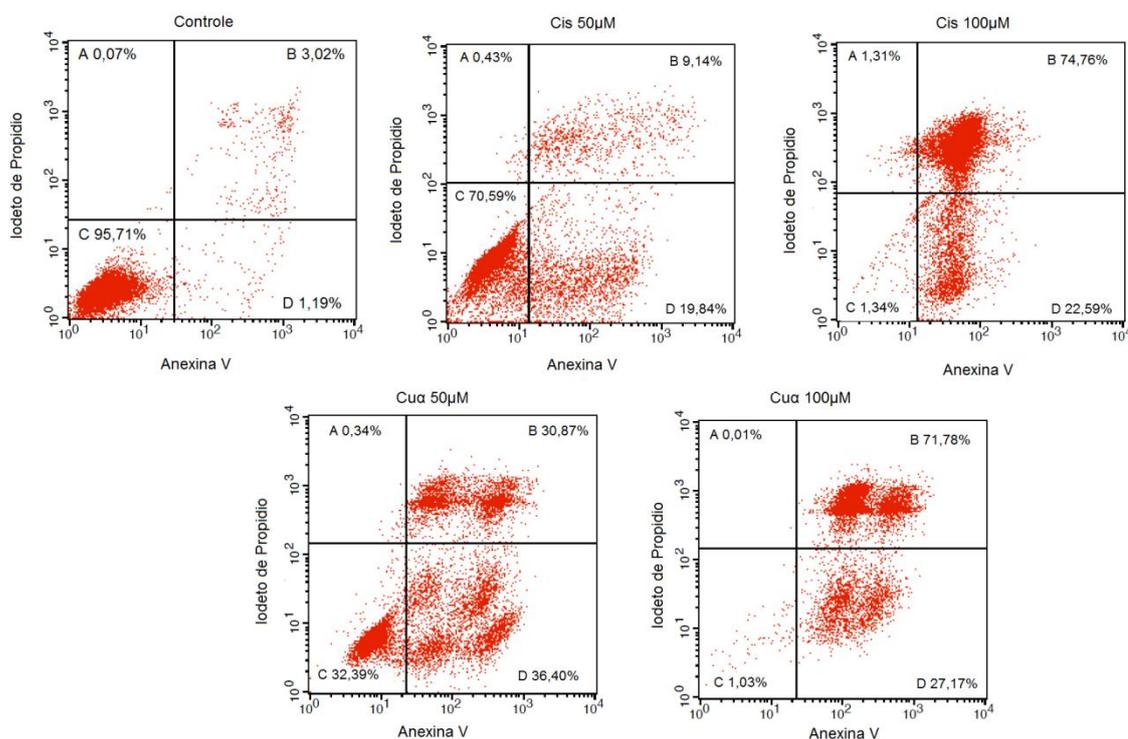
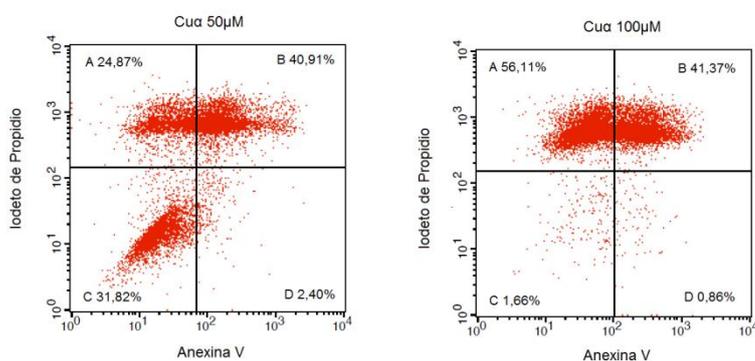
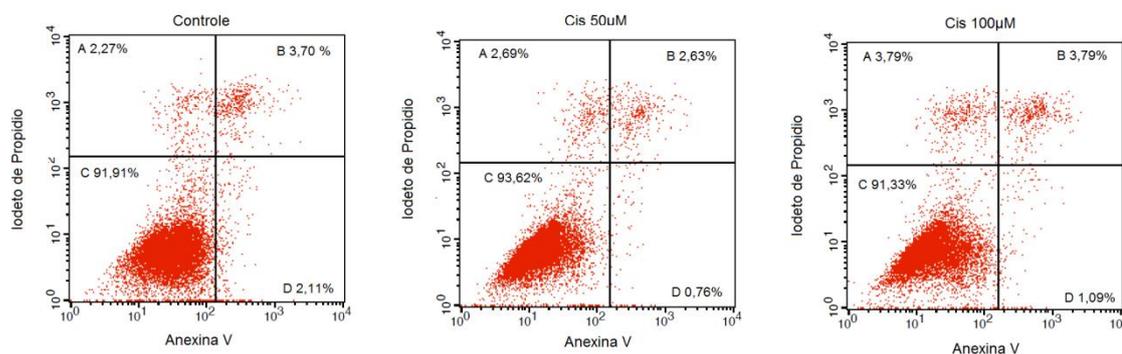


Figura 38: Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B) e apoptose primária (quadrante D) induzida por cisplatina e pelo composto Cua nas linhagens leucêmicas após 12 horas de incubação. O Quadrante C corresponde as células normais.

SKMEL-5



B16F10

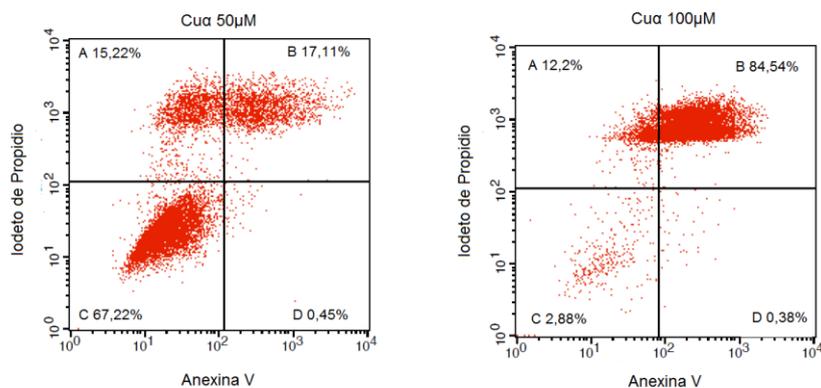
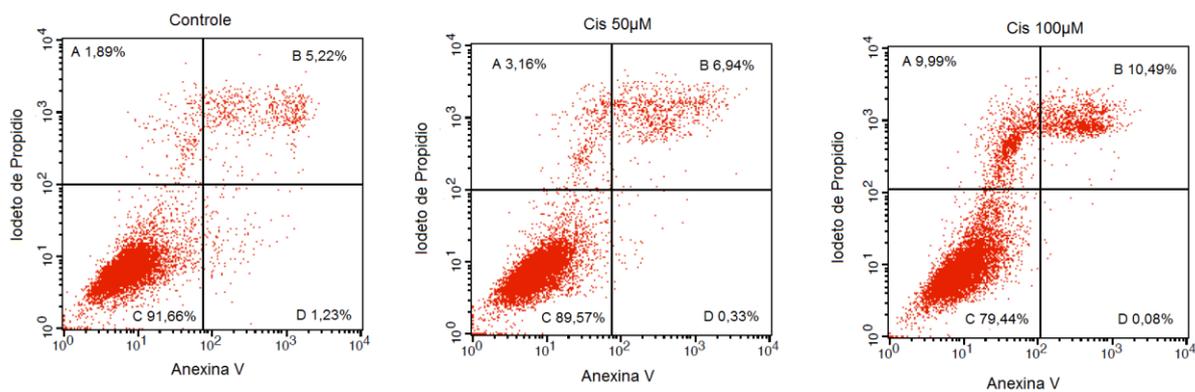


Figura 39: Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B) e apoptose primária (quadrante D) induzida pelo composto Cua nas linhagens melanômicas após 12 horas de incubação. O Quadrante C corresponde as células normais.

5.3.3 – Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo

. A citometria de fluxo também é utilizada para identificação da distribuição das células durante as fases do ciclo celular. As fases são distinguidas, a partir do conteúdo do DNA, em fase G1 (crescimento 1), S (síntese) e G2/M. As fases G2 (crescimento 2) e M (mitose) do ciclo celular aparecem na mesma região do histograma por possuírem conteúdo de DNA semelhante (Nunez, 2001). Nos estágios tardios da apoptose o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb ou múltiplos. O processamento das amostras, como descrito no item 4.4.8, remove o DNA fragmentado e as células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região Sub-G1 do histograma (Gong *et al.*, 1994). A presença da população celular na nesta fase do ciclo pode ser considerado como um indicativo de morte celular por apoptose.

O composto Cu α e a cisplatina foram avaliados novamente nas concentrações de 50 e 100 μ M, porém no tempo de 24 horas, já que a clivagem do DNA ocorre após a externalização de fosfatidilserina. Nas Figuras 40-43 estão apresentados, respectivamente, os histogramas com porcentagem de distribuição das células U937, THP-1, B16F10 e SK-MEL5 de acordo com a fase do ciclo celular. A porcentagem de células do controle (não tratadas) em sub-G1 foi de 0,26%, 0,55%, 1,23% e 7,47% para as linhagens U937, THP-1, B16F10 e SK-MEL5 respectivamente.

Pode-se observar que o composto Cu α promoveu um deslocamento acentuado da população de células neoplásicas para a fase sub-G1 do ciclo celular para todas as linhagens testadas. Novamente tanto composto Cu α quanto a cisplatina foram mais eficazes para as linhagens leucêmicas (U937 e THP-1) do que para as melanômicas (B16F10 e SK-MEL5). Pode-se confirmar também a resistência da linhagem B16F10 à cisplatina, com aproximadamente apenas 10% de células em sub-G1 na concentração de 100 μ M.

A presença de população celular na fase Sub-G1 do ciclo celular mostra que o composto Cu α induz um efeito citotóxico através da indução de morte celular por apoptose, confirmando os dados anteriores de microscopia de fluorescência e de marcação de fosfatidilserina com anexina V.

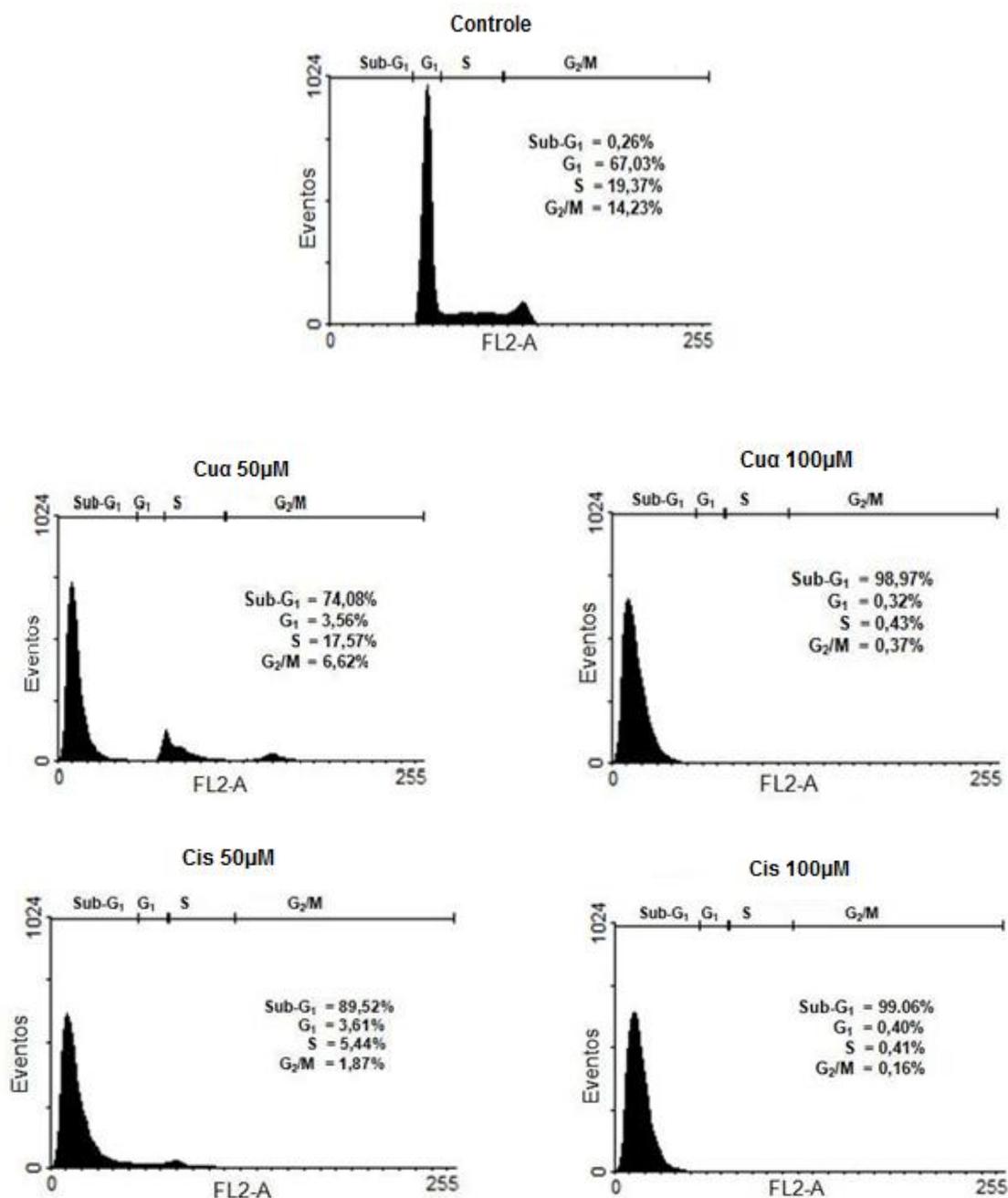


Figura 40: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos.

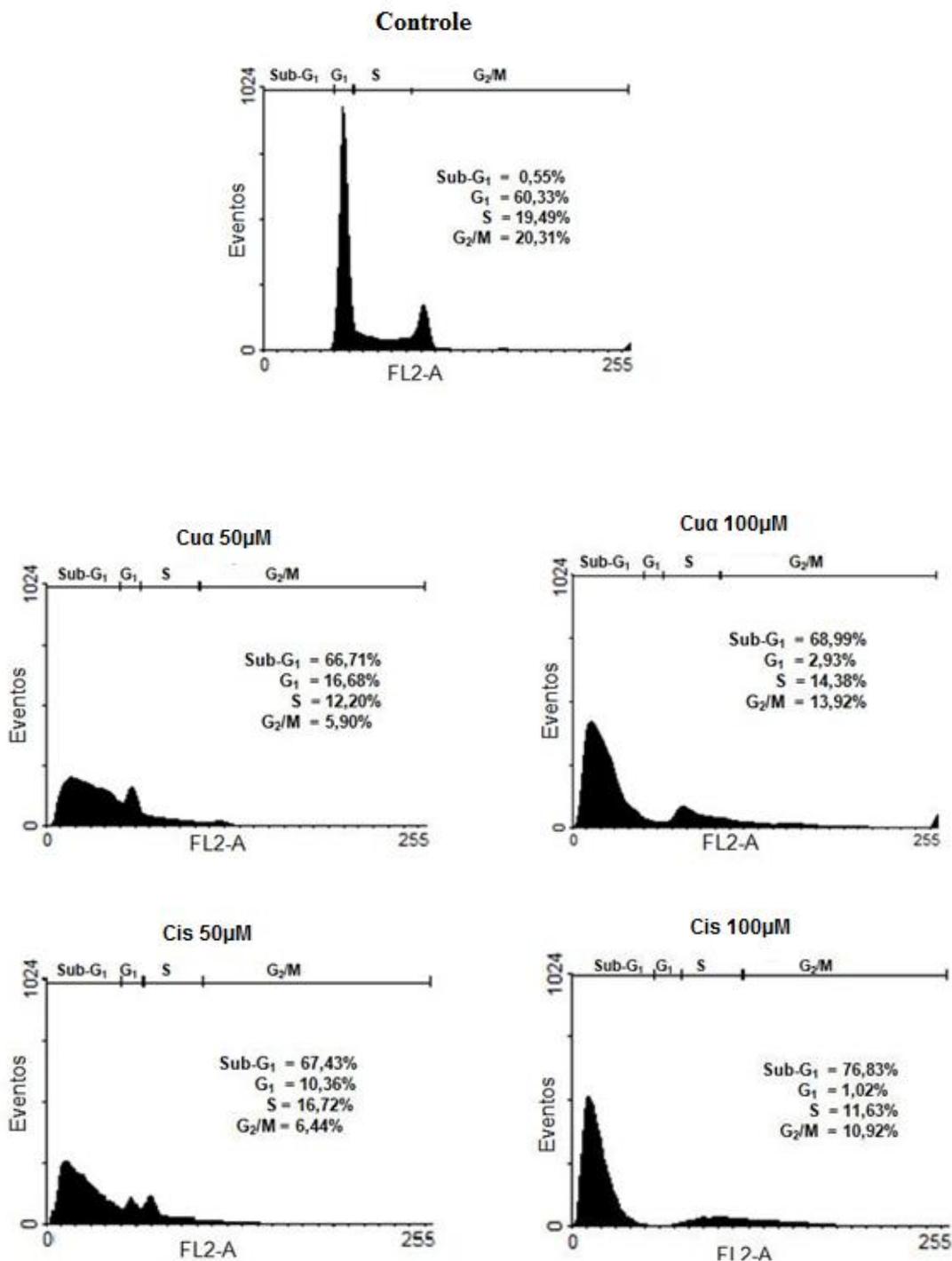


Figura 41: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem THP-1, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cua e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos.

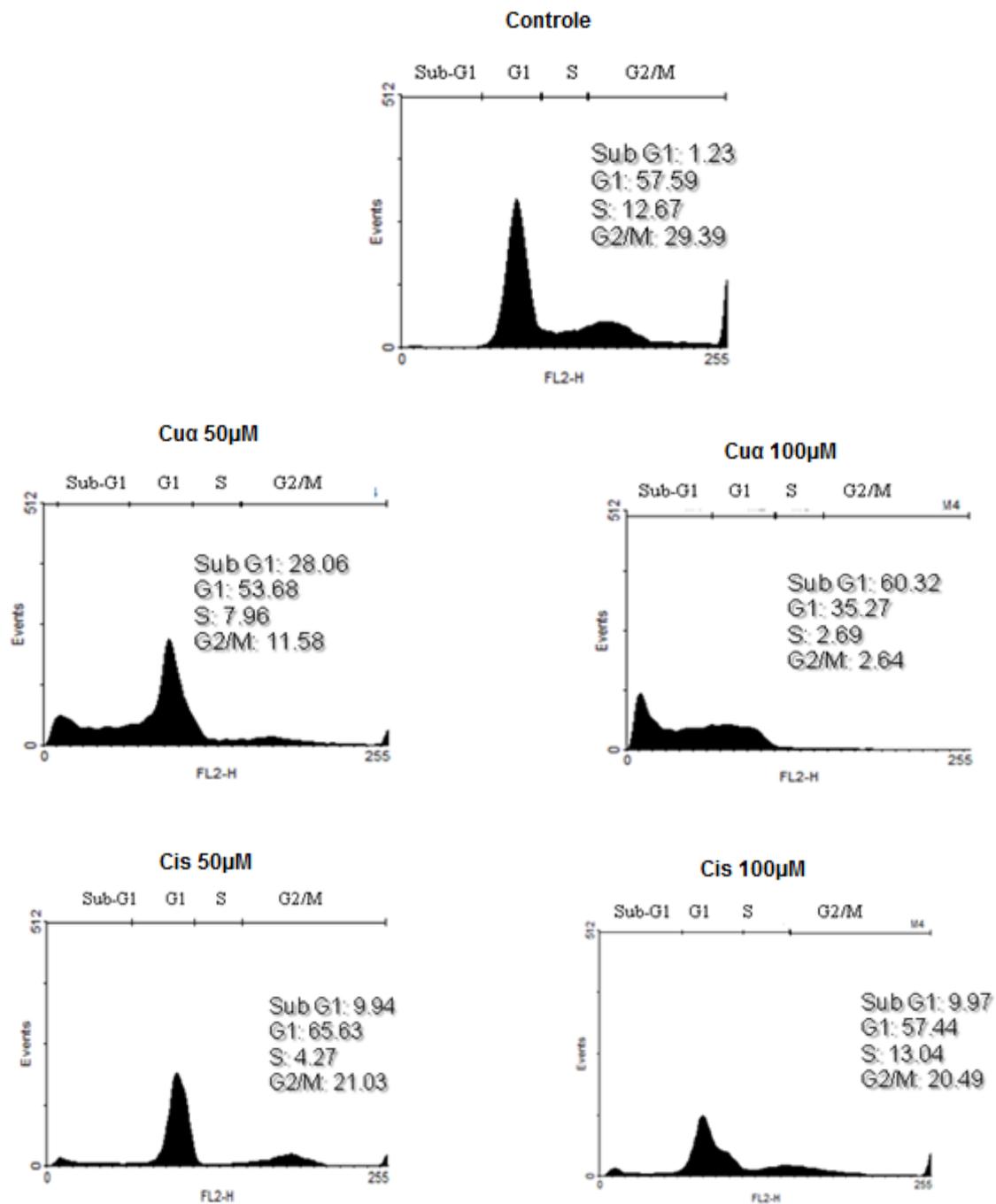


Figura 42: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem B16F10, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cu²⁺ e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos.

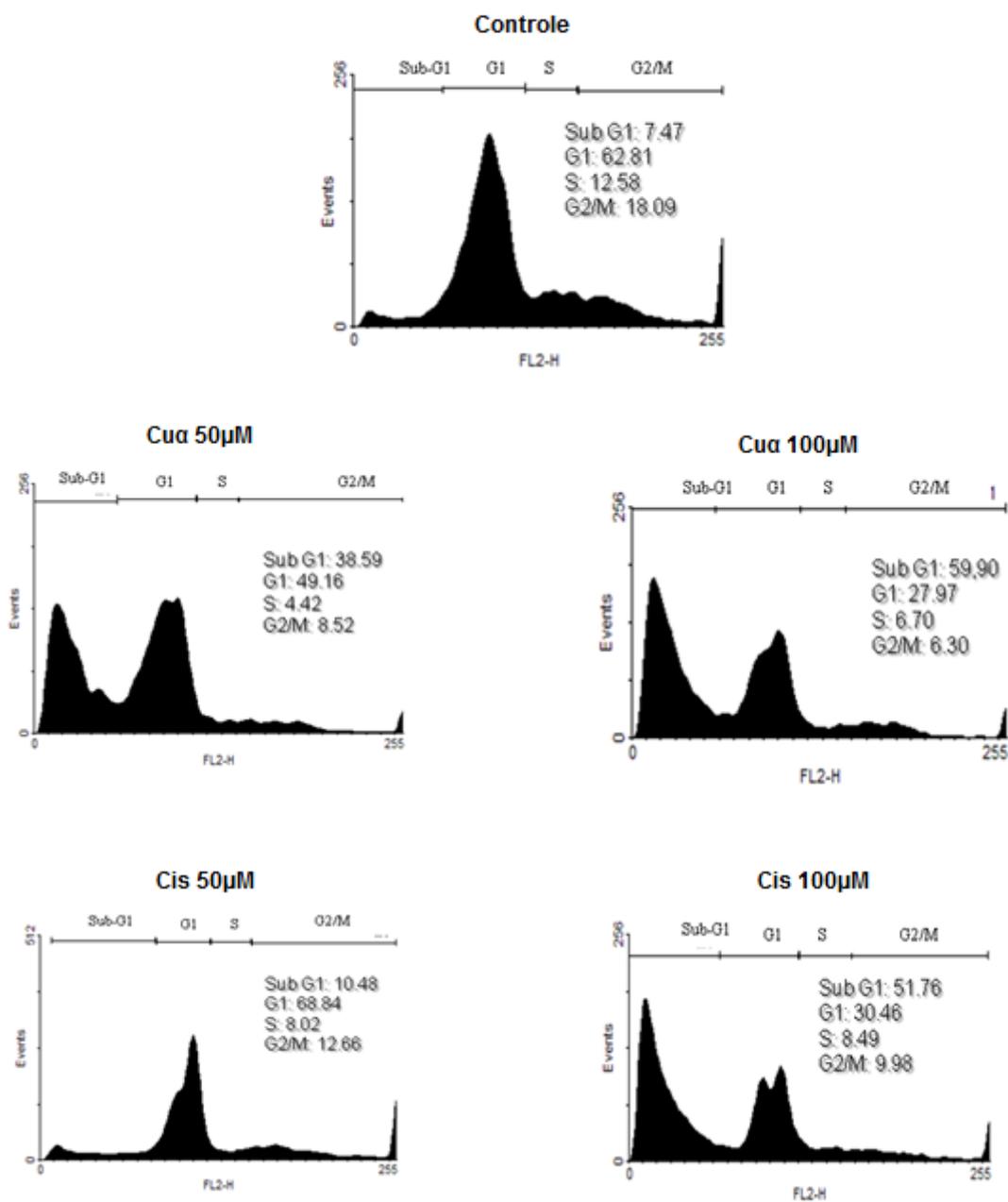


Figura 43: Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem SK-MEL5, após 24 horas de incubação com os compostos de coordenação (Cuα e Cisplatina). Células controle não foram submetidas ao tratamento com os compostos.

5.3.4 - Eletroforese em gel de agarose

O método, conhecido como DNA *laddering* (Williamson, 1970) foi utilizado para verificar a fragmentação internucleosomal do DNA das células neoplásicas, para confirmar de forma qualitativa a morte celular por apoptose observada pela análise do ciclo celular (Sub-G1).

Assim como para análise do ciclo celular as células foram incubadas por 24 horas com 50 e 100 μM do composto $\text{Cu}\alpha$. Após esse tempo as células foram submetidas à extração de DNA genômico e as amostras de DNA isoladas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose como descrito no item 4.4.9.

Como pode ser observado na figura 44, o composto $\text{Cu}\alpha$ foi capaz de induzir fragmentação do DNA nas linhagens U937, THP-1 e SK-MEL5 tanto em 50 μM quanto em 100 μM após 24 horas de incubação. Na linhagem B16F10 apenas em 100 μM foi observado o padrão de fragmentação característico do processo de apoptose, evidenciando mais uma vez uma maior resistência dessa linhagem. A fluorescência levemente mais fraca para linhagem SK-MEL5 em 100 μM é mais um indicativo que parte das células começa a entrar em processo de morte por necrose a partir dessa concentração.

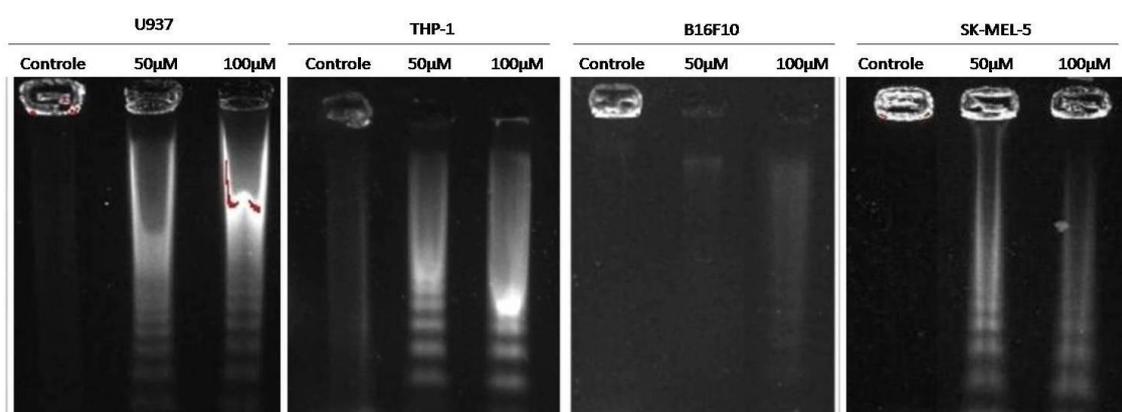


Figura 44: Eletroforese em gel de agarose para detecção de fragmentação do DNA em oligonucleotídeos nas linhagens U937, THP-1, B16F10 e SKMEL-5 após tratamento com 50 e 100 μM do composto $\text{Cu}\alpha$ durante 24 horas.

5.4 – Avaliação da via apoptótica ativada pelo composto Cu α

A fim de avaliar a via apoptótica de atuação do composto Cu α , utilizamos um conjunto de técnicas que nos permitiram propor uma possível via de ação, além de confirmar outras características do processo de morte celular por apoptose.

5.4.1 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pode ser feita utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro- 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) que difunde livremente para o interior da célula. Na mitocôndria, que apresenta potencial de membrana normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, permite o acúmulo deste fluorocromo no interior da mitocôndria. Quando a concentração do JC-1 se torna elevada na matriz mitocondrial ele forma agregados que fluorescem na região do vermelho. A forma monomérica do JC-1 emite fluorescência verde, assim, em células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana mitocondrial não ocorre a formação de agregados de JC-1 e as células apresentam citoplasma com fluorescência verde (Smiley *et al.*, 1991; Cossarizza *et al.*, 1993). O citômetro de fluxo quantifica as células que possuem mitocôndria normal e com potencial de membrana alterado por meio do detector FL1 (fluorescência 1) que capta luz na região do verde (510-527 nm) e do detector FL2 (fluorescência 2) que capta luz na região do laranja (585-590 nm).

As células foram incubadas com 50 e 100 μ M dos compostos Cu α e Cisplatina por 12 horas. Esse tempo foi escolhido baseado nos experimentos anteriores, já que a exposição de fosfatidilserina começa a acontecer um pouco antes disso e a fragmentação do DNA acontece depois.

As figuras 45 e 46 mostram os resultados na forma de gráficos *Dot-plots*, que representam os parâmetros de intensidade de fluorescência verde (FL1) e vermelha (FL2). A porcentagem de células com dissipação do potencial

mitocondrial de membrana foi determinada a partir da redução da intensidade de fluorescência vermelha das amostras. Pode ser observado nos controles, para todas as linhagens avaliadas, que a população celular se concentra predominantemente no quadrante “B” que corresponde a região do gráfico *Dot-plot* onde se encontram células com mitocôndrias viáveis (FL2).

Para todas as linhagens submetidas ao tratamento com os compostos Cu α e Cispatina, foi verificado um deslocamento da população celular do quadrante “B” para o quadrante “D”, onde se observa células com dissipação do potencial mitocondrial de membrana (FL1).

O composto Cu α foi capaz de reduzir o potencial de ação da membrana mitocondrial em mais de 90% para as linhagens U937, THP-1 e B16F10 e em quase 90% para linhagem SK-MEL5, além de novamente ter se mostrado mais eficaz do que a cisplatina, principalmente para linhagem B16F10, comprovadamente a linhagem mais resistente.

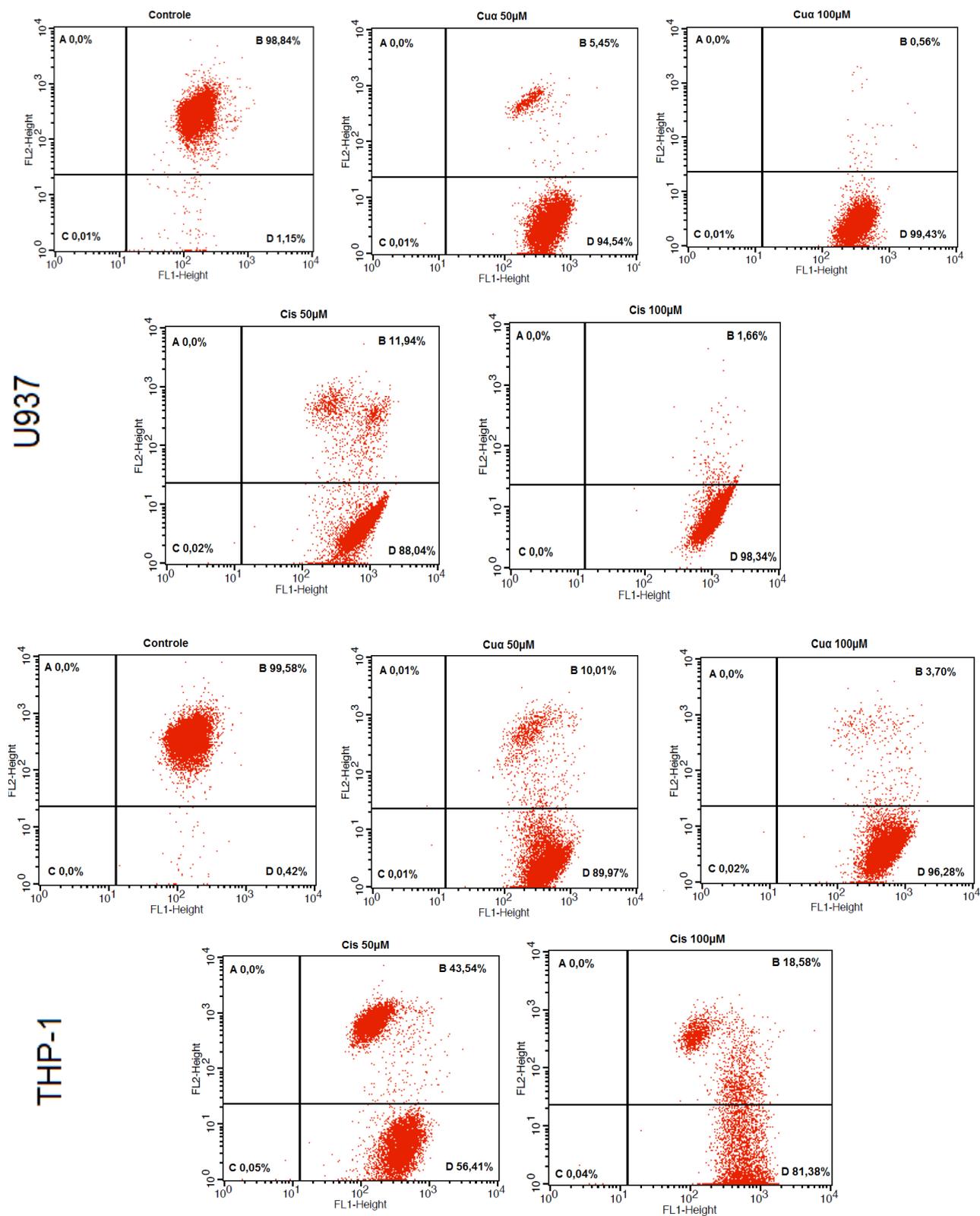


Figura 45: *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para as linhagens U937 e THP-1 submetidas a incubação de 12 horas com os compostos de coordenação (Cuα e Cisplatina). Quadrante B, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante C células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.

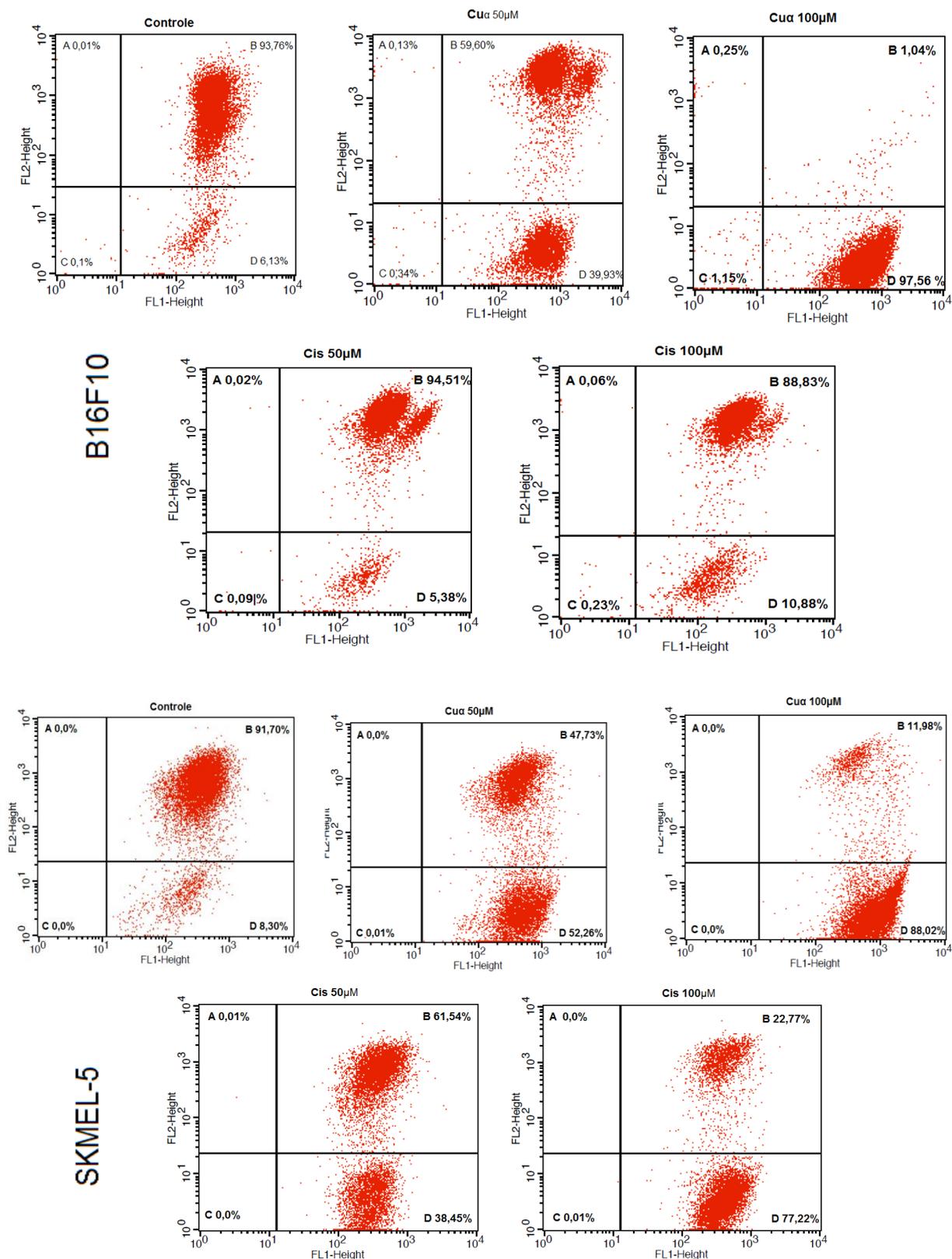


Figura 46: *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para as linhagens B16F10 e SK-MEL5 submetidas a incubação de 12 horas com os compostos de coordenação (Cu α e Cisplatina). Quadrante B, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante C células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.

5.4.2 – Avaliação da morfologia mitocondrial por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para verificar se a perda de potencial de membrana mitocondrial esta relacionada com mudanças morfológicas nas mitocôndrias, foi realizado a análise morfologia das mitocôndrias através da microscopia de fluorescência e MET.

A microscopia eletrônica de transmissão é considerada uma das melhores técnicas para avaliação das organelas celulares e das mudanças ultraestruturais (Salehnia *et al.*, 2002) ocorridas durante a morte celular programada, sendo, portanto, um dos métodos mais confiáveis e eficientes em demonstrar alterações morfológicas com maior precisão.

A microscopia de fluorescência foi utilizada em conjunto com a MET para avaliar de maneira geral o comportamento das mitocôndrias durante o processo de apoptose. Para esse ensaio foram utilizados os corantes *Mitotracker® Red CMXRos* e *Hoechst*. O primeiro entra nas células por difusão passiva e se acumula nas mitocôndrias ativas, fluorescendo em vermelho. O corante *Hoechst* entra livremente nas células e se liga a ácidos nucleicos, principalmente DNA, corando o núcleo em azul.

Células da linhagem U937 foram tratadas com 50 μM do composto $\text{Cu}\alpha$ durante 12 e 24 horas. Após esse tempo, as células foram lavadas e processadas de acordo com os itens 4.4.11 e 4.4.12 para posterior visualização em microscópio eletrônico de transmissão e microscópio de fluorescência respectivamente.

A figura 47-A mostra células controle, sem o tratamento com o composto $\text{Cu}\alpha$. Nessas células é possível ver na fluorescência o núcleo proeminente em azul e uma fina linha vermelha na periferia das células, correspondendo as mitocôndrias. Na micrografia eletrônica as mitocôndrias aparecem com o conteúdo mais eletrodense e sem nenhuma alteração morfológica (cabeça de setas). Também é possível perceber a integridade do retículo endoplasmático próximo as mitocôndrias. As figuras 47-B e 47-C mostram alterações nas mitocôndrias após tratamento com 50 μM do composto $\text{Cu}\alpha$. Em 12 horas já é perceptível na fluorescência o espalhamento das mitocôndrias pelo citoplasma,

possivelmente devido ao início do encolhimento do núcleo. Na microscopia eletrônica é possível verificar alterações a membrana interna mitocondrial (seta) e o colapso do retículo endoplasmático. Em 24 horas, o núcleo aparece com uma fluorescência mais intensa devido ao aumento da condensação da cromatina e a fluorescência mitocondrial se dissipa devido a perda do potencial de ação da membrana mitocondrial. Nas microscopia eletrônica é possível observar um avançado processo de vacuolização mitocondrial.

Esses resultados em conjunto com os dados de citometria para o potencial de membrana mitocondrial demonstram o colapso mitocondrial a partir de 12 horas de incubação com o composto $Cu\alpha$ e confirmam a ativação da via mitocondrial no processo de morte celular programada por apoptose.

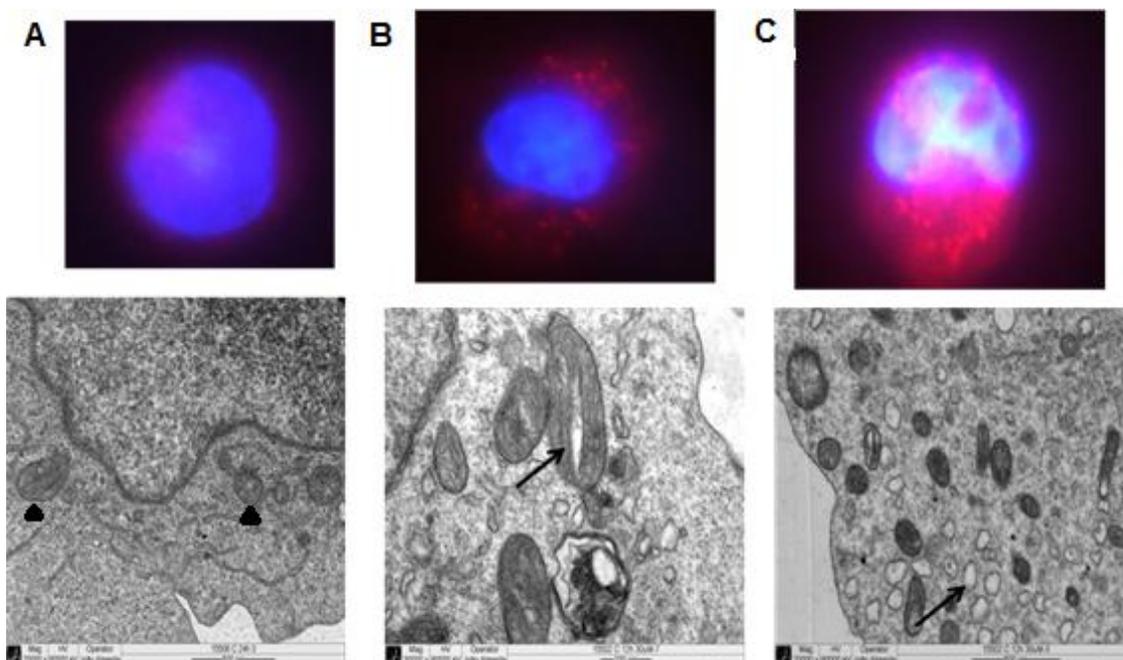


Figura 47: Mudanças morfológicas em mitocôndrias de células U937 tratadas com $50\mu\text{M}$ do composto $Cu\alpha$ durante 12 e 24h. A parte de cima da figura mostra imagens de fluorescência de células U937 (objetiva de 100x) marcadas com *mitotracker* (vermelho) e com o corante nuclear *Hoechst* (azul). A parte de baixo da figura mostra alterações mitocondriais visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Células controle. (B) Células incubadas com composto $Cu\alpha$ por 12h. (C) Células incubadas com o $Cu\alpha$ por 24h. A cabeça de seta indica mitocôndrias com morfologia normal (controle). As setas indicam mudanças morfológicas nas mitocôndrias como inchaço, deformação da membrana interna e vacuolização.

5.4.3 – Detecção da liberação de citocromo C e Avaliação do padrão de ativação de caspases

A fim de confirmar os resultados anteriores e de esclarecer se a via intrínseca da apoptose (via mitocondrial) é a única a ser ativada pelo composto $\text{Cu}\alpha$, foram realizados dois experimentos distintos. O primeiro para detectar a liberação de citocromo C em relação ao tempo de incubação da célula com o composto, e o segundo para quantificar a atividade de caspases específica da via mitocondrial ou via de receptores de morte (via extrínseca). Para a avaliação de atividade de caspases foram utilizados substratos para capase efetora 3, comum as duas vias de apoptose, para as caspases 4 e 8, específicas da via de receptores de morte e para as caspases 2 e 9, específicas da via mitocondrial.

Células U937 foram incubadas com 50 μM do composto $\text{Cu}\alpha$ durante os tempos de 6, 12, 24 e 36 horas para detecção de citocromo C e 3, 6 e 12 horas para avaliação da atividade das caspases. Para o ensaio de caspases a cisplatina também foi utilizada, seguindo os mesmos parâmetros de incubação do composto $\text{Cu}\alpha$, a fim de comparar alguma possível diferença no padrão de ativação de caspases pelos dois compostos.

A figura 48 mostra que o composto $\text{Cu}\alpha$, na concentração de 50 μM , induz liberação de citocromo C mitocondrial de maneira tempo dependente. O gráfico mostra que a medida em que o citocromo C aumenta na fração citoplasmática (FC) diminui na fração mitocondrial (FM), com as curvas se encontrando entre 10 e 15 horas de incubação. Esses dados, juntamente com os resultados do potencial de membrana mitocondrial e com as imagens das microscopias de fluorescência e eletrônica de transmissão, confirmam que o composto $\text{Cu}\alpha$ age na mitocôndria promovendo a liberação de citocromo C, contribuindo assim, com o processo de morte celular por apoptose.

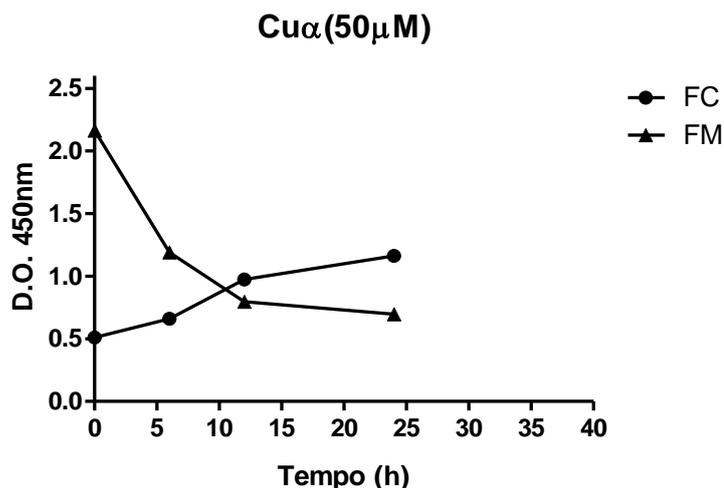


Figura 48: Detecção da liberação de citocromo C em células U937 após incubação com o composto Cu α por 6, 12, 24 e 36 horas (n=2). A detecção da liberação do citocromo c foi feita utilizando o *Kit-Cytochrome c ELISA (Calbiochem[®])*. FM, fração mitocondrial. FC, fração citoplasmática.

A figura 49 mostra o padrão de ativação de caspases do composto Cu α e da cisplatina. Para o composto Cu α é possível observar que as caspases da via mitocondrial (2 e 9) estão ativas a partir de 6 horas (caspase 2) e 12 horas (caspase 9), que corresponde ao tempo aproximado de liberação de citocromo C pela mitocôndria. Em contrapartida as caspases da via de receptores (4 e 8) já estão ativadas a partir das 3 horas de incubação. Para cisplatina as caspases 2, 8 e 9 aparecem a partir das 6 horas e a caspase 4 não está ativa em nenhum dos tempos.

Esses dados demonstram que apesar da mitocôndria participar do processo de morte celular, o sinal apoptótico, induzido pelo composto Cu α , provavelmente é disparado pela via extrínseca e é amplificado pela via mitocôndrial. O mesmo não ocorre com a cisplatina, onde o sinal apoptótico parece começar na mitocôndria e então ativar as outras caspases.

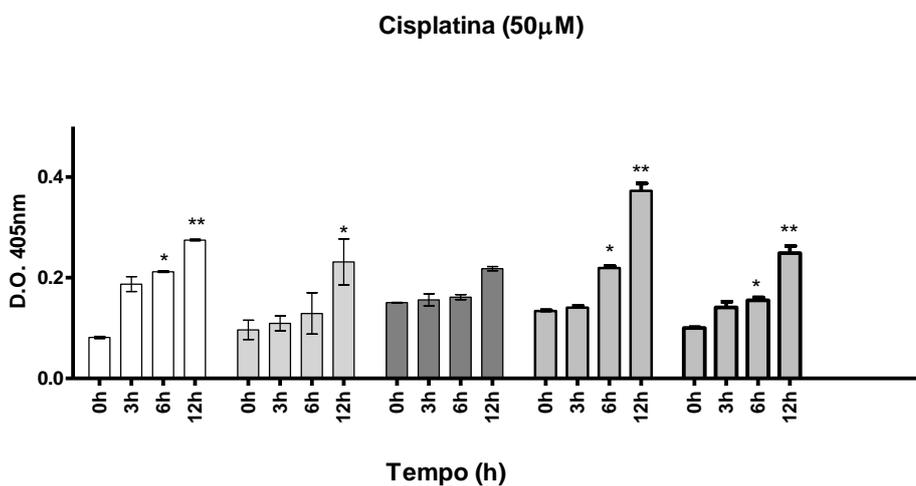
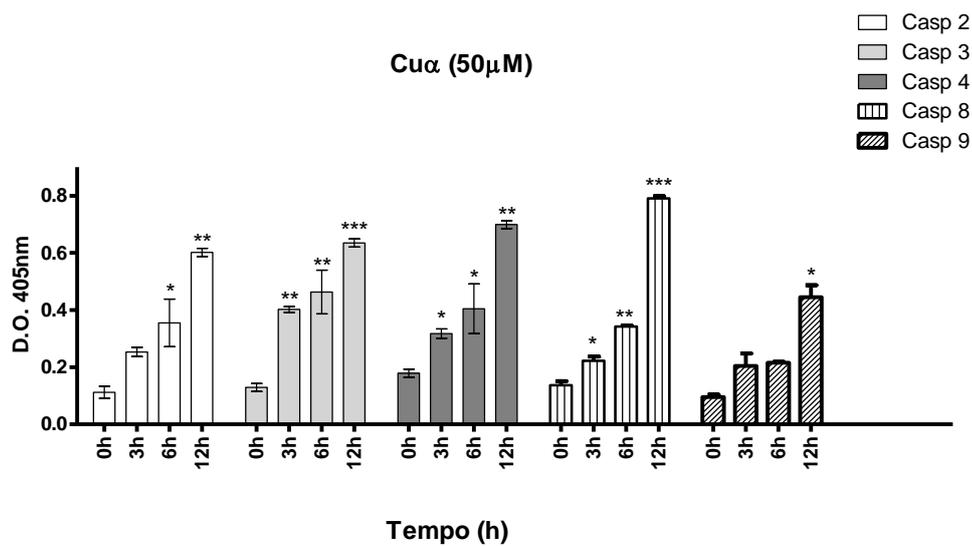


Figura 49: Avaliação da atividade das caspases 2, 3, 4, 8 e 9 em células U937 após incubação com os compostos Cu α e Cisplatina por 3, 6 e 12 horas (n=2). A atividade das caspases foi avaliada utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (tempo zero).

6 – DISCUSSÃO

O câncer representa um dos mais graves problemas de saúde em diversos países. Nas últimas décadas, esse conjunto de doenças ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública global.

Os vários tipos de câncer se originam devido ao mau funcionamento de vários sistemas de controle de uma célula (Sompayrac, 2004). Sem a ação adequada dos sistemas de controle, essa célula mutante sofre uma proliferação anormal que leva à formação de uma população de células tumorais que cresce ativamente. A progressão do tumor continua com mutações adicionais que ocorrem nas células em proliferação. Essas mutações podem ter uma variedade de efeitos nas células, mas eventualmente resultam em um crescimento ainda mais acelerado (Cooper, 1993).

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. No entanto, a resistência intrínseca e extrínseca a drogas antitumorais é o maior obstáculo para o seu sucesso (Kohno *et al.*, 2005). Desta forma, existem diversas pesquisas em busca de novas drogas que possam atuar de forma mais eficaz. Entre as abordagens utilizadas na busca de novas drogas está a síntese de compostos metálicos que possam interagir com o DNA, baseada na descoberta de que o composto *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (cisplatina) age através dessa interação (Burrows e Muller, 1998).

Os estudos dos processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos no câncer mostram que a maioria dos fármacos antitumorais, orgânicos ou de coordenação, como a cisplatina, promove a morte das células cancerígenas pelo mecanismo de apoptose. As alterações genéticas das células tumorais que ocorrem nos centros regulatórios da apoptose e de suas vias de sinalização, têm enfatizado a maquinaria apoptótica como um interessante alvo potencial no planejamento de novos fármacos antitumorais.

Como já relatado, a cisplatina entra livremente nas células tumorais e tem como alvo celular principal o DNA, com o qual forma aductos. Esses aductos, por sua vez, bloqueiam a replicação e a transcrição do DNA induzindo

morte celular através de mecanismos de apoptose ou necrose (Fuertes *et al.*, 2003).

Dentre os compostos de coordenação sintetizados pela equipe de química bioinorgânica do Laboratório de Ciências Químicas alguns demonstraram essa característica de interação com o DNA. Fernandes e colaboradores, em 2006, demonstraram que o composto de coordenação de cobre $[\text{Cu}(\text{HPCINOL})\text{Cl}]\text{Cl}$ foi capaz de clivar o DNA plasmidial pB II KS+ e induzir apoptose em células THP-1. Acredita-se que o mecanismo de clivagem do DNA seja via hidrólise, uma vez que os experimentos conduzidos na ausência e presença de oxigênio mostraram resultados similares.

Outro composto sintetizado pelo grupo também foi testado quanto a sua atividade nucleásica. Em 2008, Parrilha e colaboradores mostraram que o composto de ferro, $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)]_2 \cdot \mu\text{-oxo} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, foi capaz de promover a clivagem do DNA fita dupla e fita simples em concentrações muito baixas e pH fisiológico, tanto em ambiente aeróbico quanto anaeróbico. O que indica que o processo de clivagem deve seguir um mecanismo hidrolítico.

A literatura mostra que vários outros compostos de coordenação também podem interagir com o DNA, levando ao processo de apoptose, por interrupção da replicação ou clivagem da molécula, como por exemplo, $[\text{Fe}_2(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]_{2+}$ (Neves *et al.*, 2001), Zn_2HP (Sissi *et al.*, 2001), $[\text{Fe}_2(\text{IDB})_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-OAc})_2]\text{Cl}_2$ (Liu *et al.*, 2002), $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]$ ou NAMI-A (Hartinger *et al.*, 2008) e $[\text{InH}][\text{trans-RuCl}_4\text{In}_2]$, conhecido como KP1019 (Levina *et al.*, 2009).

Apesar da maioria dos compostos de coordenação atuar por meio de interação com o DNA, muitos outros podem não agir dessa forma ou ainda atuar através de vários mecanismos de ação, interagindo, assim, com múltiplos alvos celulares como proteínas e RNA. Compostos contendo gálio, por exemplo, assim que entram na célula, desencadeiam um mecanismo antiproliferativo, correspondendo à inibição da síntese do DNA através da desativação da ribonucleotídeo redutase (RR), enzima responsável pelo controle da concentração celular dos desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP). A atividade da RR é inibida através da coordenação do gálio com a sua subunidade R2, levando à desestabilização do radical tirosilo essencial para a

atividade enzimática. Isto leva à depleção de dNTP, impedindo a síntese de DNA, promovendo perturbações no ciclo celular (interrupção da síntese de microtúbulos, essenciais para o processo de divisão). Isto acaba por levar ao mecanismo de apoptose através da ativação das enzimas pró-apoptóticas Bax e caspase 9 na mitocôndria (Perchellet *et al.*, 1999).

A maioria dos compostos de coordenação de ouro também não possui o DNA como alvo principal. A citotoxicidade desses compostos é mediada pela capacidade de alterar as funções mitocondriais e de inibir a síntese de proteínas (McKeage, *et al.*, 2002). Uma dessas proteínas é a enzima redutase tireodoxina humana (hTrxR), que está associada a muitos processos celulares como defesa antioxidante e homeostase redox. Essa enzima é encontrada em grandes quantidades em células tumorais, existindo uma relação direta com a proteína reguladora de apoptose p53, o que faz da hTrxR um interessante alvo antitumoral (Bruijninx e Sadler, 2008).

Baseado em dados da literatura e em estudos prévios, objetivamos neste trabalho investigar a atividade e o mecanismo de ação de 4 compostos de coordenação contendo as duas formas isoméricas da molécula derivada do naftol: 2-(1-naftiloximetil)oxirano, aqui chamado de P2 ou α -naftol, e 2-(2-naftiloximetil)oxirano, aqui chamado de P3 ou β -naftol, hibridizadas com outra molécula, o HBPA (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina, aqui chamado de P1. Esses ligantes híbridos [1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol] ou $L\alpha$ e [1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}{-3-(2-naftiloxi)-2-propanol] ou $L\beta$ foram então complexados com os sais de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e zinco (ZnCl_2) para obtenção dos 4 complexos finais $[\text{Cu}(L\alpha)\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Cu}\alpha$, $[\text{Cu}(L\beta)\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Cu}\beta$, $[\text{Zn}(L\alpha)\text{Cl}]$ ou $\text{Zn}\alpha$ e $[\text{Zn}(L\beta)\text{Cl}]$ ou $\text{Zn}\beta$.

O precursor HBPA (P1), utilizado para a obtenção dos novos compostos orgânicos, foi avaliado quanto a sua atividade antineoplásica por Bull (2008), que verificou em seu trabalho que o mesmo foi ativo frente as linhagens leucêmicas U937 e THP-1, na concentração de 400 μM . A literatura também mostra que o naftol, utilizado separadamente, apresenta atividade frente a uma grande variedade de células neoplásicas (Cohen *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1985). A eficácia da hibridação desses dois precursores e sua complexação com sal de cobre também já foi demonstrada em trabalho recente do nosso

grupo (Lopes, 2012). Este estudo mostrou que a complexação do ligante híbrido com o sal de cobre aumentou a atividade do complexo frente às linhagens leucêmicas THP-1 e U937, obtendo índices de EC_{50} abaixo de 30 μ M.

Os ligantes ($L\alpha$ e $L\beta$) e os compostos de coordenação ($Cu\alpha$, $Cu\beta$, $Zn\alpha$ e $Zn\beta$) foram testados frente a 4 linhagens de células neoplásicas, sendo duas leucêmicas (U937 e THP-1), normalmente mais sensíveis à cisplatina, e duas linhagens melanômicas (SK-MEL e B16F10), escolhidas por apresentarem certa resistência à cisplatina.

Inicialmente, foi feito um *screening* (através do ensaio de MTT) com todos os compostos e todas as 4 diferentes linhagens celulares para verificar quais dos compostos iriam interferir na viabilidade celular. Após 36 horas de incubação, foi verificado que os compostos de cobre ($Cu\alpha$ e $Cu\beta$) bem como o ligante $L\alpha$ promoveram um efeito citotóxico em todas as linhagens testadas. A partir da concentração de 50 μ M, todos os compostos foram capazes de provocar uma redução significativa no número de células neoplásicas quando comparado com grupo controle. O mesmo não ocorreu para os compostos de zinco ($Zn\alpha$ e $Zn\beta$) e para o ligante $L\beta$, que não foram capazes de interferir na viabilidade das células, nem na maior concentração (figuras 30 e 31).

O ligante $L\beta$ apresentou pouca atividade provavelmente em virtude da sua baixa solubilidade em meio aquoso, característica importante para um fármaco em potencial. Esse ligante foi inicialmente dissolvido em DMSO e posteriormente em meio de cultivo celular DMEM-F12 para alcançar as concentrações finais de trabalho. Como o meio DMEM-F12 é predominantemente aquoso, o composto fica apenas parcialmente solúvel, reduzindo, assim, sua atividade. No entanto, a reação de complexação com o sal de cobre elevou o caráter hidrofílico do complexo, o qual passou a ser solúvel e apresentar IC_{50} consideravelmente baixa (tabela 4). O mesmo não ocorreu na reação de complexação do ligante $L\beta$ com o sal de zinco, já que o composto $Zn\beta$ também teve problemas de solubilidade, apresentando assim baixa atividade frente às células neoplásicas.

O isômero $L\alpha$ não teve problemas de solubilidade em meio aquoso e demonstrou alta atividade frente às linhagens testadas com os valores de IC_{50} variando entre 25 e 50 μM . A complexação desse ligante com o sal de cobre manteve o caráter hidrofílico do composto final ($Cu\alpha$) e aumentou a atividade do complexo, como pode ser visto pelos valores da IC_{50} , que caíram para todas as linhagens testadas (11 a 35 μM , tabela 4). O mesmo, porém, não foi observado após a reação de complexação entre o ligante $L\alpha$ e o sal de zinco, pois o composto final ($Zn\alpha$) também foi apenas parcialmente solúvel em meio aquoso, não apresentando atividade significativa frente às linhagens testadas.

O ensaio de viabilidade por MTT pôde demonstrar a importância dos ligantes para a atividade antineoplásica observada. Além disso, a potencialização dessa atividade biológica após a complexação entre os ligantes $L\alpha$ e $L\beta$ e o sal de cobre evidencia a importância do centro metálico de cobre para a atividade antitumoral dos complexos finais. Esse ensaio também demonstrou que o $Cu\alpha$ foi mais ativo quando comparado à cisplatina para todas as linhagens testadas, inclusive para B16F10, linhagem mais resistente à cisplatina.

Com a finalidade de verificar a seletividade dos compostos para as células neoplásicas, foi avaliada a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), por MTT, nas mesmas condições e concentrações utilizadas para as células neoplásicas. Este teste foi realizado somente com os compostos que tiveram atividade frente às 4 linhagens (compostos de cobre e o ligante $L\alpha$). Os compostos mostraram não interferir na viabilidade das células normais de maneira significativa. Somente o composto $Cu\alpha$ demonstrou uma EC_{50} abaixo de 200 μM , o que, mesmo assim, é considerado alto se comparado EC_{50} calculada para as linhagens leucêmicas e melanômicas. A EC_{50} desse composto foi de 166 μM contra 44 μM da cisplatina, o que demonstra que o composto $Cu\alpha$ é aproximadamente 4 vezes menos tóxico do que a cisplatina *in vitro* para células normais (figura 32 e tabela 4).

O ensaio *in vivo* para determinação da dose letal 50% (DL_{50}) foi realizado para verificar se essa diferença de toxicidade entre o composto $Cu\alpha$ e a cisplatina se mantinha. O ensaio foi feito apenas com esse composto por ter sido o mais ativo *in vitro* e para evitar o número excessivo de animais

utilizados. Após a inoculação de diversas concentrações do composto $\text{Cu}\alpha$, camundongos C57BL/6 foram acompanhados durante 30 dias quanto à taxa de sobrevivência. Essa linhagem foi escolhida devido ao modelo *in vivo* de câncer de pele, utilizando a linhagem B16F10, ser desenvolvido nesses animais. Esse modelo já é bem documentado na literatura (Fukumasu *et al.*, 2008; Favero *et al.*, 2010) e vem sendo reproduzido por alunos de nossa equipe, bem como os modelos utilizando a linhagem BALBc/NUDE para o estabelecimento *in vivo* das linhagens humanas (SK-MEL, U937 e THP-1).

A DL_{50} para o composto $\text{Cu}\alpha$ ficou em torno de 55 mg kg^{-1} ($9,4 \times 10^{-2} \text{ mmol kg}^{-1}$) como mostra o gráfico da figura 33. Dados da Universidade de São Paulo mostram que a cisplatina possui uma DL_{50} de $6,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ($2,2 \times 10^{-2} \text{ mmol kg}^{-1}$) para camundongos (*Cisplatin Injection*, USP, 2005). Outros dados da literatura mostram que, mesmo para ratos, a dose letal da cisplatina capaz de matar 50% dos animais é de $14,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ($4,8 \times 10^{-2} \text{ mmol kg}^{-1}$) (Yan e Gemeinhart, 2005). Esses dados demonstram que, assim como *in vitro*, o composto $\text{Cu}\alpha$ é menos tóxico do que a cisplatina para células normais *in vivo*, sendo necessária uma dose aproximadamente 4 vezes maior (em mmol kg^{-1}) do composto de cobre para matar a mesma quantidade de animais que a cisplatina.

Dentre os compostos metálicos com atividade antitumoral, acredita-se que complexos contendo metais endógenos, como o cobre e zinco, sejam menos tóxicos ao organismo, o que possibilita explorar as suas propriedades biológicas, buscando a redução da sua toxicidade. Ligantes adaptados para reagirem com metais podem desempenhar um papel importante na redução da toxicidade dos metais e potencialização das suas propriedades terapêuticas (Storr *et al.*, 2006).

Na literatura, é possível encontrar muitos exemplos de complexos de cobre - associado com inúmeros ligantes - que possuem atividade antitumoral. Osowole e colaboradores (2011) verificaram que o ligante HL [3-{1-(4,6-dimetil-2-pirimidinilimino)metil-2-naftol}] apresentou IC_{50} de $79,33 \mu\text{M}$ para células de melanoma. Já o complexo de cobre (CuL_2), obtido a partir deste ligante, apresentou IC_{50} de $11,20 \mu\text{M}$, o que demonstrou que a reação de complexação com cobre foi responsável pela maior atividade do complexo CuL_2 em relação ao seu ligante HL. Complexos de cobre contendo o ligante

tiosemicarbazona têm sido bastante investigados quanto à atividade antitumoral. Tiossemicarbazonas (TSCs) são moléculas orgânicas já bem descritas, e tiveram sua atividade antitumoral documentada pela primeira vez nos anos 60 (Crim e Petering, 1967). Contudo, alguns estudos mostram que, quando complexadas ao cobre(II), a atividade das TSCs aumenta de maneira significativa, evidenciando a importância do metal para o efeito biológico da molécula (Easmon *et al.* 2001).

Além das TSCs, outros ligantes são utilizados para a síntese de compostos de coordenação de cobre. Entre os que mais se destacam estão: complexos conjugados a base de *Schiff*, complexos contendo imidazol, benzimidazol, pirazol e triazol, complexos contendo fenantrolina e biperidina. Assim como para outros metais, a natureza da molécula ligante interfere diretamente na atividade do cobre. São inúmeros os exemplos na literatura de ligantes complexados ao cobre, gerando compostos com atividade antitumoral contra os mais diversos tipos de células neoplásicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Marzano *et al.*, 2009).

Após o *screening* inicial para selecionar os compostos mais ativos, o próximo passo foi então descobrir qual era o tipo de morte induzida pelos compostos dentre os dois mecanismos mais estudados: apoptose e necrose.

A morte celular programada ou apoptose é a principal forma de morte celular e é central para diversos processos biológicos. A apoptose pode ser ativada em resposta a estímulos específicos ou a várias formas de injúria ou estresse celular (Hannun, 1997). A maioria das drogas com diferentes estruturas e especificidades induzem mudanças morfológicas características associadas com apoptose, e acredita-se que vias apoptóticas contribuem para a ação citotóxica da maioria das drogas quimioterapêuticas (Lowe e Lin, 2000). Diferente da apoptose, a morte celular por necrose se processa como uma resposta a estímulos agressivos, como a exposição a tóxicos. Na necrose, ocorre liberação de citocinas, provocando resposta inflamatória no local, fato que difere da morte por apoptose (Ziegler e Groscurth, 2004).

Os compostos Cu α , Cu β e L α , bem como a cisplatina foram, então, testados quanto a capacidade de induzir apoptose ou necrose nas quatro linhagens de células neoplásicas. Os gráficos das figuras 34, 35, 36 e 37

mostram apenas a porcentagem de apoptose induzida pelos compostos após 12, 14 e 36 horas. Para maioria das linhagens as taxas de necrose não excederam os 3% para todos os compostos em todas as concentrações testadas, mesmo após 36 horas (dados não mostrados). No entanto, para linhagem SKMEL-5 o composto $Cu\alpha$ induziu altas taxas de necrose em concentrações a cima de 100 μM . Isso explica a queda na taxa de apoptose a partir de 36 horas na concentração de 100 μM para linhagem SKMEL-5, como mostra a figura 37. Assim como no teste de viabilidade por MTT o composto $Cu\alpha$ mostrou ser o mais eficiente na indução de apoptose quando comparado aos compostos $Cu\beta$, $L\alpha$ e cisplatina para todas as linhagens testadas. Esses dados confirmam que a complexação do ligante ($L\alpha$) com o sal de cobre ($CuCl_2$) leva a um composto com maior atividade quando comparada a atividade dos seus precursores.

Sabe-se que muitos compostos (derivados de produtos naturais ou sintéticos) utilizados amplamente no tratamento de neoplasias como, por exemplo, o taxol (Blagosklonny *et al.*, 1996) e a cisplatina (Gonzalez *et al.*, 2001), induzem morte celular por apoptose mesmo que por mecanismos distintos. Devido ao sucesso quimioterápico dessas drogas a análise de indução de apoptose é usada como um método de triagem de compostos com ação antineoplásica. Como dito anteriormente, a apoptose é caracterizada por um padrão bioquímico e morfológico próprio que a distingue da morte celular por necrose. Dentre as principais características destacam-se: exposição de fosfatidilserina na membrana externa da célula, perda do potencial de ação da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C pela mitocôndria, ativação de caspases, condensação da cromatina e fragmentação do DNA.

Sendo assim, para confirmar a morte celular por apoptose, diversas metodologias quantitativas e qualitativas foram, então, empregadas a fim de demonstrar com maior precisão o mecanismo de morte celular induzida pelos compostos nas linhagens neoplásicas testadas. As técnicas utilizadas levaram em consideração recomendações do comitê de nomenclatura de morte celular (NCCD) (Galluzzi *et al.*, 2011).

Quase todos os testes foram feitos com ambos os compostos ($Cu\alpha$ e $Cu\beta$) e os isômeros parecem atuar da mesma maneira. Contudo, o complexo

Cu α se mostrou como mais ativo em todos os testes. Por isso, apenas os resultados para esse composto foram apresentados a partir desse ponto, a fim de facilitar a ordem e compreensão das características do evento da morte celular programada.

Um dos parâmetros clássicos para detecção do processo apoptótico é a dosagem da exposição de fosfatidilserina na membrana celular externa. Durante a apoptose as células modificam a estrutura de suas membranas para sinalizar o início do processo de morte celular programada. No organismo esses sinais são captados por fagócitos que tem a função de remover restos de células que morreram por apoptose. A externalização de fosfatidilserina é uma das mudanças estruturais que são reconhecidas pelas células fagocíticas. A anexina V é uma proteína de ligação de fosfolipídeos que pertence a família das Anexinas e na presença de íons cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva com fosfatidilserina e baixa afinidade para outras espécies de fosfolipídeos. O iodeto de propídio (PI) é um intercalante do DNA muito utilizado como marcador fluorescente por ser estável e de baixo custo (Rieger *et al.*, 2011). O PI só é capaz de entrar na célula e se intercalar no DNA se a membrana plasmática estiver rompida, o que vai evidenciar o processo de necrose primária ou apoptose tardia (necrose secundária ou apoptose-necrose). Devido a seu alto grau de confiabilidade a dupla marcação com anexina V e PI tem se mostrado como uma técnica altamente seletiva para determinação do tipo de morte celular induzida por novas drogas (Koopman *et al.*, 1994).

Os resultados, apresentados nas figuras 38 e 39, confirmam os dados apresentados pela microscopia de fluorescência. O composto Cu α foi capaz de induzir altas taxas de apoptose em todas as linhagens testadas em apenas 12 horas de incubação. Esse tempo foi escolhido devido à exposição de fosfatidilserina ser um evento que ocorre logo nas primeiras horas do processo apoptótico. Esse resultado também confirma o fato do composto Cu α induzir necrose na linhagem SKMEL-5 em concentrações acima de 100 μ M (56,11%) e demonstra que a cisplatina não induz altas taxas de apoptose nas linhagens melanômicas dentro de 12 horas (em torno de 5% para SKMEL-5 e 10% para B16F10 na concentração de 100 μ M). Por sua vez, o composto Cu α , nessa

mesma concentração, foi capaz de induzir aproximadamente 42% de apoptose na linhagem SKMEL-5 e 84% na linhagem B16F10 (figura 39).

A constatação do mecanismo de morte celular por apoptose é crucial para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais. Como algumas características da apoptose e necrose acabam se sobrepondo, o uso de várias técnicas independentes somam resultados importantes para a confirmação do mecanismo de morte induzida por compostos com atividade antineoplásica.

A fragmentação internucleossomal do DNA genômico em oligonucleotídeos de tamanhos regulares é uma característica bioquímica chave do processo de apoptose e uma das características mais aceitas como comprovação desse processo.

Sendo assim, o processo de morte celular por apoptose também foi confirmado pela análise de fragmentação do DNA, realizado por duas metodologias diferentes: análise do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1) e padrão *laddering* de fragmentação por eletroforese em gel de agarose. Como a fragmentação do DNA é um evento tardio no processo de apoptose, para esses experimentos, as células foram incubadas durante 24 horas com os compostos Cu α e cisplatina para o ensaio de sub-G1 e com o composto Cu α para o ensaio de eletroforese.

Novamente os dados para fragmentação do DNA comprovam os dados anteriores e demonstram que o composto Cu α é capaz de promover o deslocamento da população celular para o pico sub-G1 em todas as linhagens testadas (figuras 40-43), o que indica morte celular por apoptose. Mais uma vez a linhagem B16F10 mostrou resistência a cisplatina, mesmo após 24 horas de incubação. A eletroforese em gel de agarose confirmou qualitativamente esses dados, demonstrando que o composto Cu α induz apoptose nas linhagens testadas, evidenciando o padrão em escadas (*laddering*) de fragmentação do DNA (figura 44). Para linhagem B16F10 a fragmentação não se mostra tão evidente quando comparado com as outras linhagens. Em parte isso pode ser devido a maior resistência dessa linhagem em relação às outras. Além disso, essa é a única linhagem que exige o tratamento com tripsina durante o processamento, o que pode ter interferido em uma melhor visualização do DNA.

O conjunto de dados apresentados até aqui permitiu concluir que o composto Cu α induz morte celular por apoptose nas linhagens U937, THP-1 e B16F10 nas concentrações testadas e na linhagem SK-MEL5 em concentrações inferiores a 100 μ M. Através de técnicas quantitativas e qualitativas foram demonstradas diversas características do processo apoptótico, como condensação da cromatina, externalização de fosfatidilserina e fragmentação do DNA. Também pode ser observado que o composto Cu α foi mais ativo do que a cisplatina em grande parte dos testes, o que nos leva a pensar sobre mecanismos de atuação diferentes ou complementares ao da cisplatina.

O próximo passo foi então avaliar a provável via de ativação do mecanismo de morte celular induzida pelo composto de coordenação Cu α . Para isso foram utilizadas técnicas que nos permitiram inferir qual das duas vias apoptóticas esta sendo ativada por esse composto. Examinando os padrões de ativação de caspases seguido de diferentes estímulos apoptóticos, pelo menos duas distintas vias foram elucidadas. A via mitocondrial e a via dos receptores de morte. A primeira é iniciada a partir do complexo Apaf1-citocromo C que ativa caspase 9 e culmina com a ativação da caspase 3, caspase efetora que é comum às duas vias. A via de receptores de morte é iniciada por um estímulo externo que culmina na ativação da caspase 8. Depois de ativada, a caspase 8 cliva e ativa a caspase 3 (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

Como descrito na introdução a cisplatina pode possuir múltiplos alvos celulares, sendo um dos principais a mitocôndria. De fato, essa organela é um dos principais alvos para o estudo de drogas com atividade antitumoral (Pathania *et al.*, 2009; Frezza e Gottlieb, 2009). A mitocôndria é uma organela celular responsável pela produção aeróbia de ATP que ocorre a partir da cadeia respiratória onde o citocromo C atua como receptor de elétrons. O gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial pode ser afetado pela formação de poros na membrana mitocondrial externa por meio de dímeros formados pelas proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad e Bid), o que acarreta em extravasamento do citocromo C para o citosol, que por sua vez pode deflagrar

o processo de apoptose ativando determinados tipos de caspases (Narita *et al.*, 1998; Desagher *et al.*, 1999).

Sendo assim, foram avaliados alguns parâmetros que nos permitiram inferir a participação das mitocôndrias no processo apoptótico. Começamos por avaliar se o tratamento com os compostos interferem com o potencial de membrana mitocondrial (PMM). A alteração do potencial de membrana é um passo importante na indução da apoptose pela via mitocondrial, já que tem como consequência a liberação de citocromo C e a ativação de caspases. As figuras 45 e 46 mostram os *Dot-plots* das células controles e tratadas com o composto Cu α e cisplatina durante 12 horas de incubação. Foi possível observar que esse tempo é suficiente para que ocorra uma intensa perda do PMM em todas as linhagens tratadas com o composto Cu α . A cisplatina também foi capaz de causar a perda do PMM nas linhagens testadas, exceto na linhagem B16F10, comprovando a resistência dessas células ao tratamento com cisplatina.

O próximo passo foi avaliar a morfologia e distribuição das mitocôndrias em células tratadas com o composto Cu α . Como todas as linhagens responderam quase que da mesma forma ao tratamento com esse composto para o teste de PMM, apenas a linhagem U937 foi utilizada nos experimentos subsequentes. Essa linhagem foi escolhida por apresentar maior sensibilidade tanto para composto Cu α quanto para cisplatina. A figura 47-A evidencia a distribuição das mitocôndrias (vermelho) ao redor do núcleo, grande e volumoso (azul), nessa linhagem sem o tratamento do composto. Na microscopia eletrônica das células controle é possível ver que as mitocôndrias aparecem com o conteúdo eletrodense e sem nenhuma deformação em suas membranas. Também é possível ver o retículo endoplasmático intacto. Após 12 horas de tratamento com o composto Cu α (figura 47-B) a fluorescência mostra uma distribuição desigual das mitocôndrias pelo citoplasma, com a fluorescência ficando mais dispersa. A microscopia eletrônica mostra mitocôndrias com membranas alteradas e dilatação do retículo endoplasmático, sugerindo uma possível participação dessa organela no processo apoptótico. De fato alguns trabalhos mostram que o retículo endoplasmático também pode regular apoptose por acionar a mitocôndria a partir de diversos estímulos

extrínsecos e intrínsecos e por iniciar a morte celular por conta própria (Breckenridge *et al.* 2003; Yu *et al.* 2007). Em 24 horas de incubação com o composto Cu α a microscopia de fluorescência mostra uma maior dissipação mitocondrial pelo citoplasma e uma fluorescência mais intensa do núcleo, evidenciando o processo de condensação da cromatina. Na microscopia eletrônica é possível observar o avançado processo de vacuolização e o retículo endoplasmático deixa de ser visível (figura 47-C). Esses resultados demonstram que a perda do PMM esta associada com alterações morfológicas na mitocôndria e levanta a possibilidade da participação do retículo endoplasmático no processo de apoptose.

Seguindo a cronologia do evento de perda do PMM, ocorre a liberação de citocromo C e consequente ativação de caspases pelas mitocôndrias. A liberação citoplasmática de citocromo C desencadeia a formação de um complexo denominado apoptossoma constituído por Apaf-1, caspase 9 e citocromo C. Posteriormente, o complexo apoptossoma cliva a pro-caspase 3 em caspase 3 (Kroemmer, 1997). Então, o próximo passo foi avaliar se a liberação de citocromo C estaria ocorrendo em células da linhagem U937 tratadas com o composto Cu α nos tempos aproximados da perda de PMM e das mudanças morfológicas observadas nas microscopias. Células U937 foram então incubadas com 50 μ M do composto Cu α durante 6, 12, 24 e 36 horas. Após cada um desses tempos as células foram fracionadas em fração mitocondrial (FM) e fração citoplasmática (FC). A quantidade de citocromo C foi então detectada em ambas as frações como mostra a figura 48. Como pode ser observado, à medida que aumenta o tempo de incubação o citocromo C aumenta na fração citoplasmática e diminui na fração mitocondrial. É possível observar que a liberação de citocromo C começa a acontecer a partir das 6h. No entanto, as curvas de ambas as frações se cruzam entre 10 e 15 horas, o que mostra que em torno de 12 horas começa a liberação de citocromo C de maneira mais acentuada. O citocromo C aumenta gradativamente e atinge um platô entre 24 e 36 horas.

Como consequência da liberação do citocromo C ocorre a ativação de caspase 9 e a subsequente ativação de caspase 3. Baseado no ensaio de liberação de citocromo C, células da linhagem U937 foram incubadas com 50

μM do composto $\text{Cu}\alpha$ durante, 3, 6 e 12 horas, que é o ponto máximo de citocromo C na fração citoplasmática. O tempo de 3 horas foi acrescentado para detectar a ativação de caspases anteriormente à liberação do citocromo. Para esse ensaio a cisplatina foi utilizada na mesma concentração e nos mesmos tempos que o composto $\text{Cu}\alpha$ a fim de verificar alguma diferença no padrão de ativação de caspases.

Como mostrado na figura 49, para o composto $\text{Cu}\alpha$, os valores para caspase 9 ativada são significativos somente em 12 horas, o que corresponde com a elevação de citocromo C no citoplasma. Para cisplatina a caspase 9 já está ativada em 6 horas. O mais interessante é que a caspase 8 (principal caspase da via de receptores) está ativada desde as 3 horas de incubação, assim como a caspase 3, efetora para ambas as vias (extrínseca e intrínseca). Isso nos levou a propor que o sinal para o processo de apoptose começa bem antes da ativação e do comprometimento mitocondrial. Essa hipótese pode ser reforçada pela presença de caspase 4 (outra caspase da via de receptores) em tempos iniciais. O mesmo não acontece com o tratamento das células U937 com a cisplatina. A caspase 8 está ativada a partir das 6 horas e a caspase 4 não é ativada em nenhum dos tempos analisados.

Como mencionado, um mecanismo conhecido pelo qual a via mitocondrial auxilia na apoptose após ativação dos receptores de morte é através da clivagem de Bid (um membro pró-apoptótico da família Bcl-2) mediada pela caspase-8. Uma vez clivada, tBid (*Truncated Bid*) transloca-se para a mitocôndria, aonde ela pode induzir a liberação de citocromo C, SMAC e Omi/HtrA2. Desta maneira, os sinais gerados pelos receptores de morte podem ser amplificados através da formação de ativação do apoptosomo, o qual aumenta a ativação da caspase iniciadora 9 e conseqüentemente das caspases efetoras 3 e 6 (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

O fato da caspase 8 estar ativada após o tratamento com a cisplatina também pode ser explicado. Slee e colaboradores, em 1999, demonstraram que o sinal apoptótico pode ocorrer via receptor, com a caspase 8 sendo ativada primeiro e o sinal seguir *downstream* até a mitocôndria ou começar com liberação de caspase 9 pela mitocôndria e o sinal seguir *upstream* com a

ativação subsequente das caspases 2, 3, 6, 7, 8 e 10, mas não das caspases 1 e 4.

Com a possibilidade do composto Cu α induzir apoptose via receptores de morte, foi pensado sobre qual família de receptores esse composto poderia estar atuando. Baseado na maior especificidade do composto Cu α para células neoplásicas em relação as células normais (PBMC) é proposto que o composto pode estar se ligando a receptores da família TNF (*Tumor Necrosis Factor*). A superfamília de receptores TNF consiste em proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e apoptose celular (Krammer, 1999). Foi demonstrado que os membros dessa família de receptores (TNF, Fas, CD95 e TRAIL) induzem apoptose em células normais e tumorais (Krammer, 1998; Krammer, 1999). No entanto, diferente dos receptores Fas e TNF, os receptores do tipo TRAIL-R (*Tumor necrosis factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand receptors*) parecem induzir apoptose preferencialmente em células tumorais, deixando células normais intactas. Alguns trabalhos demonstram que o ligante TRAIL se liga a seus receptores (TRAIL-R) e induzem apoptose em várias linhagens de células tumorais *in vitro* (Kim *et al.*, 2000; Suliman *et al.*, 2001; Jalving *et al.*, 2006; Stolfi *et al.*, 2012). No organismo o ligante TRAIL se liga aos respectivos receptores culminando com a trimerização desses receptores com concomitante ativação de caspase 8 e a sequencia de eventos apoptóticos (Suliman *et al.*, 2001).

Sabe-se que receptores da família TNF estão presentes na maioria de nossas células, no entanto estão mais expressos em células tumorais (Von Biberstein *et al.*, 1995). Trentin e colaboradores, 1993, demonstraram que linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B (B-CLL - *B-cell chronic lymphocytic leukemia*), e com leucemia de células pilosas (HCL - *hairy cell leukemia*) possuem um aumentado número de receptores da família TNF totalmente funcionais e com alta afinidade pelo ligante. Na verdade, a expressão aumentada de receptores da família TNF em células mononucleares do sangue periférico ocorre também em outras enfermidades além do câncer, como artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias (Raghav *et al.*, 2006). Por conta do aumento da expressão de receptores TNF na membrana de

células tumorais, essas moléculas vêm se tornando um importante alvo no estudo de novas drogas com atividade anticancerígena (Petak e Houghton, 2001).

Com base nos dados aqui apresentados e com o que se tem descrito na literatura, foi possível propor uma possível via de atuação para o composto $Cu\alpha$ (figura 50). Na verdade, acreditamos que o composto possui múltiplos mecanismos de ação e não atua somente por uma via apoptótica, mas sim ativando ambas, via extrínseca e via intrínseca. Através da cronologia dos eventos apoptóticos relatados acima, acredita-se que o composto $Cu\alpha$ possa se ligar em algum receptor da família TNF, como os receptores para o ligante TRAIL. Isso pode ser proposto devido ao curto tempo (3 horas) em que a caspase 8 ativada pode ser detectada em células U937 tratadas com esse composto. A ativação da caspase 8 levaria sequencialmente a clivagem de Bid em t-bid, o qual é translocado para mitocôndria e induz a perda de potencial de membrana mitocondrial e liberação do citocromo C, com consequente ativação de caspase 9. Como é notado um comprometimento do retículo endoplasmático e sua aproximação com mitocôndrias, pela microscopia eletrônica, é possível que o sinal apoptótico proveniente dos receptores induzam liberação de cálcio pelo retículo e ativação de caspase 4, o que pode levar ao dano no DNA e ativação da caspase 3 de maneira independente da caspase 9. Também foi detectada a ativação de caspase 2, que pode estar relacionado com danos diretos ao DNA e outros substratos, como RNA e proteínas, assim como ocorre após o tratamento com a cisplatina. Na literatura podemos encontrar exemplos de outras substâncias capazes de induzir apoptose em células da linhagem U937 com ambas as vias atuando em conjunto (Cartee *et. al.*, 2000; Rosato *et al.*, 2003).

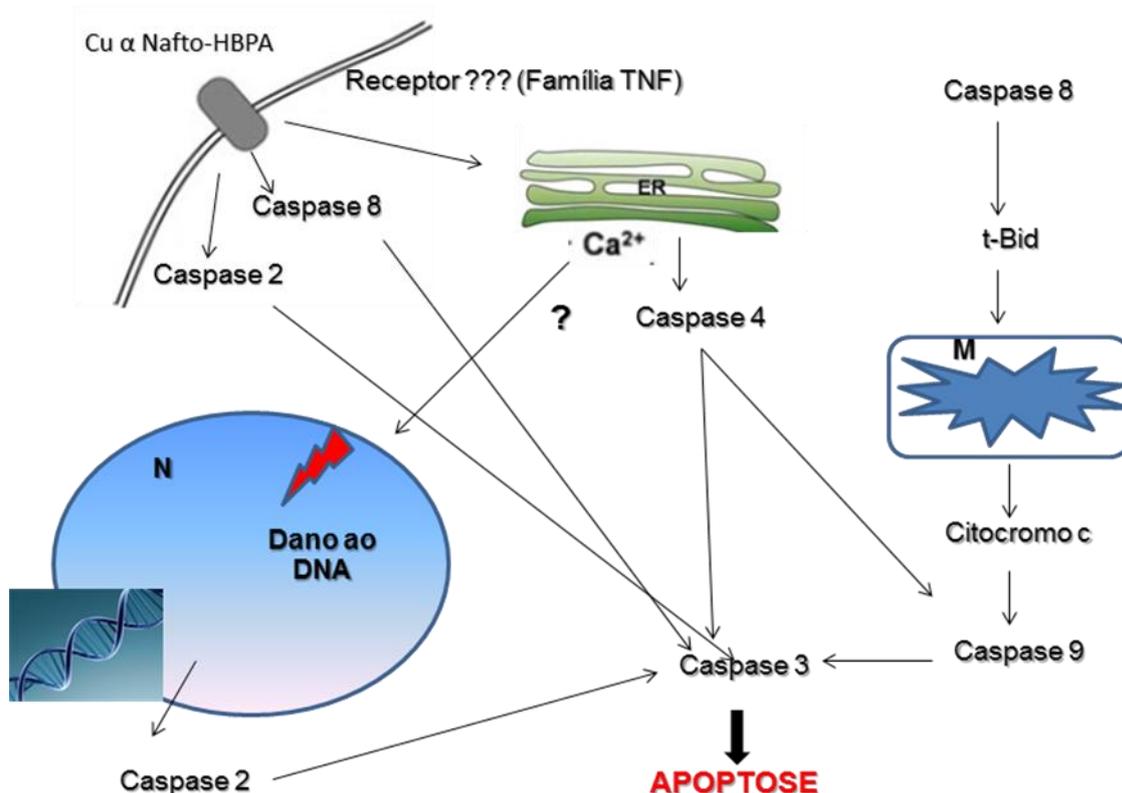


Figura 50: Provável mecanismo de ação do composto de coordenação de cobre $Cu\alpha$. O composto se ligaria a receptores da família TNF (TRAIL-R, por exemplo) e ativaria em tempos iniciais as caspase 8 e 4. A caspase 8 age quebrando Bid em t-Bid o que provoca a liberação de citocromo C pela mitocôndria e ativação de caspase 9. A caspase 4, por sua vez, pode ser ativada pelo retículo, e ativar as caspases 3 e 9 de maneira independente da mitocôndria. A caspase 2, esta associada a via mitocondrial e seria uma das responsáveis por danos no DNA e em outras macromoléculas.

Nos últimos anos várias famílias de complexos de cobre têm sido estudadas como potenciais agentes antitumorais (Marzano *et al.*, 2009). No entanto, pouco ainda é compreendido sobre o mecanismo de ação desses compostos. Além do mecanismo aqui descrito para o composto $Cu\alpha$, acredita-se que outros compostos de cobre podem agir através da natureza redox do metal. Contudo, outros estudos mostraram que alguns complexos de cobre podem induzir clivagem direta nas moléculas de DNA e RNA (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que os compostos de coordenação de cobre, mas não os de zinco, contendo os ligantes híbridos $L\alpha$ e $L\beta$, foram capazes de induzir apoptose em todas as 4 linhagens neoplásicas testadas. Dentre os compostos de cobre foi observado que o isômero α foi o

mais ativo frente a todas as linhagens, com atividade também superior a da cisplatina. No entanto, esse composto se mostrou menos tóxico do que a cisplatina tanto *in vitro* quanto *in vivo* para células normais, o que nos levou a propor um mecanismo diferente ou complementar ao da cisplatina. O conjunto de dados demonstrou que o composto Cu α induz morte celular por apoptose ativando ambas as vias: via de receptores de morte (extrínseca) e via mitocondrial (intrínseca), o que pode justificar a sua maior ação em relação a cisplatina.

Outros trabalhos utilizando esses compostos de cobre, principalmente o isômero α , estão em andamento em nosso laboratório. Nosso grupo investiga se os compostos interagem com o DNA promovendo a quebra hidrolítica da molécula. Em outra tese, esta sendo demonstrada a ação do composto Cu α em modelos murinos de câncer de pele e leucemia, com resultados preliminares promissores.

Íons metálicos em particular possuem um papel importante em processos fisiológicos e oferecem um amplo campo para o design de novas drogas com propriedades farmacêuticas. Dentre essas propriedades inclui-se a atividade antitumoral de muitos compostos de coordenação metálicos.

O sucesso da cisplatina para o tratamento do câncer é reconhecido. O mecanismo de ação de agentes baseados em platina é mais conhecido do que os mecanismos de ação de qualquer outro composto metálico com ação antitumoral. Desvendar os mecanismos de ação desses novos compostos é um grande desafio a ser conquistado pela química inorgânica medicinal.

O melhoramento no design de novos metalofármacos depende de um melhor entendimento da química de coordenação sob condições biológicas relevantes, conhecimento não somente da termodinâmica (constante de equilíbrio), mas também da cinética de substituições e de reações redox (mecanismos, vias e dinâmica na troca de ligantes). Isso por que sistemas biológicos funcionam longe de um equilíbrio termodinâmico. Sendo assim, entender a natureza das interações de metalofármacos com membranas celulares, proteínas, enzimas e DNA é particularmente importante para o sucesso terapêutico de uma metalodroga com atividade antitumoral.

7 – CONCLUSÕES

- As metodologias empregadas nas sínteses dos compostos orgânicos e de coordenação foram adequadas.
- O ensaio de viabilidade celular (MTT) - mostrou que o composto orgânico L α e os compostos de coordenação de cobre apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens testadas. No entanto, o ligante L β e os compostos Zn α e Zn β não apresentaram atividade significativa.
- Os compostos foram mais citotóxicos para células neoplásicas do que para células humanas normais (PBMC), além de serem \cong 4x menos tóxicos *in vivo* para camundongos C57BL/6 do que a cisplatina.
- Os resultados da microscopia de fluorescência, de marcação com Anexina V e PI, de avaliação do ciclo celular (Sub-G1) e de eletroforese demonstram que o composto Cu α induz morte celular por apoptose nas linhagens neoplásicas estudadas, sendo mais ativo do que a cisplatina para todas as linhagens testadas, inclusive para B16F10, que foi a linhagem mais resistente à cisplatina.
- Através dos estudos de potencial de membrana mitocondrial, microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão, citocromo C e caspases, é proposto que o composto ative a morte celular por apoptose via algum receptor presente nas células tumorais e ausente nas células normais, como os receptores da família TNF. Essa ativação levaria a um estresse de retículo endoplasmático e das mitocôndrias, amplificando o sinal apoptótico.
- Devido à elevada citotoxicidade observada contra as células tumorais testadas, baixa toxidez *in vivo* e baixo custo quando comparado a compostos de platina, a composto Cu α é um candidato em potencial para realização de estudos pré-clínicos (farmacológicos, farmacocinéticos, toxicológicos).

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S.; Isab, A.A.; Ali, S.; Al-Arfaj, A.R., (2006) Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. *Polyhedron*. Vol. 25, 1633-1645.
- ALBERTO, M.E.; Cosentino, C.; Russo, N. (2011). Hydrolysis mechanism of anticancer Pd(II) complexes with coumarin derivatives: a theoretical investigation. *Structural Chemistry*. p.1-9.
- ALBERTS, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J.D., (1997) *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed. Porto Alegre/RS: Ed. Artes Médicas.
- ALBERTS, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M; Roberts, K.; Walter, P., (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th ed. Garland Science. Cap. 23, 1313-1332.
- ALBRECHT, H., Brodbeck-Hummel, D., Hoever, M., Nickel, B., Regenass, U. Cellular Assays in Drug Discovery In: DINGERMANN, T., Steinhilber, D., Folkers, G. (2004). *Molecular Biology in Medicinal Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 3-39.
- ALESSIO, E., Mestroni, G., Bergamo, A., Sava, G., (2004). Ruthenium antimetastatic agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Vol. 4, 1525–1535.
- ANANIAS, S.R.; Santana, A.M.; Mauro, A.E.; De Lucca Neto, V.A.; De Almeida E.T. (2003). Reação de bis-inserção de 1,2-difenilacetileno na ligação Pd-C de ciclometalados. *Química Nova*. Vol. 26, 53-55.
- ALLARDYCE, C.S.; Dyson, P.J. (2001). Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Reviews*. Vol. 45, 61-69.
- ALMEIDA, V.L.; Leitão, A.; Reina, L. del C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L.; Lopes, M.T.P., (2005) Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. Vol. 28 (1).
- ANDREWS, P.A.; Velury, S.; Mann, S.C.; Howell, S.B., (1988). *Cis*-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*. Vol. 48, 68–73.
- AVELAR, M.; Martínez, A. (2012). Do Casiopeinas® Prevent Cancer Disease by Acting as Antiradicals? A Chemical Reactivity Study Applying Density Functional Theory. *Journal of the Mexican Chemical Society*. Vol. 56 (3), 250-256.

BARREIRO, E.J.; Fraga, C.A.M.; Miranda, A.L.P.; Rodrigues, C.R. (2002). A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e antitrombóticos. *Química Nova*. Vol.25 (1), 129-148.

BEIRITH, A.; Creczynski-Pasa, T.B.; Bonetti, V.R.; Konzen, M.; Seifriz, I.; Paula, M.M.S.; Franco, C.V.; Calixto, J.B. (1999). Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 369, 289-297.

BELJANSKI, V.; Marzilli, L.G.; Doetsch, P.W. (2004) DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Mol. Pharmacology*. Vol. 65, 1496-1506.

BENNETT, S.; Breit S.N. (1994). Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol.56, p. 236-240.

BENITE, A.M.C.; Machado, S.P.; Barreiro, E.J. (2007). Uma visão da química bioinorgânica medicinal. *Quim. Nova*. vol. 30 (8), 2062-2067.

BERGAMO, A.; Gagliardi, R.; Scarcia, V.; Furlani, A.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Sava, G. (1999). *In vitro* cell cycle arrest, *in vivo* action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol.289(1), 559-564.

BERGAMO, A.; Sava, G. (2007). Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans*. Vol.13, 1267-1272.

BERNAL, S.D.; Speak, J.A.; Boeheim, K.; Dreyfuss, A.I.; Wright, J.E.; Teicher, B.A.; Rosowsky, A.; Tsao, S.W.; Wong, Y.C., (1990) Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and *cis*-platinum, *Molecular Cell Biochemistry*. Vol. 95, 61–70.

BISHOP, J.M.; Weinberg, R.A., (1996). *Molecular Oncology*. (New York: Scientific American, Inc.).

BORGES, F.V., (2008). Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de compostos de coordenação de ferro. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Dissertação de Mestrado.

BOUCHET, B.P., Fromentel, C.C., Puisieux, A., Galmarini, C.M. (2006) p53 as a target for anti-cancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 58, 190-207.

BOULIKAS, T.; Vougiouka, M., (2003) Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Reports*. Vol. 10, 1663-1682.

KAUFFMAN, G.B. (1997). Alfred Werner's Research on the Platinum Metals. *Platinum Metals Review*. Vol.41, (1), 34-40.

BRABEC, V., (2002) DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 71.

BRABEC, V.; Kasparkova, J., (2002) Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resistance Updates*. Vol. 5, 147-161.

BRABEC, V.; Kasparkova, J., (2005) Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug resistance Updates*. Vol. 4, 1000-1016.

BRABEC, V.; Nováková, O. (2006). DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates*. Vol.9, 111–122.

BRATSOS, I.; Jedner, S.; Teresa Gianferrara, T.; Alessio, E. (2007). Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. *Metals in Medicine*. Vol.61(11), 692-697.

BRECKENRIDGE, D.G.; Stojanovic, M.; Marcellus, R.C.; Shore, G.C., (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol*. Vol. 160, 1115–1127.

BROWN, T.L.; Lemay Jr., H.E.; Bursten, B.E., (2005) Química, a ciência central. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 9. ed, p.109.

BRUIJNINCX, P.C.A., SADLER, P.J. (2008). 'New Trends for Metal Complexes with Anticancer Activity', *Current Opinion Chemical Biology*. Vol.12 (2), 197-206.

BULL, E. S. (2008). Síntese, Caracterização e Avaliação das Atividades de Nuclease e Antitumoral de Compostos de Coordenação de Cobre. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

BURROWS, C. J.; Muller, J. G., (1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews*, Vol. 98.

BUTOUR, J.L.; Wimmer, S.; Wimmer, F.; Castan, P. (1997). Palladium(II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: a comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA in vitro. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 104, 165–178.

CAIRES, A.C. (2007). Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. Vol.7(5), 484-491.

CAREW, J.S.; Nawrocki, S.T.; Giles, F.J.; Cleveland, J.L., (2008). Targeting autophagy: a novel anticancer strategy with therapeutic implications for imatinib resistance. *Biologics: Targets & Therapy*. Vol. 2, 201-204.

CARTEE, L.; Smith, R.; Dai, Y.; Rahmani, M.; Rosato, R.; Almenara, J.; Dent, P.; Grant, S. (2002). Synergistic Induction of Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate and Flavopiridol Proceeds via Activation of Both the Intrinsic and Tumor Necrosis Factor Mediated Extrinsic Cell Death Pathways. *Molecular Pharmacology*. Vol. 61(6), 1313-1321.

CHABNER, B.A.; Longo, D.L. (1996) *Cancer chemotherapy and biotherapy*; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia.

CHABNER, B.A.; Calabresi, P., (1995) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; ed.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949.

CHEN, Z.S.; Mutoh, M.; Sumizawa, T.; Furukawa, T.; Haraguchi, M.; Tani, A.; Saijo, N.; Kondo, T.; Akiyama, S., (1998) An active efflux system for heavy metals in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Exp. Cell Res*. Vol. 240, 312–320.

CHIFOTIDES, H.T.; Dunbar, K.R., (2005) Interactions of Metal-Metal-Bonded Antitumor Active Complexes with DNA Fragments and DNA. *Accounts Of Chemical Research*. Vol. 38, 146-156.

CHITAMBAR, C.R. (2010). Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 7, 2337-2361.

CHRISTODOULOU, C.V; Ferry, D.R.; Fyfe, D.W.; Young, A.; Doran, J.; Sheehan, T.M.; Eliopoulos, A.; Hale, K.; Baumgart, J.; Sass, G.; Kerr, D.J. (1998). Phase I trial of weekly scheduling and pharmacokinetics of titanocene dichloride in patients with advanced cancer. *Journal of clinical Oncology*. Vol.16, 2761-2769.

CHU, G., (1994) Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem*. Vol. 269, 787-790.

CHUA, M.; Bernstein, L.R.; Li, R.; So, S.K.S. (2006). Gallium Maltolate is a Promising Chemotherapeutic Agent for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research*. Vol. 26, 1739-1744.

CLARKE, M.J.; Zhu, F.; Frasca, D.R. (1999). Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews*. Vol. 99, 2511-2533.

CLARKE, M.J. (2002). Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*. Vol. 232, 69-93.

CLEARE, M.J.; Hoeschele, J.D. (1973). Antitumor Platinum Compounds: Relationship between structure and activity. *Platinum Metals Review*. Vol 17(1) 2-13.

COHEN, G. M., Wilsom, G. D., Gibby, E. M., Smith, M. T., Doherty, M. D., Connors, T. A. 1-naphthol: a potential selective antitumor agent. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 32, p. 2363-2365, 1983.

COLLERY, P.; Keppler, B.; Madoulet, C.; Desoize, B. (2002). Gallium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Vol.42, 283–296.

COLIGAN, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. (1996) (Eds.). *Current Protocols in Immunology*, John Wiley, New York, Vol. 3.

CORRÊA, C. M. (2006) Prática V.4-Síntese do Propanonol-Synthesis of Propanolol, *International Union of Pure and Applied Chemistry*. http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-V-4.pdf

CORTÊS, F.H., (2007) Avaliação comparativa da atividade antitumoral dos compostos de coordenação [Cu(HPCINOL)Cl]Cl, [Cu(H2BPCINOL)Cl]Cl e [Zn(HBPCINOL)Cl]. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Monografia.

COSSARIZZA, A., Baccarani-Contrì, M., Kalashnikova, G., Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical Biophysical Research Communications*. Vol. 197, p. 40-45.

COTRAN, R.S., Kumar, V., Collins, T., (2000) *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Guanabara: Rio de Janeiro. p.1251.

COWAN, J. A., (2001) Chemical nucleases. *Curr. Opinion in Chem. Biol.*, Vol. 5, 637-642.

CRIM, J.A.; Petering, H.G. (1967). The antitumor activity of Cu(II)KTS, the copper (II) chelate of 3-ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(thiosemicarbazone). *Cancer Research*. Vol. 27(7), 1278-1285.

CULLEN, K.J.; Yang, Z.; Schumaker, L.; Guo, Z. (2007). Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. Vol.39, 43-50.

CUMMINGS, J.; Ward, T.H.; Ranson, M.; Dive, C., (2004) Apoptosis pathway-targeted drugs – from the bench to the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1705, 53-66.

CURIC, M.; Tusek-Bozic, L.; Vikić-Topic, D.; Furlani, S.V.A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. (1996). Palladium(II) complexes of dialkyl α -anilinobenzylphosphonates. Synthesis, characterization, and cytostatic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol. 63, 125-142.

DESAGHER, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eeskes, R., Monessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Aantonsson, B., Martinou, J. C. (1999). Bidinduced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal Cell Biology*. Vol. 144, p 891-901.

DOETSCH, P.W.; Morey, N.J.; Swanson, R.L.; Jinks-Robertson, S., (2001) Yeast base excision repair: interconnections and networks. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* Vol. 68, 29-39.

ERTMER, A.; Huber, V.; Gilch, S., (2007). The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*. Vol. 21, 936–942.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; Hurrell, R.F. (1996). Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutrition Research Reviews*. Vol. 9, 295-324

FAVERO, G.M.; Otuki, M.F.; Oliveira, K.A.; Bohatch Jr, M.S.; Borelli, P.; Barros, F.E.; Maria, D.A.; Fernandes, D.; Bydlowski, S.P. (2010). Simvastatin impairs murine melanoma growth. *Lipids in Health and Disease*. Vol. 9:142-148.

FERNANDES, C.; Parrilha, G.L.; Lessa, J.A.; Santiago, L.J.M.; Kanashiro, M.M.; Boniolo, F.S.; Bortoluzzi, A.J.; Vugman, N.V.; Herbst, M.H., Horn JR., A., (2006) Synthesis, crystal structure, nuclease and in vitro antitumor activities of a new mononuclear copper(II) complex containing a tripodal N3O ligand. *Inorganica Chimica Acta*, Vol. 359, 3167-3176.

FERNANDES, J.; Rumjanek, V.M.; Castilho, R.O.; Kaplan, M.A.; Gattass, C.R., (2005) Alternativas contra o câncer. Ácido extraído de planta medicinal popular demonstra capacidade antitumoral. Disponível em: <http://www.sbpo.com.br/noticias/not_140504.htm> Consultado em: 26 dez 2005.

FISCHER, U.; Schulze-Osthoff, K., (2005) New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological Reviews*, Vol. 57, 187-215.

FOYE, W. O.; Sengupta, S. K.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., (1996) *Principles of Medicinal Chemistry*, eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, p. 822-845.

FREZZA, C.; Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology* Vol. 19, 4–11.

FUERTES, M.A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Perez, J.M., (2003) Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death

through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr. Med. Chemistry*. Vol. 10, 257-266.

FUKUMASU, H.; Avanzo, J.L.; Nagamine, M.K.; Barbuto, J.A.; Rao, K.V.; Dagli, M.L.Z. (2008). Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol.41, 305-310.

GALLAGHER, W.M.; Cairney, M.; Schott B.; Roninson, I.B.; Brown, R., (1997) Identification of p53 genetic suppressor elements which confer resistance to cisplatin. *Oncogene*. Vol. 14, 185-193.

GALLUZZI, L.; Vitale, J.M.; Abrams, E.S.; Alnemri, E.H.; Baehrecke, M.V.; Blagosklonny, T.M.; Dawson, V.L.; Dawson, W.S.; El-Deiry, S.; Fulda, E.; Gottlieb, D.R.; Green, M.O.; Hengartner, O.; Knight, S.; Kumar, S.A.; Lipton, X.; Lu, F.; Madeo, W.; Malorni, P.; Mehlen, G.; Nunez, M.E.; Peter, M.; Piacentini, D.C.; Rubinsztein, Y.; Shi, H-U.; Simon, P.; Vandenabeele, E.; White, J.; Yuan, B.; Zhivotovsky, G.; Kroemer, G. (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Review. *Cell Death and Differentiation*. 107–120.

GEARY, W. J. (1971). The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds, *Coordination Chemistry Reviews*. Vol. 7, p. 81-122.

GILMAN, A., (1963) The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surgery*. Vol. 105, 574–578.

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

GONZALEZ, V.M.; Fuertes, M.A.; Alonso, C.; Perez, J.M., (2001) Is Cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, Vol. 59, 657-663.

GUO, Z., Sadler, P.J. (1999). Metals in medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 38, 1513–1531.

HAHN, W.C.; Counter, C.M.; Lundberg, A.S.; Beijersbergen, R.L.; Brooks, M.W.; Weinberg, R.A., (1999). Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature*. Vol. 400, 464–468.

HALLIWELL, B., Gutteridge, J. M. C. (1990). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, Vol. 219, p. 1–14.

HANAHAN, Weinberg, R.A., (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. Vol. 100, 57–70.

HANNUN, Y.A., (1997) Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, Vol. 86 (6).

HARRIS, T.V.; Szilagy, R.K.; McFarlane K.L.H. (2009). Electronic structural investigations of ruthenium compounds and anticancer prodrugs. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. Vol.14, 891–898.

HARTINGER, C.G.; Jakupec, M.A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P.J.; Keppler, B.K. (2008). KP1019, a new redox-active anticancer agent — preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chemistry and Biodiversity*. Vol.5, 2140–2155.

HECHT, S. M., (1996) Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids. *New York: Oxford University Press*.

HEEG, M.J.; Jurisson, S.S. (1999) The role of inorganic chemistry in the development of radiometal agents for cancer therapy. *Accounts of Chemical Research*. Vol.32 1053-1060.

HEFFETER, P.; Pongratz, M.; Steiner, E.; Chiba, P.; Jakupec, M.A.; Elbling, L.; Marian, B.; Körner, W.; Sevelde, F.; Micksche, M.; Keppler, B.K.; Berger, W. (2004). Intrinsic and acquired forms of resistance against the anticancer ruthenium compound KP1019 [indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A). *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*. Vol.312(1), 281-289.

HORN JR, A.; Filgueiras, C.A.L.; Wardell, J.L.; Herbst, M.H.; Vugman, N.V.; Santos, P.S.; Lopes, J.G.S.; Howie, R.A., (2004) A fresh look into VO(salen) chemistry: synthesis, spectroscopy, electrochemistry and crystal structure of [VO(salen)(H₂O)]Br · 0.5 CH₃CN. *Inorganica Chimica Acta*. Vol. 357, 4240-4246.

INCA (2011) Estimativa 2012 : Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, 118 p.

ISHIBASHI, T.; Lippard, S.J., (1998) Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Science USA*. Vol. 95, 4219-4223.

ISHIDA, S.; Lee J.; Thiele, D.J.; Herskowitz, I., (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci*. Vol. 99, 14298-14302.

JAMIESON, E.R.; Lippard, S.J., (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev*. Vol. 99, 2467-2498.

JALVING, M.; de Jong, S.; Koornstra, J.J.; Boersma-van Ek, W.; Zwart, N.; Wesseling, J.; Elisabeth G.E. de Vries, E.G.E; Kleibeuker, J.H. (2006). TRAIL Induces Apoptosis in Human Colorectal Adenoma Cell Lines and Human Colorectal Adenomas. *Clinical Cancer Research*. Vol. 12, 4350-4356

JIANG, J.; Tang, X.; Dou, W.; Zhang, H.; Liu, W.; Wang, C.; Zheng, J., (2010). Synthesis and characterization of the ligand based on benzoxazole and its transition metal complexes: DNA-binding and antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol. 104(5), 583-591

JOHNSON, S.W.; Steveson, J.P.; O'Dwyer, P.J., (2001). Cisplatin and its analogues. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. Vol. 6, 376-380.

JOHNSTONE, R.W.; Ruefli, A.A.; Lowe, S.W., (2002) Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, Vol. 108, 153-164.

JONES, C., THORNBACK, J. (2007) Medicinal Applications of Coordination Chemistry. *Cambridge: The Royal Society of Chemistry*, p. 353.

JORDAN, P.; Carmo-Fonseca, M., (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 57, 1229-1235.

JUNQUEIRA, L. C.U., Carneiro, (2000) J. Biologia celular e molecular. 7^a Ed. São Paulo/SP: Ed.Guanabara Koogan

KALUDEROVIĆ, M.R.; KaluDerović, G.N.; Ruiz, S.G.; Paschke, R.; Hemprich, A.; Kühling, J.; Remmerbach, T.W. (2011). Organogallium(III) complexes as apoptosis promoting anticancer agents for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol 105 (2), 164-170.

KAMB, A.; Lassota, P., (2004) Disease models of cancer: apoptosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, Vol. 1, 31-36.

KANDUC, D.; (2002) Mittelman, A.; Serpico, R.; Sinigaglia, E.; Sinha, A. A.; Natale, C.; Santacroce, R.; Di Corcia, M. G.; Lucchese, A.; Dini, L.; Pani, P.; Santacroce, S.; Simone, S.; Bucci, R.; Farber, E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*. 21: 165-70.

KAPTIZA, S.; Pongratz, M.; Jakupec, M.A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Lackinger, L.; Keppler, B.K.; Marian, B. (2005). Heterocyclic complexes of rhenium(III) induces apoptosis in colorectal carcinoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Vol. 131(2), 101-110.

KARTALOU, M.; Essigmann, J.M., (2001) Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation research*. Vol. 478, 23-43.

KAWAI, K.; Kamatani, N.; Georges, E.; Ling, V., (1990) Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to *cis*-diamminedichloroplatinum (II). *J. Biol. Chem.* Vol. 265, 13137–13142.

KESKIN, O.; Bahar, I.; Jeringan, R.L.; Beutler, J.A.; Shoemaker, R.H.; Sausville, E.A.; Covell, D.G.(2000) Characterization of anticancer agents by their growth inhibitory activity and relationships to mechanism of action and structure. *Anti-Cancer Drug Des.* Vol. 15, 79.

KIDWAI, M.; Venkataramanan, R.; Mohan, R.; Sapra, P., (2002) Cancer Chemotherapy and Heterocyclic Compounds. *Current Medicinal Chemistry.* Vol. 9, 1209-1228.

KIECHLE, F.L.; Zhang, X., (1998) Apoptosis: A brief review. *Journal of Clinical Ligand Assay*, Vol. 21 (1).

KOMATSU, M.; Waguri, S.; Ueno, T., (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* Vol. 169, 425–34.

KOOPMAN, G.; Reutelingsperger, C.P.; Kuijten, G.A.; Keehnen, R.M.; Pals, S.T.; van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* Vol. 84: 1415-1420.

KÖPF, H.; Köpf-Maier, P. (1979). Titanocene Dichloride - The First Metallocene with Cancerostatic Activity. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. Vol. 18(6) 477- 478.

KÖPF-MAIER, P. (1994) Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *European Journal of Clinical Pharmacology.* Vol. 47, 1–16

(a)KOSTOVA, I.; Momekov, G.; Zaharieva, M.; Karaivanova, M., (2005) Cytotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry.* Vol. 40, 542–551.

(b)KOSTOVA, I.; Manolov, I.; Momekov, G.; Tzanova, T.; Konstantinov, S.; M.; Karaivanova, M., (2005) Cytotoxic activity of new cerium (III) complexes of bis-coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry.* Vol. 40, 1246–1254.

KOSTOVA, I.; Momekov, G., (2006) New zirconium (IV) complexes of coumarins with cytotoxic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry.* Vol. 41, 717–726.

LEBWOHL, D.; Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer.* Vol. 34, (10) 1522-1534.

LEVINA, A.; Mitra, A.; Lay, P.A. (2009). Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics.* Vol. 1, 458–470.

- LOPES, B.F. (2012). Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Antineoplásica de Compostos de Coordenação de Cobre: Influência do Naftol e da Cumarina na Atividade Biológica. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- LOWE, S.W.; Lin, A.W., (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. Vol. 21, 485-495.
- LIU, H.; Baliga, R., (2005). Endoplasmic Reticulum Stress–Associated Caspase 12 Mediates Cisplatin-Induced LLC-PK1 Cell Apoptosis. *J Am Soc Nephrol*. Vol. 16, 1985-1992.
- LUM, J.J.; Bauer, D.E.; Kong, M., (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. Vol. 120, 237–248.
- LUMMEN G, Sperling H, Luboldt H, Otto T, Rubben H (1998) Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacology*. Vol. 42: 415–417.
- LUO, J., Solimini, N. L., Elledge, S. J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*. Vol. 136(5): 823–837, 2009.
- MAPARA, M.; Sykes, M., (2004) Tolerance and Cancer: Mechanisms of Tumor Evasion and Strategies for Breaking Tolerance. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 22, 1136-1151.
- MARZANO, C.; Pellei, M.; Tisato, F.; Carlo Santini, C. (2009). Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. Vol. 9, 185-211.
- MCKEAGE, M.J.; Maharaj, L.; Berners-Price, S.J. (2002). Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. *Coordination Chemistry Reviews*. Vol. 232, 127-135.
- MENEZES, C.S.R.; Costa, L.C.G.P.; Ávila, V.M.R.; Ferreira, M.C.; Ueira, C.V.; Pavanin, L. A.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Hamaguchi, A.; Silveiralacerda, E.P. (2007). Interaction between plasmid DNA and the cis-dichlorotetraammineRuthenium(III)chloride. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 167, 116-124.
- MEYERS, M.; Hwang, A.; Wagner, M.W.; Boothman, D.A., (2004) Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. *Environ. Mol. Mutagen*. Vol. 44, 249-264.
- MIDHA, K.K.; McKay, G. (2009). Bioequivalence: its history, practice, and future. *The AAPS Journal*. Vol. 11, (4) 664-670.

MORIM, P.J., (2003) Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resistance Update*. Vol. 6, 169-172.

MORO, A.C.; Mauro, A.E.; Ananias, S.R. (2004). Clivagem dos ciclopaladados diméricos $[Pd(dmba)(m-X)]_2$ (dmba = N,N-dimetilbenzilamina; X = Cl, N₃, NCO) por tiouréia. *Eclética Química*. Vol. 29, 57-61.

MÜLLER, A.R.; Ruiz, A.V.; Plant, N.; Ruiz, L.; Dobrota, M. (2007). Mixed chelate copper complex, Casiopeina Ilgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 165, 189–199.

MURILLO, R.G.; Lima, J.H.; Rendón, M.G.; Guzmán, F.C.; Azuara, L.R.; Esparza, R.M. (2011). π -Stacking between Casiopeinas® and DNA bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.* Vol. 13, 14510–14515.

MURAD, A.M.; Katz, A. (2000) *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41.

NAFISI, S., Saboury, A. A., Keramat. N., Neault, J.C., Tajmir-Riahi, H.A. (2007). Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, Vol. 827.P. 35-43.

NARITA, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 95, p. 14681-14686.

NEVES, A.; Brito, M.A.; Vencanto I.; Drago, V.; Griesar, L.R.; Schenk, G., (1993). Synthesis, Crystal Structure and Properties of a New Binuclear Iron (III) Complex as a Model for the Purple Acid Phosphatases, *Inorganica Chimica Acta*. Vol. 214, 5-8.

NEVES, A., Rossi, L.M.; Bottoluzzi, A.J.; Mangrich, A.S.; Haase, W.; Wener, R., (2001) Synthesis, Structure, Physicochemical Properties and Catecholase-like Activity of a New Dicopper(II) Complex . *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 12, 388-391.

NOBLÍA, P.; Vieites, M.; Parajón-Costa, B.S.; Baran, E.J., Cerecetto, H.; Draper, P., González, M.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Azqueta, A.; Ceráin, A.L.; Monge-Vega, A.; Gambino, D. (2005) Vanadium (V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of $[VVO_2(5\text{-bromosalicylaldehyde semicarbazone})]$. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99: 443–451.

NOWELL, P.C., (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* Vol. 194, 23–28.

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

NYGREN, P. for the SBU-group, (2001) What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica* Vol. 40, 166–174.

OHLSCHLAGER, P.; Immel, T.A.; Groth, U.; Huhn, T.; (2011). Titanium Salan Complexes Displays Strong Antitumor Properties *In Vitro* and *In Vivo* in Mice. *Plos One*. Vol 6, (3), e17869.

OTT, I., Gust R (2007) Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch Pharm* (Weinheim). Vol. 340: 117–126.

PAPOULI, E.; Cejka, P.; Jiriény, J., (2004) Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Research*. Vol. 64, 3391-3394.

PARRILHA, G. L; Fernandes, C.; Bortoluzzi, A.J.; Szpoganicz, B.; Pich, C. T.; Terenzi, H.; Horn Jr., A., (2008) A new m-oxo di-iron complex with suitable features to mimic metallohydrolase activity: X-ray molecular structure, aqua solution behavior and nuclease activity of the complex [Fe(HPCINOL)(SO₄)]-m-oxo. *Inorganic Chemistry Communications*, Vol. 11, 643-647.

PATHANIA, D.; Millard, M.; Neamati, N. (2009). Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 61, 1250–1275.

PERCHELLET, E.M.; Ladesich, J.B.; Collery, P.; Perchellet, J.P. (1999). Microtubule-disrupting effects of gallium chloride in vitro. *Anticancer drugs*. Vol.10 (5), 477-488.

PETAK, I.; Houghton, J.A. (2001). Shared Pathways: Death Receptors and Cytotoxic Drugs in Cancer Therapy. *Pathology Oncology Research*. Vol. 7 (2), 95–106.

PICCIOLI, F.; Sabatini, S.; Messori, L.; Orioli, P.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K. (2004). A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl₄(Ind)₂] and serum proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol.98(6), 1135-1142.

PLUIM, D.; van Waardenburg, R.C.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H. (2004). Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. Vol.54(1), 71-78.

PODRATZ, J.L.; Knight, A.M.; Ta, L.E.; Staff, N.P.; Gass, J.M.; Genelin, K.; Schlattau, A.; Lathroum, L.; Windebank, A.J. (2011). Cisplatin induced Mitochondrial DNA Damage In Dorsal Root Ganglion Neurons. *Neurobiology of Disease*. Vol. 41(3), 661–668.

PRATT, W.; Ruddon R., (1979) The anticancer drugs. New York: *Oxford University Press*.

RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H. (2004). A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSOimidazole- tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clinical Cancer Research*. Vol.10(11), 3717-3727.

RAGHAV, S.K.; Gupta, B.; Agrawal, C.; Chaturvedi, V.P; Das, H.R, (2006). Expression of TNF- α and Related Signaling Molecules in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Rheumatoid Arthritis Patients. *Mediators of Inflammation*. Vol 2006, 1-5.

REEDIJK, J.; Fichtinger-Schepman, A.M.J.; Oosterom, A.T.V.; Putte, P. V. (1987). Medicinal applications of heavy-metal compounds. *Structure and Bonding*. Vol. 67, 52.

REEDIJK, J., (2003) New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *PNAS*. Vol. 100, 3611-3616.

REMOIZE, C., Biola, A., Pallardy, M., Breard, J. (1998). Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biology and Toxicology*. Vol. 14, p. 111-120.

RENEHAN, A.G., Booth, C.; Potten, C.S., (2001) What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, Vol. 322.

RIEGER, A. J., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*. Vol. 50, p. 1-4.

ROBERT, W., (1970) Properties of Rapidly Labeled Deoxyribonucleic Acid Fragments Isolated from the Cytoplasm of Primary Cultures of Embryonic Mouse Liver Cells. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 51 (1): 157–168.

ROCHA, M.R. (2011). Síntese, Caracterização e Avaliação das Atividades Biológicas de Novos Complexos de Zinco. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

ROSATO, R.R.; Almenara, J.A.; Dai, Y.; Grant, S. (2003). Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Molecular Cancer Therapy*. Vol.2 (12):1273–1284.

ROSENBERG, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. Vol. 205, 698-699.

ROSENBERG, B., VanCamp, L.; Grimley, E.B.; Thomson, A.J. (1967). The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 242, 1347-1352.

ROSENBERG, B. (1971). Some Biological Effects of Platinum Compounds: New agents for the control of tumors. *Platinum Metals Review*. Vol. 15 (2), 42-50.

ROSENBERG, B. (1999) Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. 3-27.

SALMONM, S.E., (1998) *Farmacologia Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655.

SANCHEZ-PEREZ, I.; Murguia, J.R.; Perona, R., (1998) Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene*. Vol. 16, 533-540.

SAVA, G.; Bergamo, A.; Zorzet, S.; Gava, B.; Casarsa, C.; Cocchietto, M.; Furlani, A.; Scarcia, V.; Serli, B.; Iengo, E.; Alessio, E.; Mestroni, G. (2002) Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. *European Journal of Cancer*. vol.38, 427–435.

SAVA, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; Digiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Garbisa, S. (2003). Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: Selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clinical Cancer Research*. Vol.9(5), 1898-1905.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; Ferrari, D.; Los, M.; Wesselborg, S.; Peter, M.E., (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochemistry*. Vol. 254, 439-459.

SIDDIK, Z.H., (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. Vol. 22, 7265-7279.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X. (2000). *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6ª Ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.

SHAKYA, R.; Peng, F.; Liu, J.; Heeg, M.J.; Verani, C.N. (2006). Synthesis, Structure, and Anticancer Activity of Gallium(III) Complexes with Asymmetric

Tridentate Ligands: Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Cisplatin-Resistant Neuroblastoma Cells. *Inorganic Chemistry*. vol. 45, 6263-6268.

SHAO, Y.; Gao, Z.; Marks, P.A.; (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 101, 18030–18035.

SHEIKH-HAMAD, D. (2008). Cisplatin-induced cytotoxicity: is the nucleus relevant? *American Journal Physiology - Renal Physiology*. Vol. 295, 42–43.

SLEE, E.A.; Harte, M.T.; Kluck, R.M.; Wolf, B.B.; Casiano, C.A; Newmeyer, D.D; Wang, H.G.; Reed, J.C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E.S.; Green, D.R.; Martin, S.J. (1999). Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-Dependent Manner. *The Journal of Cell Biology*. Vol.144(2), 281-292

SMILEY, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Chen, L.B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 88, p. 3671-3675.

SORENSEN, C.M.; Eastman, A., (1988) Influence of cis-amminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research*. Vol. 48, 6703-6707.

SPENCE, R.A.J.; Jonhston, P.G. (2001) *Oncology*; ed. Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132.

SREEDHARA, A.; Cowan,; J.A. (2001) Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *Journal of biological inorganic chemistry*. Vol. 6, 337-347.

STOLFI, C.; Pallone, F.; Monteleone, G. (2012). Molecular targets of TRAIL-sensitizing agents in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 13, 7886-7901.

STORR, T. Thompson, K. H., Orvig, C. (2006). Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews*. Vol. 35, p. 534-544.

STRASSER, A.; Harris, A.W.; Jacks, T.; Cory, S., (1998) DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*. Vol. 79, 329-339.

SULIMAN, A.; Lam, A.; Datta, R.; Srivastava, R.K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. Vol. 20, 2122 -2133.

SUN, R.W.Y.; Ma, D.L.; Wong, E.L.M.; Che, C.M. (2007). Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton Transactions*. 4884-4892.

TAKEUCHI, H.; Kondo, Y.; Fujiwara, K., (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Research*. Vol. 65, 3336–3346.

THOMPSON, K.H.; Mcneill, J.H.; Orvig, C. (1999). Vanadium Compounds as Insulin Mimics. *Chemicals Reviews*. Vol 99, 2561-2571.

THOMPSON, K.H.; Orvig, C. (2006) Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Transactions*. 761–764.

TORIGOE, T.; Izumi, H.; Yoshida, Y.; Tanabe, M.; Yoshida, T.; Igarashi, T.; Niina, I.; Wakasugi, T.; Momii, Y.; Kuwano, M.; Kohno, K. (2005) Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr. Med.Chem. Anti-Cancer Agents*. Vol. 5, 15-27.

TRENTIN, L.; Zambello, R.; Agostini, C.; Siviero, F.; Adami, F.; Marcolongo, R.; Raimondi, R.; Chisesi, T.; Pizzolo, G.; Semenzato, G. (1993). Expression and Functional Role of Tumor Necrosis Factor Receptors on Leukemic Cells From Patients With Type B Chronic Lymphoproliferative Disorders. *Blood*, Vol. 81 (3), 752-758.

USP-UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, (2005). Cisplatin Injection. *Teva parenteral medicine*. Material Safety Data Sheet. p. 4, section 11.

VACCA, A.; Bruno, M.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Ribatti, D.; Bergamo, A.; Garbisa, S.; Sartor, L.; Sava, G. (2002). Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. *British Journal of Cancer*. Vol.86(6), 993-998.

VERMEULEN, K; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z. (2005) Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*. Vol. 84, 627-639.

WANG, G.; Reed, E.; Li, Q.Q. (2004) Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncology Reports*. Vol. 12, 955-965.

WANG, D.; Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews*. Vol. 4, 307-320.

WARREL, R.P. (1997). Gallium Nitrate for the Treatment of Bone Metastases. *Supplement to Cancer*. p. 1680-1685.

WATERHOUSE,N.J., Goldstein,J.C., Von Ahsen,O., Schuler,M., Newmeyer, D.D. and Green,D.R. (2001) Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial

membrane permeabilization during the apoptotic process. *Journal of Cell Biology*. Vol. 153, 319-328.

WEISS, R. B.; Christian, M. C. (1993). New Cisplatin Analogues in Development: A Review. *Drugs*. Vol 46 (3) 360-377.

WHO – World Health Organization. Cancer. [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en.html>. Arquivo consultado em 25 de outubro de 2012.

WILSON, G. D., DOHERTY, M. D. COHEN, G. M., (1985) Selective toxicity of 1-naphthol to human colorectal tumour tissue. *British Journal of Cancer*, Vol. 51, 853-863.

WONG, E.; Giandomenico, C.M. (1999). Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chemical Reviews*. Vol. 99, 2451-2466.

YAN, X.; Gemeinhart, R.A. (2005). Cisplatin delivery from poly (acrylic acid-co-methyl methacrylate) microparticles. *Journal of Controlled Release*. Vol. 106, 198-208.

YANG, Z.; Schumaker, L.M.; Egorin, M.J.; Zuhowski, E.G.; Zhongmin Guo, Z.; Cullen, K.J. (2011). Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis. *Clinical Cancer Research*. Vol.12, 5817-5825.

YORIMITSU, T.; Klionsky, D.J., (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. Vol.12, 1542–52.

YU, J.; Zhang, (2003) Apoptosis in human cancer cells. *Curr Opin Oncol*. Vol. 16, 19-24.

YUE, Z.; Jin, S.; Yang, C.; (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 100, 15077–15082.

ZAMBLE, D. B.; Mu, D.; Reardon, J.T.; Sancar, A.; Lippard, S.J., (1996) Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*. Vol. 35, 10004-10013.

ZHANG, C.X.; Lippard, S.J., (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol. 7, 481–489.

ZIEGLER, U., Grouscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiological Science*. Vol. 19, p. 124-28.

ZIMMERMAN, K. C., Bonzon, C., Green, D. R., (2001) The Machinery of Programmed Cell Death, *Pharmacol Ther.*, Vol. 92, 57-70.

ZORZET, S.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Sorc, A.; Gava, B.; Alessio, E.; lengo, E.; Sava, G. (2000). Lack of in vitro cytotoxicity, associated to increased G(2)-M cell fraction and inhibition of Matrigel invasion , may predict in vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol.295 (3), 927-933.