UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RODRIGO BERNARDI MIGUEL

**Alvos intracelulares e mecanismos de ação de
complexos de cobre(II) ou zinco(II) oxindolimínicos com
atividade antitumoral**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data de Depósito na SPG:
08/05/2018

Rodrigo Bernardi Miguel

**Alvos intracelulares e mecanismos de ação de
complexos de cobre(II) ou zinco(II) oxindolimínicos com
atividade antitumoral**

Orientadora: Prof^a. Dr. Ana Maria da Costa Ferreira

**Tese apresentada à Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências: Programa de
Química.**

**São Paulo
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M634a Miguel, Rodrigo
Alvos intracelulares e mecanismos de ação de complexos de cobre(II) ou zinco(II) oxindolimínicos com atividade antitumoral / Rodrigo Miguel. - São Paulo, 2018.
139 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Ferreira, Ana Maria da Costa

1. Compostos metálicos. 2. Isatina. 3. Antitumoral. I. T. II. Ferreira, Ana Maria da Costa, orientador.

*O maior peixe do lago só cresce tanto, porque nunca é pego.
Filme Peixe Grande*

Dedicatória

Dedico a Deus, a toda minha incrível família e a minha maravilhosa namorada Juliana Cristina Pereira Calado este trabalho e tudo o que eu conseguir ao longo da minha existência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Professora Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, pela oportunidade de realizar este projeto e pelos conhecimentos adquiridos ao longo desta caminhada, a qual me acrescentou como profissional e pessoa.

Aos técnicos do laboratório, Maria A. Paiva Lopes e Dr. Ricardo Couto, pelo suporte e pela paciência.

Aos meus queridos amigos do laboratório, com os quais aprendi muito, como pessoa e como profissional, proporcionando muitas risadas, em especial, Dr. Eduardo Guimarães Vieira, Daniel Rodrigues da Silva, Rodrigo Boni Fazzi, Marcelo Cecconi Portes, Veridiana de Freitas Tofik, Francisco Fernandes Neto, Daniel de Oliveira Tavares Alves Martins, Mauricio Oshiro, Dra. Camila Anchau Wegermann, Me. Cléia Justino Nunes, Dra. Adriana Pires Vieira, Dr. Ricardo Couto, Maria A. Paiva Lopes e Rafael Teixeira.

Agradeço ainda aos Profs. Carla Columbano de Oliveira, Maurício Baptista e Fábio Forti, do Departamento de Bioquímica, pela valiosa colaboração e disponibilidade dos respectivos laboratórios. Também sou grato à Dra. Mónica Mamián-Lopez e à Profa. Marcia Temperini, do Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM), pelos estudos por microscopia Raman, em que contamos ainda com a ajuda do Dr. Manuel Huila e Prof. Koiti Araki, na disponibilização do microscópio.

Finalmente, gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos da atividade biológica de complexos imínicos de Cu(II) e Zn(II) derivados da isatina, principalmente frente a células tumorais HeLa. Sabe-se que estes complexos se ligam ao DNA, podendo causar clivagens simples e duplas na sua estrutura, em presença de peróxido de hidrogênio, através de um mecanismo predominantemente oxidativo. Os complexos de Cu(II) geram espécies reativas de oxigênio (EROs) e, além disto, atuam sobre a mitocôndria como agentes desacopladores. Sabe-se ainda que esses compostos interagem com proteínas específicas, como por exemplo a topoisomerase humana IB e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs), inibindo significativamente sua atividade, ou a proteassoma, frente à qual apenas uma inibição moderada foi observada. Os ensaios *in vitro* desenvolvidos nesta tese, permitiram evidenciar a capacidade de os complexos de intercalar no DNA e RNA, além de clivar o primeiro biopolímero. Os resultados obtidos *in celulo*, evidenciaram a dependência do cobre para a citotoxicidade dos complexos sendo estes compostos capazes de estimular a necrose das células HeLa. Além disso, os resultados demonstraram que estes compostos são capazes de interferir no ciclo celular, interrompendo-o em fase G2/M e de desencadear um desequilíbrio oxidativo. Os principais alvos intracelulares dos complexos, em células HeLa, são a Mitocôndria, pois interferem em seu funcionamento diminuindo o seu potencial de membrana, e o DNA clivando-o. Ademais, pretendeu-se, através de um estudo sistemático por microscopia Raman confocal, identificar danos celulares provocados pelos complexos, especialmente uma grande alteração no núcleo celular de células HeLa após o tratamento com o complexo [Cu(isaepy)]⁺. Através de ensaios de viabilidade, também foi possível demonstrar que a superexpressão de glicoproteína-P para linhagem MES-AS/Dx5 não resulta na resistência dessas células frente aos compostos testados, e que os complexos não interferem no funcionamento desta glicoproteína. Também foi observado, através dos experimentos com células HaCaT, que o complexo [Zn(isaepy)]²⁺ é capaz de interferir no ciclo autofágico celular.

ABSTRACT

In the present work, some biological activities of oxindolimine complexes of Cu(II) and Zn(II) were carried out, mainly toward tumor HeLa cells. It is known that these complexes bind to DNA and can cause single and double cleavages in their structure, in the presence or absence of hydrogen peroxide, through a predominantly oxidative mechanism. Cu(II) complexes generate reactive oxygen species (ROS) and, in addition, act on mitochondria as decoupling agents. These compounds are also known to interact with specific proteins, such as human topoisomerase IB and cyclin-dependent kinases (CDKs), inhibiting significantly their activity, or the proteasome, against which only moderate inhibition has been observed. The *in vitro* assays developed in this thesis have demonstrated the ability of these complexes in intercalating at DNA and RNA, in addition to cleaving the first biopolymer. The results *in cellulo* evidenced the dependence on the copper for the cytotoxicity of the complexes, that can stimulate the necrosis in HeLa cells. In addition, the results demonstrated that these compounds are capable of interfering in the cell cycle, stopping it at G2/M phase and triggering an oxidative imbalance. The main intracellular targets of the complexes, in HeLa cells, are the Mitochondria, where they interfere in its function, diminishing its membrane potential, and the DNA, causing its cleavage. Further, it was intended, through a systematic study by confocal Raman microscopy, to identify cellular damage triggered by the complexes. Particularly, a large change in the cell nucleus of HeLa cells was demonstrated after treatment with the [Cu(isaepy)]⁺ complex. Through viability assays, it was also demonstrated that overexpression of P-glycoprotein in MES-SA/Dx5 lineage does not result in the resistance of these cells to the tested compounds, and that the complexes do not interfere in the functioning of this glycoprotein. Finally, it was observed, in experiments with HaCaT cells, that [Zn(isaepy)]²⁺ complex can interfere in the autophagic cell cycle.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
H ₂ O ₂	Péroxido de hidrogênio
IC ₅₀	A metade da concentração inibitória máxima
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PBS	Phosphate buffered saline
ERO	Espécie reativa de oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
epy	2-(2-aminoetil)piridina
isa	isatina
pn	1,3-diaminopropano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 INDÓIS	18
1.2. COBRE	25
1.3. METALOFÁRMACOS	28
1.4. METALOFÁRMACOS DE COBRE	30
1.5. POSSÍVEIS ALVOS BIOLÓGICOS	34
1.5.1. COMPLEXOS DE COBRE QUE POSSUEM O DNA COMO ALVO	35
1.5.2. COMPLEXOS DE COBRE INIBIDORES DE PROTEÍNAS TOPOISOMERASE I E II	35
1.5.3. COMPLEXOS DE COBRE INIBIDORES DO PROTEASSOMA	36
2. OBJETIVOS	38
3. MÉTODOS UTILIZADOS	40
3.1. MEDIDAS FÍSICAS	40
3.1.1. ANÁLISE ELEMENTAR	40
3.1.2. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV/VIS	40
3.1.3. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)	40
3.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	40
3.2.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA QUINASE DEPENDENTE DE CICLINA (CDK1)	40
3.2.2. ANÁLISE DE ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	41
3.2.3. CURVA DE DESNATURAÇÃO DE DNA e RNA	41
3.2.4. ENSAIO COM CARBOXIFLUORESCEÍNA EM VESÍCULAS LIPÍDICAS	42
3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN CELLULO</i>	43
3.3.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR	43
3.3.2. IMAGEM ÓPTICA DAS CÉLULAS	43
3.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE E DE ZINCO EM LISADOS CELULARES	44
3.3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS NOS LISADOS CELULARES	44
3.3.5. CICLO CELULAR	45
3.3.6. CITOMETRIA DE FLUXO COM ANEXINA V - IODETO DE PROPÍDIO	46
3.3.7. AQUISIÇÃO DE IMAGENS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA RAMAN CONFOCAL	47

3.3.8. ESTRESSE OXIDATIVO.....	47
3.3.9. CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA	48
3.3.10. COMETA ALCALINO.....	48
3.3.11. CLIVAGEM DO DNA	50
3.3.12. ENSAIO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P COM RODAMINA	51
3.3.13. ENSAIO COM ALARANJADO DE ACRIDINA	51
3.3.14. ENSAIO DE IODETO DE PROPÍDIO	52
4. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS	53
4.1. Reagentes.....	53
4.2. Sínteses dos ligantes e complexos metálicos	53
4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS.....	59
4.3.1. ANÁLISE ELEMENTAR	59
4.3.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)	61
4.3.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV/VIS).....	69
4.3.4. Caracterização por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	77
5. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>.....	79
5.1. EFEITOS DOS COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE CICLINA, CDK1.	79
5.2. EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	81
5.3. CURVA DE DESNATURAÇÃO DE DNA e RNA EM PRESENÇA DOS COMPLEXOS	84
5.4. ENSAIO COM CARBOXIFLUORESCÉINA	88
6. ENSAIOS <i>IN CELLULO</i>	91
6.1. ENSAIOS <i>IN CELLULO</i> COM CÉLULAS HELA.....	91
6.1.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA E FIBROBLASTO P4.....	91
6.1.2. IMAGEM ÓPTICA DAS CÉLULAS HeLa	92
6.1.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE E ZINCO NOS LISADOS CELULARES.....	93
6.1.4. CICLO CELULAR.....	95
6.1.5. Citometria de fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio.....	99
6.1.6. VERIFICAÇÃO DE DANOS CELULARES ATRAVÉS DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS POR MICROSCOPIA RAMAN CONFOCAL	103
6.1.7. ESTRESSE OXIDATIVO.....	109

6.1.8. CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA EM CÉLULAS HELA	114
6.1.9. ENSAIOS COMETA – Danos a DNA em células.....	116
6.1.10. CLIVAGEM DO DNA	118
6.2. ENSAIOS <i>IN CELLULO</i> COM AS LINHAGENS MES-SA E MES-SA/DX5	122
6.2.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR DE MES-SA E MES-SA/DX5	123
6.2.2. TESTE DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P COM RODAMINA 123.	124
6.2.3. CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA 123	126
6.3. ENSAIOS <i>IN CELLULO</i> COM A LINHAGEM HACAT	129
6.3.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)	129
6.3.2. ENSAIO COM ALARANJADO DE ACRIDINA.....	130
6.3.3. ENSAIOS COM IODETO DE PROPÍDIO.....	132
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133
REFERÊNCIAS	139

LISTA DE FIGURAS

FIG. 1. Estrutura da isatina 1 e do indol 2 (1).....	19
FIG. 2. Estrutura do fármaco Malato de Sunitinib 1 , Fosfato de Toceranib 2 , Semaxanib 3 e Orantinib 4 (13).....	24
FIG. 3. Equações tipo-Fenton com o cobre (17).....	26
FIG. 4. Transporte do cobre em células humanas (19).	27
FIG. 5. Modelo da distribuição do cobre em mamíferos dando ênfase para as ATP7A e ATP7B (29).	28
FIG. 6. Número de publicações com os metais de transição em sistemas biológicos. (Vermelho: acima de 4000, alaranjado: entre 4000 e 1000, amarelo: entre 1000 e 500, verde: entre 500 e 200, azul: entre 200 e 100, violeta: abaixo de 100 e branca: nenhum trabalho(32).....	29
FIG. 7. Número de artigos no Web of Science com os termos “cobre e anticancer” de 2000 até 2012. (30).....	33
FIG. 8. Número de artigos encontrados no SciFinder numa busca com os termos “copper and anticancer” de 1959 até 2018.	34
FIG. 9. Representação da síntese do composto isapn partindo de isatina e 1,3 – propanodiamina na proporção 2:1, em etanol.....	54
FIG. 10. Representação da síntese do composto $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$ partindo do isapn e de perclorato de cobre(II) hexahidratado na proporção 1:1 em metanol.....	54
FIG. 11. Representação da síntese do composto $[Zn(isapn)](ClO_4)_2$ partindo do isapn e de perclorato de zinco(II) hexahidratado na proporção 1:1 em metanol.	55
FIG. 12. Representação da síntese do composto $[Cu(misapn)H_2O](ClO_4)_2$ partindo do 1,3–propanodiamina, do perclorato de cobre(II) hexahidratado e da isatina na proporção 1:1:1 em metanol.	55
Figura 13. Representação da síntese do composto $[Zn(misapn)Cl_2]$ partindo do 1,3 –propanodiamina, de cloreto de zinco e da isatina na proporção 1:1:1 em metanol.....	56
FIG. 14. Representação da síntese do composto isaepy partindo do 2-aminoetilpiridina e da isatina na proporção 1:1 em etanol.....	57
FIG. 15. Representação da síntese do composto $[Cu(isaepy)H_2O](ClO_4)_2$ partindo do Isaepy e do perclorato de cobre(II) hexahidratado na proporção 1:1 em etanol.....	57
FIG. 16. Representação da síntese do composto $[Zn(isaepy)_2](ClO_4)_2$ partindo do isaepy e do perclorato de zinco(II) hexahidratado na proporção 1:1 em etanol.....	58
FIG. 17. Espectro na região do infravermelho. A) isapn. B) $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$ C) $[Zn(isapn)](ClO_4)_2$	62
FIG. 18. Espectros na região do infravermelho. D) $[Cu(misapn)(H_2O)](ClO_4)_2$; E) $[Zn(misapn)Cl_2]$	63
FIG. 19. Espectros na região do infravermelho. F) isaepy; G) $[Cu(isaepy)(H_2O)](ClO_4)_2$ 5; H) $[Zn(isaepy)_2](ClO_4)_2$ 6.....	64
FIG. 20. Espectros na região do UV/Vis dos compostos: A) ligante isapn; B) $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$ 1; C) $[Zn(isapn)](ClO_4)_2(H_2O)$ 2; D) $[Cu(misapn)(H_2O)](ClO_4)_2$ 3; E) $[Zn(misapn)Cl_2]$ 4; F) ligante isaepy; G) $[Cu(isaepy)(H_2O)](ClO_4)_2$ 5; H) $[Zn(isaepy)_2](ClO_4)_2$ 6.	73

FIG. 21. Inibição da atividade quinase do complexo CDK1- ciclina B pelos compostos indicados. A) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo CDK1- ciclina B, na presença e na ausência de 5 ou 50 μM de isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$ ou $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$ e quantificação das bandas usando ImageJ. B) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo CDK1- ciclina B, na presença e na ausência de 5 ou 50 μM de $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ ou $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e respectiva quantificação das bandas usando ImageJ.	80
FIG. 22. Inibição da atividade quinase do complexo CDK1- ciclina B pelo complexo $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. A) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo CDK1- ciclina B, na presença e na ausência de 5, 25, 30, 50, 75 ou 100 μM de $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. B) Quantificação das bandas usando ImageJ.	81
FIG. 23. Inibição da atividade da fosfatase alcalina na presença do isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ ou $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. A) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo ciclina B- CDK1 seguido de desfosforilação pela fosfatase alcalina na presença ou ausência de 5 ou 50 μM de isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$, ou $[\text{Cu(isaepy)}]^+$; B) Atividade relativa de desfosforilação da fosfatase alcalina medida pela quantificação das bandas da histona H1 que permanecem fosforiladas em A.	83
FIG. 24. Inibição da atividade da fosfatase alcalina na presença do isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ ou $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. A) Reação realizada como descrito na fig. 17 sendo analisada por TLC para a separação de excesso de $^{32}\text{P}-\gamma\text{-ATP}$ do ^{32}Pi liberado após a hidrólise do $^{32}\text{P}-\gamma\text{-ATP}$ ou ^{32}P -histona H1 pela fosfatase alcalina.	84
FIG. 25. Temperatura de desnaturação do DNA na presença ou ausência do $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. A) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no DNA na ausência ou presença de $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ nas concentrações de 50, 100, 200 ou 250 μM . B) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no RNA na ausência ou presença de $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ nas concentrações de 50 ou 100 μM	86
FIG. 26. Temperatura de desnaturação do RNA na presença ou ausência do $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. A) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no DNA na ausência ou presença de $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ nas concentrações de 50, 100, 200 ou 250 μM . B) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no RNA na ausência ou presença de $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ nas concentrações de 50 ou 100 μM	87
FIG. 27. Eletroforese em gel com DNA, na presença ou ausência do $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. Nas várias colunas tem-se bandas do marcador de DNA, SYBR Green, do grupo controle, na presença de 2 % de DMSO ou do $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ nas concentrações de 50, 100, 200 ou 250 μM	88
FIG. 28. Atividade dos complexos $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ sobre vesículas fosfolipídicas. A) Gráfico da intensidade de fluorescência emitida pela carboxifluoresceína liberada de vesículas constituídas por 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, sob a influência dos complexos $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$	89
FIG. 29. Atividade dos complexos $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ sobre vesículas fosfolipídicas. Gráfico da intensidade de fluorescência emitida pela carboxifluoresceína liberada de vesículas constituídas por 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), sob a influência dos complexos $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$	90
FIG. 30. Imagem óptica das células HeLa expostas por 24h aos compostos isapn, $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, isaepy, $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ na concentração de IC_{50} e dos controles na ausência de estímulos ou com 2% de DMSO.	93

FIG. 31. Análise do efeito do tratamento por 24 h na concentração de IC50 dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺ 1, [Zn(isapn)]⁺ 2, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ 5 e [Zn(isaepy)]²⁺ 6, sobre o ciclo de células HeLa. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2%DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Histogramas das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Histogramas das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) Gráfico da porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular de todos os grupos testados..... 99

FIG. 32. Análise do processo de morte desencadeado pelo tratamento de HeLa por 24 h na concentração do IC50 dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2% DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Histogramas das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Histogramas das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺..... 102

FIG. 33. Análise espectral e imageamento Raman das células Hela. A) Espectros dos fatores A, B, C e D obtidos para as células controle. B) Imagens das células controles evidenciando a intensidade dos fatores A, B, C e D. A barra de cor à direita demonstra a intensidade dos fatores. 106

FIG. 34. Análise espectral e imageamento Raman das células Helas tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. A) Espectros dos fatores A*, B*, C* e D* obtidos para as células Helas tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. B) Imagens das células Helas tratadas com [Cu(isaepy)]⁺ evidenciando a intensidade dos fatores A*, B*, C* e D*. A barra de cor à direita demonstra a intensidade dos fatores. 108

FIG. 35. Análise espectral e imageamento Raman das células Helas tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. A) Espectros dos fatores A**, B**, C** e D** obtidos para as células Helas tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. B) Imagens das células Helas tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺ evidenciando a intensidade dos fatores A**, B**, C** e D**. A barra de cor à direita demonstra a intensidade dos fatores. 109

FIG. 36. Análise do estresse oxidativo das células HeLa tratadas por 24 h na concentração de IC50 dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2% DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Histogramas das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Histogramas das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) Gráfico da porcentagem de células sem ou com pouca marcação (ROS-) e com intensa marcação (ROS+)..... 113

FIG. 37. Análise do potencial de membrana mitocondrial de células HeLa na presença ou ausência dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina), controle positivo (apenas rodamina), com estímulo de 2% de DMSO, com isapn, com [Cu(isapn)]²⁺ e com [Zn(isapn)]⁺. B) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina), controle positivo (apenas rodamina), com estímulo de 2% de DMSO, com isaepy, com [Cu(isaepy)]⁺ e com [Zn(isaepy)]²⁺..... 115

FIG. 38. Ensaio cometa alcalino da linhagem celular HeLa, tratada por 24 h na concentração do IC50 dos compostos: isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy,

[Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Imagem de um cometa representativo do grupo controle. B) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com 2% DMSO. C) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com isapn. D) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com isaepy. G) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) gráfico comparativo do Olive Tail Moment obtido para cada grupo de células. 118

FIG. 39. Análise do dano no DNA das HeLa tratadas por 24 h na concentração do IC₅₀ dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2% DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Histogramas das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Histogramas das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) Gráfico comparativo das células marcadas para phospho-ATM e phospho-histona H2A.X. .. 122

FIG. 40. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para detecção de Rodamina 123 no interior das células MES-SA/DX5, tratadas por 24 h, na concentração do IC₅₀ dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺, na presença de 1 µM de Hoechst e 1 µM de Rodamina. 125

FIG. 41. Análise do potencial de membrana mitocondrial de células MES-SA na presença ou ausência dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina 123), controle positivo (apenas rodamina 123), com estímulo de 2% de DMSO, com isapn, com [Cu(isapn)]²⁺ e com [Zn(isapn)]⁺. B) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina 123), controle positivo (apenas rodamina 123), com estímulo de 2% de DMSO, com isaepy, com [Cu(isaepy)]⁺ e com [Zn(isaepy)]²⁺. 128

FIG. 42. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para detecção de vesículas ácidas por meio de marcação com o corante laranja de acridina nas células da linhagem HACAT tratadas por 24 h na concentração do IC₅₀ dos compostos [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, [Cu(isaepy)]⁺ ou [Zn(isaepy)]²⁺. 131

FIG. 43. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para detecção de células em processo necrótico por meio de marcação com o corante iodeto de propídio, nas células da linhagem HACAT, tratadas por 24 h na concentração do IC₅₀ dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. .. 132

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Citotoxicidade dos derivados da isatina frente a células U937.....	21
TABELA 2. Citotoxicidade dos derivados de isatina frente as linhagens celulares U937, Jurkat e MCF-7.....	23
TABELA 3. Concentração de cobre em tecidos saudáveis e tumorais.....	32
TABELA 4. Concentração de cobre no soro de pacientes saudáveis e com câncer.....	33
TABELA 5. Análises elementares das porcentagens de C, H e N.....	60
TABELA 6. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros vibracionais dos compostos sintetizados.....	66
TABELA 7. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros eletrônicos dos compostos estudados.....	73
TABELA 8. Parâmetros espectroscópicos obtidos de espectros EPR dos complexos de cobre(II) estudados.....	75
TABELA 9. Temperatura de desnaturação do DNA na presença ou ausência do complexo [Cu(isaepy)] ⁺ em diversas concentrações.....	82
TABELA 10. Valores de IC ₅₀ dos vários compostos estudados para as linhagens tumorais HeLa e para a linhagem não tumoral fibroblasto P4.....	88
TABELA 11. Concentração de cobre e zinco no lisado de células HeLa, na ausência ou em presença dos complexos.....	91
TABELA 12. Valores de IC ₅₀ dos compostos isapn [Cu(isapn)] ²⁺ , [Zn(isapn)] ⁺ , [Cu(misapn)] ⁺ , [Zn(misapn)] ²⁺ , isaepy, [Cu(isaepy)] ⁺ , [Cu(isaepy) ₂] ²⁺ , [Zn(isaepy)] ²⁺ e [Zn(isaepy) ₂] ²⁺ para as linhagens tumorais MES-SA e MES-SA/DX5.....	120
TABELA 13. Valores de IC ₅₀ dos compostos [Cu(isapn)] ²⁺ , [Zn(isapn)] ⁺ , [Cu(isaepy)] ⁺ e [Zn(isaepy)] ²⁺ frente a linhagem HACAT.....	125

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho investigamos alguns complexos metálicos, especialmente de cobre e de zinco, com ligantes derivados de indóis, com a finalidade de desenvolver compostos com propriedades antitumorais. Uma breve discussão sobre indóis e suas atividades biológicas, bem como sobre a importância do cobre e do zinco em sistemas biológicos será apresentada. Adicionalmente, uma breve revisão de metalofármacos baseados em cobre finaliza este capítulo.

1.1 INDÓIS

Inúmeros compostos derivados do indol apresentam atividade biológica bastante variada, incluindo antimicrobiana, antibiótica, anti-inflamatória, analgésica, anticonvulsivante, antimalárica, antitumoral, anti-leishmania, antioxidante (1). Compostos contendo o grupamento indol agem como inibidores de inúmeras quinases, especialmente os receptores tirosina quinases (RTKs) e as proteínas serina/treonina quinases, como as ciclinas dependentes de quinases (CDKs) (2). As quinases catalisam a transferência do grupo fosfatos do ATP para um substrato, regulando a transdução de sinal e regulando inúmeros processos celulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência, a apoptose, o metabolismo, a transcrição, a diferenciação entre outros (3). Portanto, o desenvolvimento de várias classes de tumores é facilitado pelo desequilíbrio na atividade desta família de proteínas (2) e são consideradas alvos promissores para a ação de fármacos antitumorais (3).

A isatina (1H-indol-2,3-diona) é um derivado do indol, na qual o anel está oxidado na posição 2 e 3. Foi descoberta por Erdmann e Laurent em 1840 como produto da oxidação do índigo. Durante 140 anos a isatina foi considerada sintética, deixando de ser entendida assim quando foi encontrada em plantas do gênero *Isatis*, em frutos da árvore abricó-de-macaco, *couroupita guianensis* Aubl. e em secreção da glândula parótida do sapo bufo (2).

Hoje, é sabido que a isatina é uma molécula endógena em humanos e em outros mamíferos, sendo proposto que a via metabólica de sua formação, em humanos, envolva a ação da microbiota no trato gastrointestinal sobre o triptofano ingerido. Segundo esta proposta, o triptofano oriundo do alimento é convertido a

indol pelas bactérias residentes no trato gastrointestinal, sendo este composto absorvido e transportado para o fígado, onde é oxidado, gerando a isatina (2).

A isatina e seus derivados possuem inúmeras atividades biológicas como antitumoral, neuroprotetor e anti-inflamatória (4), destacando-se a sua capacidade de inibir a Quinase Regulada por Estímulo Extracelular (ERK) e a sua habilidade em se intercalar no DNA (2).

FIG. 1. Estrutura da isatina **1** e do indol **2**. Imagem obtida da referência (1).

Cane et al., analisaram a ação da isatina sobre as linhagens celulares N1E-115 (neuroblastoma de camundongo), PC12 (feocromocitoma adrenal de ratos), HL60 (leucemia promielocítica humana), BALB/c3T3 (fibroblasto de camundongo) e BBC (células capilares do cérebro bovinos). Verificaram que ela inibe a proliferação dessas linhagens através da inibição da via das ERKs e, além disso, promove a fragmentação do DNA e a apoptose (5).

A isatina demonstrou ter atividade antitumoral contra o neuroblastoma SH-SY5Y tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, o tratamento com a isatina resultou em apoptose nessa linhagem. Após o estímulo com a isatina, ocorreu uma queda na expressão de Bcl-2 levando a uma diminuição na razão das proteínas Bcl-2/Bax, que resultou na liberação do citocromo c, na queda no potencial de membrana mitocondrial e no aumento na atividade das caspases-9 e 3 (6).

As proteínas da família Bcl-2 são divididas entre anti-apoptóticas (Bcl-2, MCL-1, BclxL, Bclw e BFL-1), pro-apoptóticas (BAX, BAK e BOK) e a pro-apoptótica BH3 (BIB, BIM, BAD, NOXA e PUMA). Estas proteínas regulam a via intrínseca de apoptose, determinando o destino das células através do balanço entre a atividade dos membros pro-ápoptóticos e anti-apoptóticos. Em condições normais, os membros anti-apoptóticos se ligam diretamente às pro-apoptóticas inibindo as suas atividades de induzir a morte celular. Todavia, em condições de estresse, os membros BH3 são ativados. Estes, então, ativam BAK/BAX e ou

neutralizam a função dos membros anti-apoptóticos da Bcl-2 por competir com suas ligações com BAK/BAX. Com consequência, BAK/BAX oligomerizam na membrana externa da mitocôndria formando poros. Permitindo a liberação do citocromo c e ativação das caspase, levando a morte das células por apoptose (7).

In vivo, a administração da isatina em camundongos portadores de SH-SY5Y resultou em uma diminuição da expressão de Bcl-2, novamente levando a uma queda na razão Bcl-2/Bax e resultando em uma supressão significativa no crescimento do tumor, com pouca toxicidade (6).

Recentemente, foi demonstrado que a isatina além de inibir a proliferação das células SH-SY5Y, também é capaz de diminuir a migração e a invasão realizada por estas células tumorais, sendo este efeito observado com concentração 50 μ M da isatina (4).

Em 2007, foi realizado um estudo no qual a atividade biológica de compostos derivados da isatina foi avaliada frente à linhagem cancerígena U937 (8).

TABELA 1. Citotoxicidade dos derivados da isatina frente a células U937. Tabela obtida da referência (8).

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	clog P ^c	IC ₅₀ ^d (μ M)
2a	O	H	H	H	H	H	0.828	565
2b	O	Br	H	H	H	H	1.69	214
2c	O	H	Br	H	H	H	1.69	64.5
2d	O	H	H	Br	H	H	1.69	74.8
2e	O	H	H	H	Br	H	1.69	83.0
2f	O	H	F	H	H	H	0.971	98.4
2g	O	H	I	H	H	H	1.95	53.4
2h	O	H	NO ₂	H	H	H	0.571	132
2i	O	H	OCH ₃	H	H	H	0.747	420
2j	O	H	Br	H	Br	H	2.55	10.5
2k	O	H	Br	Br	H	H	2.35	11.6
2l	O	H	I	H	I	H	3.07	7.85
2m	O	H	Br	H	NO ₂	H	1.43	257
2n	O	H	NO ₂	Br	H	H	1.23	17.1
2o	O	H	NO ₂	H	Br	H	1.43	>369
2p	O	H	Br	Br	Br	H	3.02	6.76
2q	N-C ₆ H ₅	H	H	H	H	H	2.65	76.5
2r	N-C ₆ H ₅	H	Br	H	Br	H	4.38	13.7
2s	N-NHC ₆ H ₅	H	H	H	H	H	2.47	>211
2t	O	H	H	H	H	CH ₃	0.564	238
Staurosporine								2.00

Esse estudo revelou que a substituição na posição 5, 6 e 7 (conforme Fig. 1) levou a um aumento na citotoxicidade desses compostos. A nitração na posição 5 aumentou a atividade anticâncer por um fator de 4. Todavia, a halogenação

nesta posição foi mais efetiva e tornou o composto de 5 a 10 vezes mais ativo do que a isatina não substituída. A di- ou tri-halogenação foi ainda mais efetiva, chegando a valores de IC_{50} inferiores a 10 μM , sendo o composto mais ativo o 5,6,7-tribromoisatina (8).

Tendo como base o aumento da citotoxicidade das isatinas halogenadas, Vine et al. sintetizaram bromo-isatinas as quais sofreram substituição no nitrogênio. Nesse trabalho, 24 compostos foram sintetizados e suas atividades frente a três linhagens cancerígenas (U937, Jurkat e MCF-7) foram avaliadas (9), conforme mostrado na Tabela 2.

Analisando estes resultados, é possível notar que a introdução de um substituinte com anel aromático no N1 do anel indólico, resultou em uma maior citotoxicidade do que a introdução de um grupo alila, um 2-metoxietil ou um 3-metilbutil frente às linhagens U937 e Jurkat. O composto **6** nessa Tabela, 5,7-dibromo-N-(*p*-metilbenzil)isatina, foi o mais citotóxico, apresentando um IC_{50} de 0.49 μM para U937 e Jurkat. Esse composto é cerca de 22 vezes mais ativo do que o 5,7-dibromoisatina, evidenciando o aumento da citotoxicidade em função da substituição no N1 do anel indólico (9).

Seguindo o estudo da isatina N1 substituídas, uma nova série de derivados da isatina, com um triazol ligado ao nitrogênio, foi testada quanto à sua citotoxicidade frente às linhagens tumorais TE-1, MCF-7, SW780, MGC-803 de câncer de esôfago, de mama, de bexiga e de estômago, respectivamente. Além das linhagens não tumorais HL-7702 e GES-1 (10).

O mecanismo de ação do composto mais citotóxico desta série envolve o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), a ativação das proteínas pro-apoptóticas Bax e a inibição de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Mcl-1, sendo capaz de induzir a apoptose através da via mitocondrial. Além disso, esse composto inibe a *demetilase lisina específica 1* (LSD1) (10). Enzima que age sobre a histona 3 como repressora da transcrição através da desmetilação da lisina 4 ou como ativadora da transcrição através da desmetilação da lisina 9. Esta desmetilase é essencial para o controle de processos biológicos como a proliferação celular. Podendo a sua superexpressão promover a proliferação, a migração e invasão de células tumorais (11).

Outros derivados da isatina apresentam modificações no carbono 2. O mais conhecido deles é a indirubina. Vários compostos baseados na indirubina exibem atividade antiproliferativa através da inibição das CDK1 e CDK2 por competir com o ATP na ligação ao seu sítio ativo.

Além disso, esses derivados são capazes de induzir a ocorrência de apoptose através da parada do ciclo celular em G2/M, como um resultado da inibição da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), da tirosina quinase c-Src e da ativação e expressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (2) (12).

Todavia, o maior número de derivados estudados da isatina são decorrentes da substituição no carbono 3. Dentre esses derivados damos atenção ao malato de sunitinib (fármaco *Sutent*) e ao fosfato de toceranib (fármaco *Palladia*). O primeiro composto foi aprovado em 2007 pela FDA (*Food Drug Administration*, agência reguladora nos USA) para o tratamento de carcinomas renais avançados. Sunitinib consegue inibir 8 receptores de tirosina quinase (VEGFR1–3, PDGFR α , PDGFR β , Kit, Flt-3 e CSF-1R) ao se ligar reversivelmente no sítio de ligação do ATP. O segundo, toceranib, também inibe receptores de tirosina quinase, incluindo VEGFR, PDGFR e Kit, sendo usado para o tratamento de mastocitoma cutâneo (1).

Além destes fármacos, outros compostos derivados da isatina foram submetidos a testes clínicos, como SU5416 (*Semaxanib*), o qual parou na fase III por apresentar alta toxicidade. Outro composto SU6668 (*Orantinib*) testado é um inibidor seletivo para VEGFG, PDGFRb e FGFR1. SU5614 se encontra em fase II e induz parada no crescimento celular e apoptose nas linhagens celulares Kasumi-1, UT-7 e M-07, que expressam c-kit (13).

FIG. 2. Estrutura do fármaco Malato de Sunitinib 1, Fosfato de Toseranib 2, Semaxanib 3 e Orantinib 4. Imagem obtida da referência (13).

Particularmente, derivados da isatina que possuem um anel heterocíclico ligado ao carbono 3, apresentaram grande citotoxicidade frente a linhagens tumorais que são sensíveis a apoptose, como glioma (HS683), melanoma murinho (B16F10), câncer de mama (MCF7), câncer de próstata (PC-3) e câncer de colon (LoVo). Também se mostraram altamente tóxicos frente a linhagens celulares que são resistentes a apoptose, como glioblastoma (U373), câncer de pulmão de células não pequenas (A549), melanoma (SKMEL-28), câncer esofágico (OE21), em concentrações micromolares. Esses dados indicaram que a isatina pode servir para o desenvolvimento de drogas que visam o tratamento de tumores resistentes a apoptose (14).

1.2. COBRE

O cobre é um micronutriente essencial para todos os organismos (15). Este é o terceiro elemento traço mais abundante nos humanos, após apenas do ferro e do zinco (16), sendo requerido para a saúde humana por estar presente na estrutura de diversas proteínas cruciais para a vida.

A característica química principal do cobre consiste em estar presente, no meio biológico, principalmente em dois estados de oxidação, a forma reduzida 1^+ e a oxidada 2^+ . Por possuir um baixo potencial redox em água, 0,158V, aceita e perde elétrons com facilidade. Portanto, apresenta uma elevada atividade redox no meio aquoso (17), podendo realizar troca de elétrons com outros compostos. Isto permite que ele alterne entre a forma oxidada e reduzida (18) em potenciais acessíveis no meio biológico, permitindo que aja como catalisador redox em diversos processos biológicos. O cobre está presente em diversos processos como na cadeia respiratória, onde comparece como citocromo c oxidase, na biossíntese e degradação de neurotransmissores, como tirosinase e proteínas relacionadas à tirosinase (TRP-1 e TRP-2), na produção de matriz colágena, na sinalização redox, na angiogênese e na remoção do radical superóxido, como Cu,Zn SOD (19).

O Cobre faz parte do sítio ativo de proteínas de diversos organismos, onde atua eficientemente em vários processos fundamentais. Entre essas proteínas podemos citar enzimas que realizam o transporte de elétrons (proteínas azuis, como a plastocianina e azurina) (16); o transporte de oxigênio (hemocianina) (20), a redução do oxigênio até água (citocromo c oxidase) (20) (21), a ativação do oxigênio para oxidações de substratos como catecóis e fenóis (tirosinase, catecol oxidase) (22), a oxidação de outros substratos importantes (galactose oxidase, amina oxidase) (23) (24) e a dismutação do superóxido (superóxido dismutase 1) (19), totalizando mais de trezentas enzimas nos humanos (18).

A homeostase do cobre no corpo humano envolve a absorção, o transporte, o armazenamento e a excreção deste. A sua ingestão diária recomendada é de 0,9 mg/dia para um adulto. Em um corpo humano adulto de 70 Kg há cerca de 110mg de cobre, distribuído em aproximadamente 46mg no esqueleto e na medula óssea, 26mg nos músculos esqueléticos, 10mg no fígado, 8,8mg no cérebro e 6mg no sangue (17) (18).

Em torno de 40% do cobre ingerido na dieta é absorvido no intestino e muito pouco é absorvido no estômago. Este metal é absorvido, principalmente, pelo sistema de transporte de aminoácidos, quando no sangue o cobre é transportado majoritariamente ligado à albumina e a sua principal forma de excreção é pela via biliar, responsável por cerca de 80 % do cobre excretado (17).

Apesar de o Cobre ser um elemento essencial para a vida, em contrapartida pode ser altamente tóxico, devido à sua grande reatividade. Pode danificar o metabolismo principalmente de duas maneiras: em primeiro lugar, em função de sua interação forte com os átomos de enxofre, podendo, por isto, interferir na ação de enzimas que contenham tiol, como proteases de cisteína e oxidorreduções. Em segundo, como resultado da sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio através da reação tipo Fenton, o cobre pode produzir, a partir do peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil o qual é mais reativo do que o próprio peróxido de hidrogênio, podendo causar danos no DNA, em lipídios e em proteínas (17) (19).

Na presença de um agente redutor como o ácido ascórbico ou glutatona, o íon cúprico, Cu(II), pode ser reduzido ao íon cuproso, Cu(I). Neste estado, pode ser oxidado pelo peróxido de hidrogênio produzindo o radical hidroxil através da reação tipo Fenton (17).

FIG. 3. Equação tipo-Fenton com o cobre (17).

Em função desta alta toxicidade, o organismo controla a reatividade do cobre mantendo-o ligado a proteínas carreadoras ou aminoácidos, evitando assim que fique livre no interior da célula, podendo causar danos a biomoléculas. É estimado que apenas 10^{-18} M de cobre estão livres na célula, ou seja, menos de 1 íon cobre livre por célula não está devidamente coordenado a biomoléculas (25).

Nas células humanas, diversas proteínas modulam e controlam o transporte de cobre (influxo, transporte, armazenamento, efluxo). Várias delas atuam para regular e mediar a homeostase desse metal, fazendo com que tanto a inserção do metal em sítios apropriados em proteínas específicas, como sua excreção através de membranas ocorram eficientemente e sem danos a células ou tecidos (26).

Para entrar nas células, o cobre é reduzido para a forma Cu(I) e transportado pela proteína transportadora de cobre CTR1, localizada na membrana celular. Logo em seguida, é capturado e direcionado para os compartimentos celulares específicos onde é utilizado para a maturação das enzimas dependentes de cobre. O primeiro componente celular responsável pelo controle do Cu(I) intracelular é a glutathiona (GSH). Neste tripeptídeo, o metal se liga ao enxofre do grupamento tiol. Esta ligação é facilitada pela abundância da GSH no citoplasma (na faixa mM), capaz de quelar íons de cobre.

Em seguida o metal é transferido para algumas pequenas proteínas chamadas de chaperonas de cobre, responsáveis pelo direcionamento deste metal para os compartimentos intracelulares. A proteína chaperona de cobre antioxidante 1 (Atox1) direciona o cobre para as bombas de cobre, ATP7A e ATP7B, na membrana de vesículas secretoras e na rede trans do aparato de Golgi; a chaperona de cobre para a superóxido dismutase 1 (CCS) entrega o cobre para a superóxido dismutase 1 (SOD1) e inúmeras chaperonas (COX17 / COX19 / SCO1 / SCO2) levam o cobre para a citocromo c oxidase (CCO). Estas chaperonas retiram o cobre da GSH devido ao fato de suas afinidades por ele serem várias ordens de grandeza maiores do que a da glutathiona. Posteriormente, o entregam para as proteínas alvos, como mostrado na Fig.4 (19) (27).

FIG. 4. Transporte do cobre em células humanas. Imagem extraída da referência (19).

O desequilíbrio na homeostase deste metal está relacionado a diversas doenças como a doença de Wilson e de Menkes, que são causadas por mutações nos genes ATP7B ou ATP7A, respectivamente, os quais expressam as ATPase tipo p transportadoras de cobre (vide Fig. 4). Além disso, um desequilíbrio na homeostase do cobre está implicado em desordens neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e de Alzheimer, as quais são associadas a uma distribuição anormal do cobre no cérebro (17) (19) (18).

Na doença de Wilson a mutação reduz a atividade da ATP7B levando a uma inibição na excreção do cobre pela bile. Consequentemente, ocorre acúmulo de cobre em vários órgãos, levando a cirrose e distúrbios neurológicos. A quantidade de cobre no fígado dos portadores desta disfunção normalmente excede 250mg/kg. Na doença de Menkes, ao contrário, a queda na atividade da ATP7A diminui a absorção intestinal do cobre causando deficiência deste metal (18) (28).

FIG. 5. Modelo da distribuição do cobre em mamíferos dando ênfase para as ATP7A e ATP7B. Figura obtida da referência (29).

1.3. METALOFÁRMACOS

Os metalofármacos oferecem uma maior gama de possibilidades na sua síntese do que compostos puramente orgânicos. É possível sintetizar complexos com diversos números de coordenação e, portanto, com diversas geometrias, para um mesmo metal, adicionalmente ao uso de ligantes com variadas estruturas

(diversos substituintes). Além disso, é possível produzir complexos com o metal em diversos estados de oxidação, com características termodinâmicas e cinéticas muito variadas e, em função disso, pode-se conseguir uma grande variedade na reatividade desses compostos (30).

Após a descoberta da cisplatina por Rosenberg e colaboradores em 1965 (31), os complexos de platina têm sido utilizados na terapia contra inúmeros tumores sólidos. Atualmente existem seis complexos de platina que são liberados para o uso em tratamentos tumorais. Sendo três destes; Cisplatina, Carboxiplatina e Oxaliplatina; liberados para o uso no mundo inteiro e três liberados localmente; Heptaplatina na Coreia do Sul, Lobapaltina na China e Nedaplatina no Japão (32).

Sendo a cisplatina e a carboxiplatina os complexos metálicos mais comercializados para esta finalidade (33). Todavia, o tratamento com estes compostos apresenta alguns problemas, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, além do desenvolvimento de células cancerosas resistentes. Tais efeitos limitam os seus usos e estimulam a pesquisa por novos metalofármacos, baseados em outros íons metálicos (34) (30).

Entretanto, há uma nítida discrepância no interesse dos efeitos biológicos de complexos de platina com os outros metais de transição. Este fenômeno é evidenciado na quantidade de publicação com estes metais em sistemas biológicos. A platina é o elemento mais estudado seguida pelos Ru e Cu e, bem longe, pelos Pd, Au, Fe, Zn, Co, Ni, Ag, Rh, Ir e Os, enquanto outros metais atraem pouca tenção (Mo, Y ou W) e outros não foram investigados ou apenas superficialmente (Nb, Hg, ZR) (32).

21 Sc Scandium 44.956	22 Ti Titanium 47.867	23 V Vanadium 50.942	24 Cr Chromium 51.996	25 Mn Manganese 54.938	26 Fe Iron 55.845	27 Co Cobalt 58.933	28 Ni Nickel 58.693	29 Cu Copper 63.546	30 Zn Zinc 65.38
39 Y Yttrium 88.906	40 Zr Zirconium 91.224	41 Nb Niobium 92.906	42 Mo Molybdenum 95.95	43 Tc Technetium 98.907	44 Ru Ruthenium 101.07	45 Rh Rhodium 102.906	46 Pd Palladium 106.42	47 Ag Silver 107.868	48 Cd Cadmium 112.414
57-71	72 Hf Hafnium 178.49	73 Ta Tantalum 180.948	74 W Tungsten 183.84	75 Re Rhenium 186.207	76 Os Osmium 190.23	77 Ir Iridium 192.217	78 Pt Platinum 195.085	79 Au Gold 196.967	80 Hg Mercury 200.592

FIG. 6. Número de publicações com os metais de transição em sistemas biológicos. (Vermelho: acima de 4000, alaranjado: entre 4000 e 1000, amarelo: entre 1000 e 500, verde: entre 500 e 200, azul: entre 200 e 100, violeta: abaixo de 100 e branca: nenhum trabalho. Imagem obtida da referência (32).

Os complexos de Pt(IV) com atividade antitumoral são considerados como pró-fármacos que são ativados após a redução a Pt(II). Estes complexos apresentam a habilidade de se ligarem tanto ao DNA e quanto ao RNA, causam parada do ciclo em fase G2/M, além de interferirem no balanço redox da célula por se ligarem a GSH. Ademais, agem na mitocôndria se ligando em citocromos e são capazes de desencadear estresse no retículo endoplasmático (32).

Assim como os complexos de Pt(IV), os de Ru(III) são considerados pró-fármacos ativados pela redução do metal à Ru(II). É conhecido que os complexos de rutênio são capazes de se ligarem ao DNA e de inibem a polimerização dos microtubulos. Além de se ligam a inúmeras proteínas como GRP78, e com proteínas que contem tiol como GSH-S-transferase e GSH reductase. Para mais destas capacidades de interação, a possibilidade de conversão de Ru(III) para Ru(II) estimule a produção de EROs e estes compostos agem na mitocôndria aumentando o nível de Ca^{2+} e diminuindo o potencial de membrana desta organela (32).

1.4. METALOFÁRMACOS DE COBRE

Ultimamente, a relação do cobre com o crescimento tumoral tem sido extensivamente estudada. Inúmeros trabalhos evidenciam que a distribuição deste metal em pessoas com tumores se encontra distinta daquela de pessoas saudáveis. A concentração do cobre se encontra aumentada tanto no soro quanto no tecido tumoral dos pacientes, como pode ser visto nas Tabelas 3 e 4 (35).

TABELA 3. Concentração de cobre em tecidos saudáveis e tumorais. Tabela extraída da referência (35).

	Cancer	Normal patients copper levels ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)	Cancer patients copper levels ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)	Number of subjects (significance compared to control)
Kuo et al. ¹⁵	Breast cancer	6.13 $\pm$ 4.32 (normal) 6.51 $\pm$ 5.33 (Benign)	11.08 $\pm$ 4.98 (Stage I) 10.10 $\pm$ 5.61 (Stage II) 17.18 $\pm$ 11.83 (Stage III)	25
Rizk et al. ¹⁵¹	Breast cancer	9.3 $\pm$ 2.3	21.0 $\pm$ 10.7	22 ($p < 0.0001$)
Yaman et al. ¹⁵²	Ovarian cancer	0.2–0.9	0.4–2.8	10
Gupta et al. ¹⁴⁹	Colorectal cancer	1.79 $\pm$ 0.57	2.78 $\pm$ 0.84	30 ($p < 0.001$)
Santoliquido et al. ¹⁵³	Breast cancer	2.38	3.25	20
Geraki et al. ³⁸	Breast cancer	0.29 $\pm$ 0.29 ppm	0.89 $\pm$ 0.56 ppm	40
Margalioth et al. ²³	Large bowel	1.53 $\pm$ 0.35	1.90 $\pm$ 0.6	24 ($p < 0.05$)
	Stomach	1.44 $\pm$ 0.38	2.09 $\pm$ 0.52	7 ($p < 0.02$)
	Ovarian	1.26 $\pm$ 0.45	2.16 $\pm$ 0.63	5 ($p < 0.01$)
	Breast	1.58 $\pm$ 0.62	1.91 $\pm$ 0.56	8
	Kidney	1.80 $\pm$ 0.42	1.61 $\pm$ 0.25	3
	Bladder	1.54	2.80 $\pm$ 0.3	2
	Testis	1.48 $\pm$ 0.7	1.43	1
	Hodgkin's	1.42 $\pm$ 0.44	3.18	1
	Total cases	1.42 $\pm$ 0.44	2.08 $\pm$ 0.76	53 ($p < 0.001$)
Mulay et al. ¹⁵⁴	Breast cancer	1.47 ppm	5.12 ppm	15 ($p < 0.01$)
Yaman et al. ¹⁵⁵	Stomach cancer	1.1 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1	18 ($p < 0.01$)
Lightman et al. ²⁷	Ovarian cancer	1.95 $\pm$ 0.64	2.17 $\pm$ 0.64	40
Carpentieri et al. ²⁵	Leukemia	15 $\pm$ 4 $\mu\text{g}/10^6$ cells	52 $\pm$ 16 $\mu\text{g}/10^6$ cells	12 ($p < 0.01$)

A literatura evidencia que diferentemente da queda observada nas concentrações de zinco, ferro e selênio nos tecidos tumorais, a de cobre aumenta significativamente quando comparada com a concentração em tecido saudável de indivíduos com a mesma idade (35). Ademais, o aumento da quantidade de cobre ocorre em uma grande variedade de tumores, como de mama, cervical, ovário, pulmões, próstata, estômago e leucemia, em pacientes com diferentes faixas etárias, de ambos os sexos e de várias localidades geográficas. Além disso, a concentração do cobre se relaciona com o estágio do tumor (35).

TABELA 4. Concentração de cobre no soro de pacientes saudáveis e com câncer.

Tabela extraída da referência (35).

	Cancer	Normal patients copper levels ($\mu\text{g}/\text{dL} \pm \text{SD}$)	Cancer patients copper levels ($\mu\text{g}/\text{dL} \pm \text{SD}$)	Number of subjects (significance compared to control)
Carpentieri et al. ²⁵	Acute lymphocytic leukemia	114 $\pm$ 29	328 $\pm$ 74	21 ($p < 0.01$)
Huang et al. ¹⁴⁶	Breast cancer	115 $\pm$ 20	131 $\pm$ 20	35 ($p < 0.01$)
Chan et al. ²⁰	Cervical	92.9	129.3	19 ($p < 0.001$)
Chan et al. ²⁰	Ovarian	92.9	139.5	4 ($p < 0.001$)
Cohen et al. ¹⁴⁷	Non-Hodgkin's lymphoma	120.4 $\pm$ 23.3	134.9 $\pm$ 42.4 (Stage I) 176.1 $\pm$ 66.3 (Stage II) 176.9 $\pm$ 37.5 (Stage III) 157.7 $\pm$ 49.6 (Stage IV)	
Yucel et al. ¹⁴⁸	Breast cancer	122.4 $\pm$ 15.8	222.7 $\pm$ 44.4 (Stage I) 203.9 $\pm$ 31.3 (Stage II) 238.1 $\pm$ 36.8 (Stage III) 228.4 $\pm$ 38.0 (Total)	35
Diez et al. ²¹	Lung cancer	100 $\pm$ 18.2	125 $\pm$ 20.2 (Stage I and II) 150 $\pm$ 33.8 (Stage III)	65 ($p < 0.001$)
Habib et al. ²²	Prostate cancer	84.1 $\pm$ 6.27	124 $\pm$ 8.3	44 ($p < 0.01$)
Rajput et al. ²⁴	Reticulo-endothelial system	115.8 $\pm$ 13.9 (males) 118.9 $\pm$ 17.1 (females)	228.0 $\pm$ 52.4 (males) 225.4 $\pm$ 61.8 (females)	70 ($p < 0.001$)
Scanni et al. ¹⁸	(1) Lung cancer (2) Stomach cancer (3) Large intestine	143.0 $\pm$ 3.2	188.2 $\pm$ 14.8 (Lung) 171.9 $\pm$ 7.3 (Stomach) 164.7 $\pm$ 13.4 (large intestine)	20 ($p < 0.01$) 33 ($p < 0.01$) 22 ($p < 0.05$)
Gupta et al. ¹⁴⁹	Colorectal cancer	98.8 $\pm$ 24.3	165 $\pm$ 33.9	30 ($p < 0.001$)
Zuo et al. ¹⁹	Leukemia	86.7 $\pm$ 25.3	132.8 $\pm$ 50.6 (Acute leukemia) 129.1 $\pm$ 49.8 (acute lymphoid leukemia) 139.9 $\pm$ 51.2 (acute non-lymphoid leukemia) 109.2 $\pm$ 45.4 (Chronic myelogeneous leukemia)	41 ($p < 0.01$) 7 ($p < 0.01$) 34 ($p < 0.001$) 8 ($p < 0.05$)
Jayadeep et al. ²⁶	(1) Oral leukoplakia (2) Squamous cell carcinoma	66.9 $\pm$ 22.0 (male) 66.8 $\pm$ 14.0 (female)	(1) Oral leukoplakia 89.6 $\pm$ 19.0 (male) 95.2 $\pm$ 17.0 (female) (2) Oral cancer 108.9 $\pm$ 17.0 (male) 107.8 $\pm$ 12.0 (female)	21 25 ($p < 0.001$) 22 ($p < 0.001$) 20 ($p < 0.001$)
Lightman et al. ²⁷	Ovarian cancer	133 $\pm$ 17.0 (Benign, $n = 42$)	160 $\pm$ 17.0 (Stage I) 190 $\pm$ 6.0 (Stage II) 179 $\pm$ 18.0 (Stage III) 210 $\pm$ 23.0 (Stage IV)	2 4 19 ($p < 0.001$) 11
Kuo et al. ¹⁵	Breast cancer	96.5 $\pm$ 7.3 (control) $n = 26$ 103.8 $\pm$ 8.3 (Benign) $n = 43$	125.2 $\pm$ 15.0	25 ($p < 0.01$)
Sharma et al. ¹⁵⁰	Breast cancer	100.7 $\pm$ 40.5	172.8 $\pm$ 12.2	50 ($p < 0.01$)

A associação entre o tumor e a elevada concentração do cobre não está elucidada. Contudo, tem sido proposta a relação do cobre com a angiogênese, com a invasão e com a metástase. A angiogênese requer cobre como um cofator que estimula a produção de citosinas, a degradação da matriz extracelular, a proliferação de células endoteliais e a migração mediada pela integrina (30). Todavia, este aumento de cobre nos tecidos tumorais pode ser utilizado para direcionar metalofármacos de cobre aos tumores.

Baseado nesta química do cobre, diversos complexos de cobre foram desenvolvidos para atuar como possíveis agentes farmacológicos ou medicinais,

contra o câncer. O interesse nos metalofármacos de cobre com atividade antitumoral tem crescido muito nos últimos anos, como é possível notar pelo número de publicações nessa área entre 2000 e 2012 (30).

FIG. 7. Número de artigos no Web of Science com os termos “cobre e anticancer” de 2000 até 2012. Gráfico obtido da referência (30).

Uma nova busca no SciFinder para os anos 1959 até 2018, usando as mesmas palavras-chaves, revelou os números da Fig. 8. Isto demonstra o crescente interesse e importância que compostos de cobre vêm despertando. Num total de 8126 publicações, 6672 (82,1%) estão em inglês; 459 (5,6%) são artigos de revisão; 821 (10,1%) são artigos em revistas e 2428 (29,9%) referem-se a patentes. Tem-se ainda 179 resumos de conferências, 113 resumos de congressos ou simpósios e 2372 (29,2%) arquivos de computador (*on line*).

FIG. 8. Número de artigos encontrados no SciFinder numa busca com os termos “copper and anticancer” de 1959 até 2018.

O cobre permite que seja produzida uma grande variedade de complexos nos quais esse elemento pode se encontrar nos estados de oxidação 1^+ , 2^+ e em poucos casos 3^+ , sendo o estado mais comum o 2^+ . A fácil conversão entre o cobre 1^+ e 2^+ torna o cobre um elemento com atividade redox apreciável no meio biológico. O cobre(I) prefere se ligar a ligantes através de átomos doadores macios, como os átomos de P, C, S. Embora sejam conhecidos complexos lineares com 2 ligantes e trigonais com três ligantes, preferencialmente os complexos de Cu(I) possuem quatros ligantes e apresentam geometria tetragonal. Já para complexos de cobre(II), o número de coordenação varia de quatro a seis, tendo preferência pelos átomos N, O e S. Na literatura são encontrados inúmeros estudos com ligantes do tipo aminas, iminas, tiocarbazonas, tiosemicarbazidas, entre outros (30). Em geral apresentam alguma distorção tetraédrica ao redor do metal, para facilitar a sua redução, sem correr o risco de “perder” os ligantes.

1.5. POSSÍVEIS ALVOS BIOLÓGICOS

Quando comparados aos fármacos de platina, é esperado que os medicamentos com cobre apresentem um maior espectro de ação, uma menor toxicidade e, além disso, é proposto que estas espécies possam superar o problema da resistência apresentado pelos fármacos com platina. Esses argumentos são baseados no fato de os compostos com cobre apresentarem mecanismos de ação diferentes daqueles de platina. Entretanto, ainda se sabe muito pouco sobre o modo de ação dos complexos de cobre. Destacam-se entre os possíveis alvos dos complexos de cobre: o DNA, as topoisomerasas, as quinases e o complexo proteico do proteassoma (30).

1.5.1. COMPLEXOS DE COBRE QUE POSSUEM O DNA COMO ALVO

É conhecido desde 1968 que o cobre possui uma alta afinidade pelo DNA (36), sendo em 1991 publicada a determinação da estrutura de um cristal, descrevendo a formação de adutos entre o CuCl_2 e o DNA, no qual o cobre se ligou ao N7 do resíduo de guanina (37).

Para algumas classes de complexos de cobre, a habilidade de se ligar ao DNA já está bem estabelecida. As interações podem ocorrer por meio de intercalação, atração eletrostática e ligação aos sulcos da estrutura do DNA, sendo que a interação do cobre pelo DNA depende do tamanho, da afinidade eletrônica e da geometria do complexo (30).

Com este propósito, tem sido dada muita atenção aos complexos de cobre(II) que contêm ligantes com átomos de N doadores, especialmente com ligantes bidentados do tipo diiminas, como a 1,10-fenantrolina e a 2,2'-bipiridina, combinados com outros ligantes como aminoácidos ou antibióticos (38) (39). Vale destacar os artigos do grupo de Lena Ruiz-Azuara, as chamadas casiopeínas, que recentemente entraram em testes clínicos (40) (41) (42).

1.5.2. COMPLEXOS DE COBRE INIBIDORES DE PROTEÍNAS TOPOISOMERASE I E II

A topoisomerase é uma enzima que possui a função de relaxar a tensão sobre as fitas de DNA no processo de replicação e transcrição (43). Portanto, essa enzima apresenta uma função de extrema importância para o ciclo celular, sendo

um importante alvo clínico para a quimioterapia antitumoral, visando a sua inibição (44).

A interação dos complexos de cobre com as topoisomerasas I e II é um campo de pesquisa que vem se desenvolvendo. A primeira observação de que complexos de cobre podiam inibir essas enzimas foi realizada utilizando complexos de cobre com ligantes de 2-furaldeidoxima, que inibem a topoisomerase II mais eficientemente do que o agente clínico antineoplástico inibidor de topoisomerase II, Etoposido (45).

Entre as classes de ligantes que estão sendo testados, complexados com o cobre, para atividade inibitória das topoisomerasas estão os α -heterociclos de tiossemicarbazidas e os derivados de quinolinonas. (30).

Nossos ligantes oxindolimínicos mostraram-se também ativos na inibição da topoisomerase IB atuando como inibidores catalíticos na clivagem do DNA (46). O fármaco comumente utilizado neste caso é a captotecina, todavia a sua instabilidade e baixa solubilidade em água tem estimulado o desenvolvimento de novos compostos capazes de inibir a atividade topoisomerase (47).

1.5.3. COMPLEXOS DE COBRE INIBIDORES DO PROTEASSOMA

O proteassoma é um complexo de proteínas com a função de modular e degradar proteínas intracelulares (48). Para uma proteína ser reconhecida e processada pelo proteassoma precisa ser previamente ubiquitinada. Esse complexo proteico é parte do principal mecanismo pelo qual as células controlam a concentração e estabilidade de inúmeras proteínas como as ciclinas, as proteínas da família bcl-2 e p53 (30). A degradação dependente do proteassoma é essencial para inúmeras funções celulares de grande importância para o tumor como proliferação, apoptose, angiogênese e metástase (49).

Tem sido demonstrado que as células tumorais são mais sensíveis à inibição de proteassoma do que as células normais. Em função disso, o proteassoma tem se tornado um excelente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos e a investigação nesse campo é muito intensa (30).

A inibição do proteassoma mediado pelo cobre é aumentada pela escolha apropriada de ligantes bidentados, entretanto, pode ser bloqueada por ligantes polidentados como o EDTA. Esse resultado demonstra que quando o cobre está

com seus sítios de coordenação saturados pelo ligante não apresenta atividade inibidora do proteassoma, provavelmente pelo fato de o metal estar incapaz de interagir com o complexo proteico (30).

Recentemente, inúmeros trabalhos com complexos de cobre utilizando ligantes derivados de ditiocarbamato (50) (51), 8-hidroquinolina, clioquinol e base de Schiff têm sido publicados com a capacidade de inibir o proteassoma (52). No nosso grupo de pesquisa, ligantes oxindolimínicos demonstraram que sua atividade na inibição do proteassoma é apenas moderada [Gabriela Cristina Stuchi, Relatórios durante Bolsa de Iniciação Científica, Processo FAPESP 2012/24637-5 (agosto/2013 a fevereiro/2014)].

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos principais: a) monitorar a inserção e a distribuição intracelular de complexos de cobre(II) ou zinco(II) com ligantes oxindolimínicos, cuja atividade antitumoral já havia sido verificada em nosso laboratório; b) identificar seus alvos preferenciais intracelulares; e c) verificar seus possíveis mecanismos de atuação. Para tanto, foi necessário monitorar a presença dos complexos metálicos estudados no interior da célula e dos danos celulares causados, através de diferentes técnicas, especialmente técnicas de imageamento (Fluorescência e Microscopia Raman confocal).

Como objetivos específicos, procedeu-se a:

- a) síntese das bases de Schiff derivadas de um oxindol, a isatina, e dos correspondentes complexos de cobre(II) ou zinco(II);
- b) caracterização de ligantes e complexos preparados, através de diferentes técnicas (UV/Vis, análise elementar, IV, EPR);
- c) investigação *in vitro* da distribuição dos complexos intracelularmente, através de monitoramento dos metais por espectroscopia de fluorescência de Raio X (TRXF);
- d) verificação *in vitro* da atividade inibitória dos complexos frente à proteína quinase dependente de ciclina, CDK1 (ativada por ciclina B) e da proteína fosfatase alcalina;
- e) monitoramento *in cellulo* de danos celulares, através de fluorescência, com o uso de sondas apropriadas, ocasionados pelo tratamento de células tumorais HeLa com alguns complexos de cobre(II) ou seus análogos de zinco(II);
- f) monitoramento *in cellulo* de danos celulares, através de microscopia Raman confocal, ocasionados pelo tratamento de células tumorais HeLa com um complexo de cobre(II) ou seu análogo de zinco(II);
- g) ensaios *in cellulo* de diminuição do potencial de membrana de mitocôndrias em tratamento de células HeLa com os complexos estudados;
- h) ensaios cometa, de monitoramento de danos ao DNA em presença dos complexos oxindolimínicos de cobre(II) ou zinco(II);

- i) testes de viabilidade celular de sarcomas uterinos humanos (standard MES-SA e resistentes MES-SA/Dx5) e de células de queratinócitos humanos (HaCaT), através de medidas de fluorescência.

3. MÉTODOS UTILIZADOS

3.1. MEDIDAS FÍSICAS

3.1.1. ANÁLISE ELEMENTAR

Microanálises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química, usando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400. O equipamento permite uma determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%.

3.1.2. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV/VIS

Os espectros na região de UV/Vis foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu, mod. UV-1601PC, com varredura na faixa de 100 a 1000 nm. As amostras foram colocadas em células de quartzo, com 1,00 cm de caminho óptico.

3.1.3. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

Os espectros vibracionais foram obtidos na região do infravermelho entre 4000 e 400 cm^{-1} , em pastilha de KBr previamente seco em estufa a 120°C. Os espectros foram coletados com uma resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 64 varreduras em média, em um espectrômetro ABB BOMEM, modelo MB, com transformada de Fourier.

3.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

3.2.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA QUINASE DEPENDENTE DE CICLINA (CDK1)

A avaliação da capacidade de inibição da CDK1, ativada por ciclina B, pelos compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ foi realizada incubando simultaneamente o complexo de CDK1-ciclina B humana (Biolabs) com histona humana H1 (Biolabs) e $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$

(Genese), a 30 °C, por 45 min, na presença ou ausência destes compostos, nas concentrações de 5 µM e 50 µM. A atividade da enzima CDK1 foi acompanhada pela fosforilação da histona H1, revelada através de corridas de eletroforese em géis SDS-PAGE 12% de acrilamida, seguida de sua exposição a uma fonte de raios-x, originando filmes que foram analisados em um scanner Typhoon (GE Healthcare).

3.2.2. ANÁLISE DE ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

Visando avaliar o efeito dos compostos (isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) e [Zn(isaepy)Cl₂]) sobre a atividade da fosfatase alcalina, foi realizada a incubação do complexo de CDK1-ciclina B humana (Biolabs) com histona humana H1 (Biolabs) e γ-³²P-ATP (Genese) a 30 °C, por 45 min, na presença ou ausência desses complexos. Em seguida, adicionou-se 1U da fosfatase alcalina na intenção de evidenciar a sua capacidade de desfosforilar a histona H1, deixando-a agir por 15 min. Posteriormente, a atividade da fosfatase alcalina analisada por cromatografia em camada fina (TLC) para a visualização do fosfato (³²P) liberado da histona H1 desfosforilada pela fosfatase alcalina ou da γ-³²P-ATP. Além disso, foi realizada uma corrida de SDS-PAGE geis 12% de acrilamida seguidas às suas exposições à filmes de raio-x os quais foram analisados em um scanner Typhoon (GE Healthcare).

3.2.3. CURVA DE DESNATURAÇÃO DE DNA e RNA

Visando avaliar a capacidade de intercalação do [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) em DNA e RNA, foi realizada uma curva de desnaturação com 100 ng de cada um destes biopolímeros marcados com SYBR Green na presença de 2% DMSO, 50 µM, 100 µM, 200 µM e 250 µM do complexos, além do controle negativo no qual foi adicionado água.

Com este propósito, inicialmente preparou-se uma mix na ausência ou presença dos complexos, nas supracitadas concentrações, e 100 ng de DNA. Esta mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se SYBR Green à solução.

Posteriormente, foi realizada o aquecimento das mixes, através de uma curva de aquecimento que teve início em 25 °C e terminou em 95 °C, apresentando passos de 1% da temperatura. A curva de aquecimento e a leitura da fluorescência foi feita no *7500 Real Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific).

3.2.4. ENSAIO COM CARBOXIFLUORESCÉINA EM VESÍCULAS LIPÍDICAS

Visando a manufatura de vesículas de lipídio neutras ou negativas, primeiramente foi solubilizado 15 mg de 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) ou 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG), respectivamente, em clorofórmio. Em seguida o solvente foi secado por fluxo contínuo de argônio, produzindo um filme de lipídio.

Este filme foi suspenso em 0,5 mL de uma solução de tris 10 mM com 50 mM de carboxifluoresceína (CF). Formando vesículas de lipídio contendo carboxifluoresceína no seu interior. Visando a homogeneização do tamanho das vesículas, a suspensão foi extrusada utilizando membrana de 0,1 µm. Após esta etapa, a suspensão passou por uma coluna de Sephadex G-50, de forma que foi realizado a separação das vesículas de lipídio da CF solta na solução.

Pretendendo demonstrar influência dos compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ sobre a estrutura das vesículas, foi adicionado 7 µL da suspensão de vesículas de POPC ou POPG a cada poço de uma placa de 96 poços, juntamente a 183 µL de tampão tris 10 mM com NaCl 300 mM e 10 µL das amostras, de forma que os compostos se encontrassem nas concentrações de 20, 30, 40 e 50 µM. Além dos grupos controles nos quais ao invés das amostras foram adicionados 10 µL de tampão tris 10 mM com NaCl 300 mM em um e 10 µL de DMSO no outro.

Em sequência a adição dos compostos, foram realizadas leituras da fluorescência no SpectraMax i3 utilizando o comprimento de onda de 480 nm para excitação e 518 nm para a detecção da fluorescência da carboxifluoresceína, nos tempos 0, 20, 40, 60 e 120 minutos para as vesículas feitas com POPC e 0, 20, 40, 60, 120 e 160 minutos para as vesículas feitas com POPG.

Por fim, visando obter o valor de 100% de liberação da CF, as vesículas foram lisadas utilizando uma solução com 1% de SDS e a fluorescência foi medida novamente.

3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN CELLULO*

3.3.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Desejando evidenciar a citotóxicidade dos complexos frente as linhagens tumorais (HeLa, MES-SA, MES-SA/DX5 e HACAT) e não tumoral (fibroblasto P4), realizou-se a análise da viabilidade celular, utilizando o ensaio de redução de corante de tetrazólio (MTT). Neste ensaio, semearam-se 1×10^4 células de cada linhagem em cada poço de uma placa de 96 poços contendo 200 μ L de meio de cultura DMEM (Dubelcco Modified Eagle's Medium) para as linhagens HeLa, Fibroblasto P4 e HACAT e o meio McCoy's 5A para MES-SA e MES-SA/DX5 suplementado com 10% SFB, durante 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. O meio de cultura foi removido, as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e o, respectivo, meio de cultura contendo de 5 μ M a 100 μ M de isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), [Cu(misapn)H₂O](ClO₄), [Zn(misapn)Cl₂], isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄), [Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂, [Zn(isaepy)Cl₂], ou [Zn(isaepy)₂](ClO₄)₂] foi adicionado aos poços. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições, todavia, na ausência dos compostos. As placas foram incubadas durante 24 h para as linhagens HeLa, MES-SA, MES-SA/DX5 e fibroblasto P4, enquanto, que para a linhagem HACAT foi incubada por 24 e 48 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar.

Subsequentemente, o meio de cultura foi removido e as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante 3 h com 200 μ L de um meio de cultura DMEM contendo 0,5 mg/mL de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Em seguida, removeu-se a solução sobrenadante, adicionou-se 100 μ L de DMSO a cada poço e a absorbância a 570 nm foi lida num instrumento de microplaca Tecan Infinite M200 (Suíça) para monitorizar a formação dos cristais azuis de formazan.

3.3.2. IMAGEM ÓPTICA DAS CÉLULAS

Para obter as imagens ópticas das células após o estímulo com os compostos, foram semeadas 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 6

poços contendo 2 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, durante 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. O meio de cultura foi removido, as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e um meio de cultura DMEM sem composto ou contendo isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] na concentração dos respectivos IC₅₀ foi adicionado. As placas foram incubadas nestas condições durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar. Após este período, foram as imagens das células capturadas utilizando o microscópio Axio zeiss Vert.A1.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE E DE ZINCO EM LISADOS CELULARES

Determinou-se a quantidade de cobre e de zinco presente no lisado de células HeLa na ausência e na presença dos complexos [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] após tratamento por 24 h na concentração do IC₅₀. Na intenção de dosar a quantidade desses metais de transição presente nos respectivos lisados celulares foi utilizado um espectrômetro S2 PicoFox da Bruker. As amostras foram dispersas em discos de quartzo e as quantidades de cobre e zinco foram analisada com base na espectroscopia de fluorescência de raios X de reflexão total (TXRF) (53).

3.3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS NOS LISADOS CELULARES

A extração do conteúdo intracelular foi realizada através da lise das células utilizando PBS com 0,1% de SDS, sendo a dosagem de proteína presente nesse material realizada através do protocolo de Bradford (54).

Para servir como padrão, foi construída uma curva de calibração utilizando BSA diluída em água destilada para concentrações de proteína entre 0,125 a 1,0 mg/ml.

Nos poços que pretendíamos dosar a concentração de proteínas, foi adicionado 5µL da amostra e, em seguida, foi acrescentado 250µL da solução de

Bradford (BIORAD), previamente diluídos cinco vezes em água destilada em cada poço, sendo a leitura da amostra realizada em 595nm no leitor de ELISA (Spectramax Molecular Devices).

3.3.5. CICLO CELULAR

Com o propósito de monitorar o efeito dos compostos sobre o ciclo celular das HeLas, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo utilizando o *Muse Cell Cycle assay kit* (MCH100106) (Merck Millipore). Para este ensaio, foram semeadas 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 6 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, durante 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e um novo meio de cultura DMEM foi adicionado contendo isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] na concentração dos respectivos IC₅₀, mantendo as placa nesta condição durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições, todavia na ausência dos compostos ou na presença de 2% de DMSO.

Após este período, as células foram ressuspensas com tripsina-EDTA e transferidas para um eppendorf, posteriormente centrifugado a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 1 vez com PBS, sendo centrifugado novamente a 300 g por 5 minutos. Visando fixar as células, o sobrenadante foi, novamente, descartado e foi adicionado ao pellet etanol 70% (etanol: PBS) gelado até que a concentração de células ficasse entre 5×10^5 e 1×10^6 , sendo mantido nesta condição por 3 h a -20 °C.

Para a análise, 200 uL desta suspensão de células fixadas foi transferido para um novo eppendorf onde foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 1 vez com PBS, sendo centrifugado, novamente, a 300 g por 5 minutos. Ao pellet final, foi adicionado 200 uL do reagente *Muse™ Cell Cycle* a cada tubo, sendo incubado por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após este período foi realizada a leitura no *Muse Cell analyzer*.

3.3.6. CITOMETRIA DE FLUXO COM ANEXINA V - IODETO DE PROPÍDIO

A citometria de fluxo é uma técnica definida como um sistema que permite medir e depois analisar os sinais emitidos por uma partícula que flui em um líquido através de um feixe de luz (55). Com o propósito de monitorar a morte celular, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo utilizando os marcadores para apoptose e necrose, anexina V e iodeto de propídio, respectivamente. Quando a célula está em um processo de morte por apoptose, o fosfolípido fosfoserina é exposto na face externa da membrana plasmática. A anexina V se liga a este fosfolípido e, portanto, a anexina V marcada com fluorescência pode ser usada para marcar as células em apoptose. O iodeto de propídio é capaz de entrar apenas nas células em necrose (56).

Para esta análise, foram semeadas 1×10^5 células HeLa em cada poço de uma placa de 6 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, durante 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e um novo meio de cultura DMEM foi adicionado contendo isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] na concentração dos respectivos IC₅₀, mantendo as placa nesta condição durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições, todavia, na ausência dos compostos ou na presença de 2% de DMSO.

Em seguida, as células foram destacadas com tripsina-EDTA e transferidas para um eppendorf. As amostras foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado com o tampão de ligação 1X sendo, em seguida, centrifugado novamente a 400 g por 5 minutos. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 50 µL da solução com anexina V e iodeto de propídio. As células foram incubadas por 10 min no escuro a temperatura ambiente. Após este período, realizou a leitura das amostras no citômetro de fluxo BD-FACS verse, usando 488 nm e 655 nm para excitação e 525 nm e 730 nm para a emissão da anexina V e iodeto de propídio, respectivamente.

3.3.7. AQUISIÇÃO DE IMAGENS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA RAMAN CONFOCAL

Para a aquisição das imagens do Raman confocal, incubaram-se 1×10^5 células HeLa em placa de Petri, contendo em seu interior uma lamínula de vidro, com DMEM contendo 10% de SFB, a 37 ° C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM na ausência ou na presença dos complexos [Cu(isaepy)]⁺ ou [Zn(isaepy)]²⁺, na concentração de 16 µM e 100 µM, respectivamente, por 24 h. Após esse período, a lamínula, na qual as células se encontravam aderidas, foi transferida para uma lâmina onde foi selada e as imagens de Raman foram registradas.

As imagens hiperespectrais foram obtidas num equipamento WITec Alpha-300R usando um laser Nd:YAG com frequência duplicada ($\lambda = 532$ nm), uma objetiva Nikon (100x) imersa em óleo e um sensor piezo-driven xyz controlado para escanear as áreas selecionadas na direção xy, enquanto coleta o espectro para cada pixel com um detector EMCCD. Cada imagem foi programada para ser mapeada com resolução espacial de ~300 nm e tempo de integração de 0,15 s, ajustando a potência do laser para 32,1 mW/cm². O tempo total gasto para a aquisição de cada imagem era dependente do tamanho da área digitalizada, tendo sido obtidos conjuntos de dados com 6000 a 18000 espectros por imagem.

3.3.8. ESTRESSE OXIDATIVO

Com o propósito de monitorar o efeito dos compostos sobre o estado redox das HeLas, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo utilizando o *Muse Oxidative Stress Kit* (MCH100111) (Merck Millipore). Para o ensaio de estresse oxidativo, foram semeadas 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 6 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, durante 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂.

Após este período de tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS e um novo meio de cultura DMEM foi adicionado contendo isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] na concentração dos respectivos IC₅₀, mantendo as placa nesta condição durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar. Sendo o

grupo controle foi mantido nas mesmas condições, todavia, na ausência dos compostos ou com 2% de DMSO.

Após este período, as células foram ressuspensas com tripsina-EDTA e transferidas para um eppendorf, posteriormente centrifugados a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 1 vez com o tampão 1X, sendo centrifugado novamente a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi, novamente, descartado e foi adicionado ao pellet tampão 1X de modo que a solução ficou com 1×10^6 – 1×10^7 células/mL. Desta suspensão celular 10 µL foi coletado e transferido a outro eppendorf onde foi adicionado 190 µL de *Muse Oxidative Stress Working a Solution* a qual foi previamente diluída 1:8000 no tampão 1X. Foi deixado incubar por 30 min a 37°C. Após este período, realizou-se a leitura no *Muse Cell analyzer*.

3.3.9. CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA

Semeou-se 1×10^5 células da linhagem HeLa ou MES-SA em cada poço de uma placa com 6 poços, sendo estas mantidas em meio de cultura DMEM ou McCoy's 5A, respectivamente, suplementado com 10% de SFB e 1 µM de rodamina 123 por 24 h, em atmosfera com 5 % de CO₂. Após este período, o meio de cultura fora substituído por um novo, também, suplementado com 10% de SFB e 1 µM de rodamina 123, contendo os compostos isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, Cu(isaepy) e Zn(isaepy) na concentração do IC₅₀ ou no caso dos controles, com 2% de DMSO e sem estímulo, durante 24 horas a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5%.

Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS, suspensas com tripsina-EDTA e transferidas para eppendorfs. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido com PBS. Após este período, realizou a leitura das amostras no citômetro de fluxo BD-FACS verse, sendo a excitação da rodamina 123 realizada com o comprimento de onda em 488 nm e a detecção da sua fluorescência em 515 – 575 nm (57).

3.3.10. COMETA ALCALINO

Pretendendo evidenciar o efeito dos compostos sobre DNA, foi realizado um ensaio de cometa. Para este teste, foram plaqueadas 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 12 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, sendo mantido nesta condição por 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e um novo meio de cultura DMEM foi adicionado contendo isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] na concentração dos respectivos IC₅₀, mantendo as placa nesta condição durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições, todavia, na ausência dos compostos ou com 2% de DMSO.

Após submetidas ao tratamento, suspendeu-se as células com tripsina-EDTA e transferidas para um eppendorf. Em seguida, realizou a centrifugação a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com PBS. Em seguida, 30 µL desta suspensão celular foi adicionada a 100 µL de agarose com baixo ponto de fusão (LMPA) 0,5% em PBS a 37 ° C. A solução foi distribuída numa lâmina, previamente coberta com 1,5% de agarose de fusão normal (NMA) em PBS. A lamina foi coberta com uma lamínula e deixou-se que ocorresse a solidificação destas por 20 min a 4 ° C. Posteriormente, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise fria (NaCl 2,5 M, 100 mL de EDTA, Tris 10 mM, 10% de DMSO e 0,1% de Triton X a 4 ° C) por 24h na geladeira. Então, as lamínulas foram removidas da solução de lise e colocadas em uma câmara de eletroforese, preenchidas com tampão alcalino (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA, pH > 13).

A eletroforese foi realizada a 4 ° C, 25V e 300 mA durante 30 minutos. Após a eletroforese, colocou-se as lâminas em posição horizontal, as lavou 3 vezes (por 5 minutos cada) com tampão de neutralização (Tris 0,4M, pH = 7,5). Em seguida, foram colocadas em posição inclinada para secagem e fixada com etanol puro por 5 min.

Por fim, no momento da análise das laminas o DNA proveniente das células foi marcado com brometo de etídio em solução aquosa (2µg/mL) e foram capturadas imagens das lâminas e os danos de DNA foi avaliado com o software Komet 6.0 (Andor Technology, Belfast, Northern Ireland acoplado a um microscópio Nikon).

A análise dos danos foi expressa utilizando o parâmetro *Olive Tail Moment*, o qual foi obtido através da leitura de 100 células por amostra, sendo 50 por lâmina.

3.3.11. CLIVAGEM DO DNA

Com o propósito de monitorar o efeito dos compostos sobre DNA, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo utilizando o *Muse Multi-Color DNA Damage kit* (MCH200107) (Merck Millipore). Para este teste, foram semeadas 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 12 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, sendo mantido nesta condição por 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS e um novo meio de cultura DMEM foi adicionado contendo isapn, [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄), isaepy, [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) ou [Zn(isaepy)Cl₂] na concentração dos respectivos IC₅₀, mantendo as placa nesta condição durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições, todavia, na ausência dos compostos ou com 2% de DMSO.

Após este período, as células foram ressuspensas com tripsina-EDTA e transferidas para um eppendorf. Em seguida, realizou a centrifugação a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado com 200 µl do tampão 1x, sendo centrifugado, novamente, a 300 g por 5 minutos. Visando fixar as células, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 200 µl do tampão de fixação e 200 µl do tampão 1x. A solução foi incubada por 10 min no gelo. Após este período, foi realizada a centrifugação a 300 g por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionado 200 µl do tampão de permeabilização. Sendo a suspensão das células mantida por 10 min no gelo. Ao fim deste tempo, realizou mais uma centrifugação a 300 g por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante foi adicionado 100 µl da solução dos anticorpos, a qual era constituída por 90 µl do tampão 1x, 5 µl do anticorpo *anti-phospho-Ataxiatelangiectasia mutated kinase (ATM)* e 5 µl do anticorpo *anti-phospho-histona H2A.X*, incubando por 30 min no escuro a temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas mais uma vez a 300 g por 5

minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µl do tampão 1x. Por fim, foi realizada a leitura no *Muse Cell analyzer*.

3.3.12. ENSAIO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P COM RODAMINA

Para este ensaio foram semeadas 1×10^5 células da linhagem MES-SA/DX5 em cada poço de uma placa de 6 poços. Com exceção do grupo de controle negativo, o qual foi mantido apenas em meio de cultura McCoy's 5A com 10% SFB e 0,1 µM de Hoechst, aos demais poços, também, foi adicionado 1 µM de Rodamina durante todo o ensaio. Após 24 h de plaqueamento, as células foram estimuladas com 2% de DMSO, 2% de DMSO + 10 µM de Verapamil (controle positivo) ou com os compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{misapn})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ na concentração dos respectivos IC_{50} durante 24 h. Após este período, as células foram lavadas três vezes com PBS e, então, fotografadas em um microscópio Zeiss Axiovert.A1.

3.3.13. ENSAIO COM ALARANJADO DE ACRIDINA

Foram plaqueadas 1×10^5 células de linhas HACAT em cada poço de uma placa de 6 poços, contendo em seu interior uma lamínula de vidro. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM com 10% de SFB por 24h em atmosfera com 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram incubadas com os complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ na concentração dos respectivos IC_{50} , durante 24 h, com exceção do grupo de controle, o qual foi mantido em meio de cultura DMEM sem adição dos compostos.

Após o tratamento, 2,5 µg/mL de alaranjado de acridina e 5 µM de Hoechst foram adicionados em cada poço e incubados durante 10 min. Após esse período, a lamínula, na qual as células se encontravam aderidas, foi transferida para uma lâmina onde foi selada e as imagens foram adquiridas no microscópio Zeiss modelo Axiovert 200, com excitação a 450-490 nm e emissão com filtro 515 nm.

3.3.14. ENSAIO DE IODETO DE PROPÍDIO

Foram plaqueadas 1×10^5 células de linhas HACAT em cada poço de uma placa de 6 poços, contendo em seu interior uma lamínula de vidro. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM com 10% de SFB por 24h em atmosfera com 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram incubadas com os complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ na concentração dos respectivos IC_{50} , durante 24 h, com exceção do grupo de controle. Depois disso, 1 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio foram adicionados em cada poço, e o sistema incubado durante 10 min. Após esse período, a lamínula, na qual as células se encontravam aderidas, foi transferida para uma lâmina onde foi selada e as respectivas imagens foram adquiridas no microscópio Zeiss modelo Axiovert 200.

4. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS

4.1. Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados nas sínteses apresentadas neste trabalho foram; isatina (Aldrich), perclorato de cobre(II) hexahidratado (Aldrich), perclorato de zinco(II) hexahidratado (Aldrich), etanol (Merck), metanol (Merck), trietilamina (Merck), ácido clorídrico (Synth) dimetilsulfóxido (Synth), 2-aminoetilpiridina (Aldrich) e 1,3-diaminopropano (Aldrich).

4.2. Sínteses dos ligantes e complexos metálicos

Os ligantes e os correspondentes complexos de cobre e zinco foram sintetizados por reação de condensação das aminas 1,3-diaminopropano (pn) ou 2-aminoetilpiridina (epy) com o indol isatina (isa), sendo no caso dos complexos seguidos pela coordenação aos íons de cobre(II) ou zinco(II), adicionados na forma de perclorato ou cloreto. Os procedimentos repetiram protocolos desenvolvidos em nosso laboratório.

Ligante isapn

Dissolveu-se 10.3 mmols (1,51 g) da isatina em 50 mL de etanol e, em seguida, adicionou-se lentamente 5 mmols (0,42 mL, 74,12g/mol, 0,888g/mL) de 1,3 propanodiamina (pn), previamente diluída em 10 mL de etanol. O pH aparente da solução foi ajustado para 6, com algumas gotas de HCl concentrado, deixando a solução em agitação por 3 h, em temperatura ambiente. Após este período, um sólido amarelo foi formado, sendo rapidamente filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado. Nesta síntese obteve-se um rendimento de 73%.

FIG. 9. Representação da síntese do composto isapn partindo de isatina e 1,3 – propanodiamina na proporção 2:1, em etanol.

Complexo [Cu(isapn)](ClO₄)₂ **1**

Adicionou-se, a 40 mL de metanol, 0,6 mmols (0,20 g) de isapn previamente dissolvido em 500 µL de dimetilsulfóxido, e a seguir ajustou-se o pH aparente da solução para 7 utilizando trietilamina. Em seguida, foi adicionado a esta solução 0,6 mmols (0,22 g) de perclorato de cobre(II) hexahidratado previamente diluído em 500 µL de água. A solução foi mantida sob agitação por 3 h em temperatura ambiente. Após este período, um sólido marrom escuro foi formado, sendo filtrado e lavado com metanol e éter etílico gelado. Nesta síntese, obteve-se um rendimento de 77% (58).

FIG. 10. Representação da síntese do composto [Cu(isapn)](ClO₄)₂ partindo do isapn e de perclorato de cobre(II) hexahidratado na proporção 1:1 em metanol.

Complexo [Zn(isapn)](ClO₄) **2**

A 40 ml de metanol, adicionou-se 0,6 mmols (0,20 g) de isapn previamente dissolvido em 500 µL de dimetilsulfóxido, após isto o pH aparente da solução foi ajustado para 7 utilizando trietilamina. Posteriormente, 0,6 mmols (0,22 g) de perclorato de zinco(II) hexahidratado previamente diluído em 500 µl de água foi adicionado lentamente a esta solução. A qual foi mantida sob agitação por 3 h em

temperatura ambiente. Um sólido marrom claro precipitou, sendo este filtrado e lavado com metanol e éter etílico gelado. Obteve-se um rendimento de 33% (59).

FIG. 11. Representação da síntese do composto $[Zn(isapn)](ClO_4)$ partindo do isapn e de perclorato de zinco(II) hexahidratado na proporção 1:1 em metanol.

Complexo $[Cu(misapn)H_2O](ClO_4)$ 3

Solubilizou-se 11 mmols (0,92 mL, 74,12g/mol, 0,888g/mL) de 1,3 propanodiamina em 60 ml de metanol, adicionou-se lentamente 10 mmols (3,70 g) de perclorato de cobre(II) hexahidratado previamente dissolvido em metanol. Deixou-se a reação ocorrer por 10 min sob agitação em temperatura ambiente. Após este tempo, foi adicionado 10 mmol (1,47 g) de isatina. A solução foi mantida sob agitação por 3 h, novamente, em temperatura ambiente. Por fim, um sólido marrom formou-se o qual foi rapidamente filtrado e lavado com metanol e éter etílico gelado. Nesta síntese obteve-se um rendimento de 67%.

FIG. 12. Representação da síntese do composto $[Cu(misapn)H_2O](ClO_4)$ partindo do 1,3-propanodiamina, do perclorato de cobre(II) hexahidratado e da isatina na proporção 1:1:1 em metanol.

Complexo $[Zn(misapn)Cl_2]$ 4

Em metanol, foi dissolvido 11 mmols (0,92 mL, 74,12g/mol, 0,888g/mL) de 1,3 propanodiamina e, em seguida, lentamente foi adicionado 10 mmols (3,72 g) de cloreto de zinco(II) previamente dissolvido em metanol. Após esperar a reação ocorrer por 10 min sob agitação, em temperatura ambiente, 10 mmols (1,47 g) de isatina foi misturado a solução. Esta foi mantida sob agitação por 3 h em temperatura ambiente, sendo formado um solido laranja que foi rapidamente filtrado e lavado com metanol e éter etílico gelado, alcançando um rendimento de 81%.

Figura 13. Representação da síntese do composto $[Zn(misapn)Cl_2]$ partindo do 1,3 – propanodiamina, de cloreto de zinco e da isatina na proporção 1:1:1 em metanol.

Ligante *isaepy*

5 mmols (0,74 g) de isatina foi solubilizado em 50 ml de etanol, o pH aparente desta solução foi ajustado para 5,5 com HCl concentrado, após isto foi adicionado, lentamente, a esta solução 6 mmols (0,73 mL, 122,17 g/mol, 1021 g/mL) de 2-aminoetilpiridina. A solução foi mantida sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. Houve a formação de um sólido amarelo claro que foi rapidamente filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado. Nesta síntese, foi obtido um rendimento de 34%.

FIG. 14. Representação da síntese do composto isaepy partindo do 2-aminoetilpiridina e da isatina na proporção 1:1 em etanol.

Complexo [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) 5

Em 20 ml de etanol, foi dissolvido 0,4 mmols (0,10 g) de isaepy, ajustou-se o pH aparente da solução para 7 utilizando trietilamina. Em seguida, foi adicionado lentamente 0,4 mmols (0,15 g) de perclorato de cobre(II) hexahidratado previamente dissolvido em 500 µl de água, mantendo a agitação constante por 1 h em temperatura ambiente. Após este período, precipitou-se um sólido marrom esverdeado, o qual foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado, obtendo um rendimento de 55% (60).

FIG. 15. Representação da síntese do composto [Cu(isaepy)H₂O](ClO₄) partindo do Isaepy e do perclorato de cobre(II) hexahidratado na proporção 1:1 em etanol.

Complexo [Zn(isaepy)₂](ClO₄)₂ 6

Em seguida a dissolução de 0,4 mmols (0,10 g) de isaepy em 20 ml de etanol o pH aparente da solução foi ajustado para 7 com trietilamina. Após este ajuste, 0,4 mmols (0,15 g) de perclorato de zinco(II) hexahidratado previamente dissolvido em 500 µl de água foi adicionou lentamente. Na intenção de deixar a reação ocorrer a solução foi mantida em agitação constante por 1 h em

temperatura ambiente. Formou-se um solido laranja, o qual foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado. Nesta síntese, obteve-se um rendimento de 53%.

FIG. 16. Representação da síntese do composto $[Zn(isaepy)_2](ClO_4)_2$ partindo do isaepy e do perclorato de zinco(II) hexahidratado na proporção 1:1 em etanol.

Nos ensaios realizados neste trabalho, foram utilizados os compostos supracitados os quais foram sintetizados e caracterizados por mim. Os complexos $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$ e $[Zn(isaepy)]^{2+}$ foram cedidos graciosamente pelo Dr. Ricardo A. Couto, também componente de nosso grupo de pesquisa.

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS

Análise elementar: microanálises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química, usando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400. O equipamento permite uma determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%.

Espectroscopia Eletrônica na Região do UV-Vis: Os espectros na região de UV-Vis foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu, mod. UV-1601PC de varredura de 100 – 1000 nm.

Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR): Os espectros vibracionais foram obtidos na região do infravermelho entre 4000 - 400 cm^{-1} em pastilha de KBr previamente seco em estufa a 120°C. Os espectros foram coletados com uma resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 64 varreduras em média em um equipamento espectrofotômetro ABB BOMEM, modelo MB com transformada de Fourier.

4.3.1. ANÁLISE ELEMENTAR

Os teores de CHN dos ligantes e dos complexos foram analisados e os valores experimentais foram confrontados com os calculados. Estes valores estão apresentados na tabela 1. Os resultados experimentais foram condicentes com os calculados para as estruturas propostas.

TABELA 5. Análises elementares das porcentagens de C, H e N.

Formula mínima	% (C / H / N)	
	Calculado	Experimental
Isapn (C ₁₉ H ₁₆ N ₄ O ₂) MM = 332,36	68,66/ 4,85/ 16,85	68,37/ 4,61/ 16,73
[Cu(isapn)](ClO₄)₂·3H₂O 1 (C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ CuN ₄ O ₁₃) MM = 646,83	35,28/ 3,12/ 8,66	35,53/ 3,33/ 8,10
[Zn(isapn)](ClO₄)·H₂O 2 (C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ O ₇ Zn) MM = 514,19	44,38/ 3,33/ 10,98	44,61/ 3,40/ 10,97
[Cu(misapn)H₂O](ClO₄)·H₂O 3 (C ₁₁ H ₁₇ ClCuN ₃ O ₇) MM = 402,27	32,85/ 4,26/ 10,44	32,64/ 4,31/ 10,25
[Zn(misapn)Cl₂] 4 (C ₁₁ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ OZn) MM = 339,53	38,91/ 3,86/ 12,37	38,06/ 3,69/ 11,68
Isaepy (C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₁) MM = 251,28	71,70/ 5,21/ 16,72	70,85/ 5,24/ 16,43
[Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄)·2H₂O 5 (C ₁₅ H ₁₈ ClCuN ₃ O ₈) MM = 467,32	38,56/ 3,88/ 8,99	38,50/ 3,04/ 8,81
[Zn(isaepy)₂](ClO₄)₂ 6 (C ₃₀ H ₂₄ Cl ₂ N ₆ O ₁₀ Zn) MM = 764,83	47,11/ 3,16/ 10,99	46,91/ 3,55/ 11,03

4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

Realizou-se a análise por espectroscopia na região do infravermelho, sendo os espectros vibracionais dos compostos registrados na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , a partir de pastilhas preparadas por homogeneização e prensagem da amostra em KBr anidro.

Os espectros na região do infravermelho do isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ estão representados na figura 17.

A) Ligante isapn

B) $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ 1

C) $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ 2

FIG. 17. Espectro na região do infravermelho. A) isapn. B) $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ C) $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$.

Os espectros na região do infravermelho do $[\text{Cu}(\text{misapn})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$ estão representados na Figura 18.

D) $[\text{Cu}(\text{misapn})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ 3

E) $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$ 4

FIG. 18. Espectros na região do infravermelho. D) $[\text{Cu}(\text{misapn})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$; E) $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$.

Os espectros na região do infravermelho do isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ estão representados na Fig. 19.

F) Ligante isaepy

G) [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) 5

H) [Zn(isaepy)₂](ClO₄)₂ 6

FIG. 19. Espectros na região do infravermelho. F) isaepy; G) [Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄)₂ 5; H) [Zn(isaepy)₂](ClO₄)₂ 6.

Os espectros no infravermelho dos compostos analisados apresentaram as bandas características dos grupos C=O, C=N, O-H, CH e do ânion ClO₄⁻.

Foi possível observar as bandas referentes ao estiramento do grupo C=O das lactamas cíclicas de anel com cinco membros na região de 1700 e 1750 cm⁻¹ na maioria dos compostos. As bandas associadas ao estiramento C=N, características das bases de Schiff, na faixa de 1585 a 1665 cm⁻¹, estão presentes nos espectros de todos os compostos.

As bandas de grande intensidade em torno de 3400 cm⁻¹ atribuídas aos estiramentos do O-H da água de hidratação ou que se encontra na esfera de coordenação, não foi visível apenas no espectro do isaepy.

Os espectros dos compostos, com exceção do $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$ e do $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$, apresentam bandas referentes aos estiramentos do C-H dos grupos CH, CH₂ e CH₃ alifáticos e CH aromáticos na região de 3070 a 2850 cm⁻¹.

No caso dos complexos, também foi possível notar as bandas referentes ao estiramento e à deformação do ânion ClO₄⁻ em torno de 1095 e de 625 cm⁻¹, confirmam a sua presença como contra íon nos complexos.

As atribuições das principais bandas observadas nos espectros vibracionais FTIR dos compostos analisados estão descritas na Tabela 6.

TABELA 6. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros vibracionais dos compostos sintetizados, neste trabalho.

Compostos	δ ClO_4^- v ClO_4^-	VN-H γ -lactama	$\delta_{\text{C-H}}$	$\text{V}_{\text{C-O}}$ Carbonila	$\text{V}_{\text{C-N}}$ amida	νCH_2 - νCH_3	$\text{V}_{\text{C}=\text{C}}$ e $\text{C}=\text{N}$ imina e aromáticos	$\text{V}_{\text{C}=\text{O}}$ γ - lactama	$\text{V}_{\text{C-H}}$ alifático e aromático	$\text{V}_{\text{N-H}}$ amida secundária	$\text{V}_{\text{O-H}}$ água solvente
Isapn	-	724	937 1027	1203	-	1330	1467 1605 1660	1720 1753	2966	3231	-
$[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$	-	730	927 1027	1203	-	1336	1464 1608 1660	1715 1741	2998	3227	-
$[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$	-	737	865 961 1014	1249	-	1344	1456 1621 1659	1733	2937	3267	-
$[\text{Cu}(\text{misapn})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$	-	748	865 966	1201	-	1323	1472 1616	1738	2937	3267* 3326*	-
$[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$	-	-	822, 988 934, 988	1211 1265 1286	1323	-	1416 1477 1585 1669	-	2937 2968	3240 3293	-
Isaepy	(616) (1090)	-	-	1259	-	1319 1365	1436 1486 1602 1629	-	-	-	3433
$[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$	(615) (1087)	-	-	1259	-	1319 1366	1447 1491 1590 1640	-	-	-	3423
$[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$	(630) (1086)	-	-	1259	-	1317	1441 1493 1603	--	-	-	3426

TABELA 7. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros vibracionais dos compostos sintetizados por ex-alunos do laboratório parte 1.

Ref.	Compostos	δ ClO_4^- v ClO_4^-	$\delta_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C-O}}$ Carbonila	$\nu_{\text{O-H}}$ enol coordenado ao metal	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$ e $\text{C}=\text{N}$ imina e aromáticos	$\nu_{\text{C=O}}$ γ - lactama	$\nu_{\text{C-H}}$ alifático e aromático	$\nu_{\text{N-H}}$ amida secundária	$\nu_{\text{O-H}}$ água solvente
(61)	isaepy	-	743	-	-	1465 1614 1650	1737	-	-	-
(60)	$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2\text{O}][\text{ClO}_4]$	1120 625	-	-	1694	1460 1614	-	-	-	-
(61)	$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$	1091	756	-	-	1448 1579 1647	1731	-	-	-
(62)	$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$	1094 624	-	1444	-	1574 1614	1725	3081 2995	3354	3438
(61)	$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$	1090	750	-	-	1452 1575 1639	1730	-	-	-
(61)	$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$	-	750	-	-	1452 1575 1639	1735	-	3205	3469
(61)	$[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$	1091	757	-	-	1452 1596 1650	1726	-	-	-

TABELA 7. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros vibracionais dos compostos sintetizados por ex-alunos do laboratório parte 2.

	Composto s	δ ClO_4^- v ClO_4^-	$\delta_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C-O}}$ Carbonila	$\nu_{\text{O-H}}$ enol coorden ado ao metal	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$ e $\text{C}=\text{N}$ imina e aromáticos	$\nu_{\text{C=O}}$ γ - lactama	$\nu_{\text{C-H}}$ alifático e aromático	$\nu_{\text{N-H}}$ amida secundária	$\nu_{\text{O-H}}$ água solvente
(61)	Isapn	-	731	-	-	1460 1608 1649	1745	-	3226	-
(58)	$[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$	1102 625	-	1459	1665	1591 1616	1734	2774 3102	3334	3447
(61)	$[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$	1097	759	-	-	1446 1593 1637	1731	-	-	-
(61)	$[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$	1103	754	-	-	1454 1593 1635	1724	-	3350	-

A comparação das bandas observadas nos espectros obtidos através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho neste trabalho permitiu evidenciar a semelhança destas com as obtidas previamente por outros alunos do laboratório da professora Dra. Ana Maria da Costa Ferreira (Laboratório de Bioinorgânica, Catálise e Farmacologia – IQ-USP) , para os mesmos complexos (58) (60) (62) (61).

4.3.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV/VIS)

Devido ao fato de os elétrons em uma ligação química possuírem a capacidade de absorver a radiação eletromagnética na região do UV/Vis quando são transferidos do estado fundamental para um estado excitado e sendo esta absorção dependente da estrutura eletrônica da molécula, é possível utilizar a técnica de espectroscopia na região do UV/Vis com o intuito de retirar informações sobre a estrutura eletrônica dos compostos.

As principais bandas de absorção registradas em um espectro UV-VIS de complexos metálicos são basicamente de três tipos de transições eletrônicas. As absorções na região do ultravioleta estão relacionadas com as transições de transferência de cargas internas dos ligantes, LT. As absorções na região do ultravioleta próximo/visível estão relacionadas com as transições de transferência de carga do ligante para o metal, LMCT e as transições d-d do metal ocorrem na região do visível (63).

Os espectros dos compostos sintetizados foram obtidos em solução de DMSO, sendo posteriormente determinados os respectivos valores de absortividade molar (ϵ).

A) Ligante isapn

B) $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ 1

C) $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ D) $[\text{Cu}(\text{misapn})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_3$

E) $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$ 4

F) Ligante isaepy

G) $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ 5

H) $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ 6

FIG. 20. Espectros na região do UV/Vis dos compostos: A) ligante isapn; B) $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ 1; C) $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})$ 2; D) $[\text{Cu}(\text{misapn})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ 3; E) $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{C}_{12}]$ 4; F) ligante isaepy; G) $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ 5; H) $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ 6.

TABELA 8. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros eletrônicos dos compostos estudados.

Compostos	IL - $\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	LMCT - $\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3$ $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	d-d - $\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
isapn	257 (27,3) 287 (7,88) 385 (2,05)	--	--
[Cu(isapn)](ClO₄)₂ 1	260 (17,8) 291 (10,4)	406 (2,26)	--
[Zn(isapn)](ClO₄) 2	258 (15,9) 292 (5,4) 381 (1,4)	525 (0,302)	--
[Cu(misapn)H₂O](ClO₄) 3	261 (28,4) 308 (5,1)	469 (0,37)	705 (59)
[Zn(misapn)Cl₂] 4	259 (20,2) 302 (4,1)	415 (0,53)	--
isaepy	256 (15,5) 288 (4,4) 386 (1,1)	--	--
[Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) 5	260 (77,8) 308 (9,8)	414 (1,35)	750 (39)
[Zn(isaepy)₂](ClO₄)₂ 6	257 (31,7) 296 (9,0) 356 (3,8)	475 (0,90)	--

Nos espectros eletrônicos obtidos com os ligantes isapn e isaepy foi possível evidenciar as transições internas dos ligantes com comprimento de onda de 257, 287 e 385 nm para o primeiro e 256, 288 e 386 nm para o segundo.

Já os espectros dos complexos, apresentaram as absorções referentes as transições internas dos ligantes com comprimento de onda inferior a 400 nm. Além destas absorções, também, foi possível demonstrar a ocorrência de transições de transferência entre o ligante e o metal com os comprimentos de ondas de 406, 525, 469, 415, 414 e 475 nm para os complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$, $[\text{Cu}(\text{misapn})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)$, $[\text{Zn}(\text{misapn})\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, respectivamente. Ademais, para os complexos $[\text{Cu}(\text{misapn})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$, ainda, foi demonstrado a ocorrência de transições d-d do metal em 705 e 750 nm, respectivamente.

TABELA 9. Atribuições das principais bandas observadas nos espectros eletrônicos dos compostos sintetizados por ex-alunos do laboratório.

Compostos (Solvente)	IL - $\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	LMCT - $\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	d-d - $\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Ref.
Isapn (DMSO)	259 ($1,13 \times 10^4$) 291 ($6,86 \times 10^3$) 387 ($2,31 \times 10^3$)			(61)
[Cu(isapn)](ClO ₄) ₂ (Água, pH5,5)	242 ($5,12 \times 10^3$)	303 ($2,71 \times 10^3$) 4,34 ($1,55 \times 10^3$)		(58)
[Cu(isapn)](ClO ₄) ₂ (Acetonitrila)			688 (151,1)	(58)
[Cu(isapn)](ClO ₄) ₂ (DMSO)	258 ($2,85 \times 10^4$)			(61)
[Zn(isapn)](ClO ₄) (DMSO)	261 ($1,48 \times 10^4$) 297 ($5,30 \times 10^3$) 391 ($1,27 \times 10^3$)			(61)
Isaepy (DMSO)	258 ($1,28 \times 10^4$) 289 ($4,16 \times 10^3$) 386 ($1,29 \times 10^3$)			(61)
[Cu(isaepy)H ₂ O]ClO ₄ DMSO)	242 ($1,64 \times 10^4$) 247 ($1,47 \times 10^4$) 260 ($9,67 \times 10^3$)	301 ($4,83 \times 10^3$)		(60)
[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂	242 ($1,90 \times 10^4$) 247 ($1,68 \times 10^4$) 260 ($8,39 \times 10^3$)	301($4,01 \times 10^3$)		(62)
[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ (Água, pH 6,0)	206 ($1,28 \times 10^4$) 247 ($5,57 \times 10^3$)	406 ($1,15 \times 10^3$)		(58)
[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ (DMSO)	261 ($3,34 \times 10^4$)			(61)
[Zn(isaepy)Cl ₂] (DMSO)	258 ($1,52 \times 10^4$) 295 ($6,91 \times 10^3$) 356 ($3,04 \times 10^3$)			(61)
[Zn(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ (DMSO)	258 (258×10^4) 294 ($9,77 \times 10^3$) 328 ($5,75 \times 10^3$) 345 ($5,46 \times 10^3$)	517 ($1,59 \times 10^3$)		(61)

Os espectros eletrônicos obtidos estão de acordo com o esperado para os compostos sintetizados, sendo que estes ligantes e complexos já haviam sido sintetizados e caracterizados, em trabalhos prévios do grupo da professora Ana Maria da Costa Ferreira (Laboratório de Bioinorgânica, Catálise e Farmacologia – IQ-USP), conforme as referências citadas.

4.3.4. Caracterização por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Em estudos prévios, em nosso grupo de pesquisa, os complexos de cobre(II) aqui focalizados foram caracterizados também por espectroscopia EPR. Assim, na Tabela 3.4. são mostrados os parâmetros para esses compostos em solução congelada a 77K.

Através desta técnica, pode-se determinar o estado de oxidação do íon metálico e a configuração estrutural ao seu redor, providenciada pelos ligantes (59).

TABELA 8 – Parâmetros espectroscópicos obtidos de espectros EPR dos complexos de cobre(II) estudados (59).

Compostos	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//},$ G	$A_{//},$ 10^{-4} cm^{-1}	$g_{//}/A_{//},$ cm
[Cu(isapn)](ClO₄)₂ 1 Em pH=7	2.256	2.112	186.5	196	115
[Cu(misapn)H₂O](ClO₄) 3 Em pH=7	ND	ND	ND	ND	ND
[Cu(isaepy)(H₂O)](ClO₄) 5 Em pH=7	2.246	2.058	172.6	181	124

O valor da relação $g_{//}/A_{//}$ é utilizado para obter informação da geometria ao redor do metal, sendo quando mais próximo de 100 um indicativo de uma geometria quadrado planar ou tetragonal ou quando entre 170 e 250 indica a geometria tetraédrica (64).

A partir destes dados obtidos com esta técnica, verifica-se que, em pH 7, os compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ apresentam uma geometria, predominantemente, quadrado planar ou tetragonal na vizinhança do Cu(II), sendo o $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ ligeiramente mais planar. Os parâmetros para o complexo $[\text{Cu}(\text{misapn})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)$ não foram determinados.

5. ENSAIOS *IN VITRO*

Na verificação das propriedades dos complexos de cobre(II) e de zinco(II) em meio biológico, foram realizados vários estudos. Constatou-se que esses complexos são capazes de inibir quinases dependentes de ciclinas (CDK1) e, em menor extensão, fosfatases alcalinas.

5.1. EFEITOS DOS COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE CICLINA, CDK1.

Com o intuito de determinar a capacidade de inibição da atividade da quinase CDK1 pelos compostos, foi realizado ensaio de fosforilação *in vitro*. O complexo humano CDK1/ciclina B foi incubado com γ -³²P-ATP e com a histona humana H1, na presença ou ausência dos compostos. Após a incubação por 45 minutos em 30° C, a amostra proteica foi desnaturada e analisada por SDS-PAGE.

A intensidade das bandas demonstra que a fosforilação da histona H1 sofre pouca influência do ligante isapn e do complexo [Zn(isapn)]⁺, indicando que estes compostos possuem pouca capacidade de inibir a atividade da ciclina CDK1. Todavia, na presença de 5 ou 50 μ M de [Cu(isapn)]²⁺ e [Cu(isaepy)]⁺ ou 50 μ M de [Zn(isaepy)]²⁺ ocorre uma significativa queda na fosforilação de histona H1. Portanto, a atividade da quinase é inibida em níveis diferentes por estes complexos (59).

A) Isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$ e $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$ B) $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ e $[\text{Cu(isaepy)}]^+$

FIG. 21. Inibição da atividade quinase do complexo CDK1- ciclina B pelos compostos indicados. A) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo CDK1- ciclina B, na presença e na ausência de 5 ou 50 μM de isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$ ou $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$ e quantificação das bandas usando ImageJ. B) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo CDK1- ciclina B, na presença e na ausência de 5 ou 50 μM de $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ ou $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e respectiva quantificação das bandas usando ImageJ.

Tendo notado a maior atividade inibitória por parte do complexo $[\text{Cu(isaepy)}]^+$, buscou-se demonstrá-la com maior detalhamento. Com este intuito, foi realizado um novo ensaio no qual foi utilizada uma maior diversidade de concentrações (5, 25, 30, 50, 75 ou 100 μM) deste complexo.

FIG. 22. Inibição da atividade quinase do complexo CDK1- ciclina B pelo complexo [Cu(isaepy)]⁺. A) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo CDK1- ciclina B, na presença e na ausência de 5, 25, 30, 50, 75 ou 100 μM de [Cu(isaepy)]⁺. B) Quantificação das bandas usando ImageJ.

Este segundo teste confirmou a atividade inibidora do complexo CDK1- ciclina B por esta classe de compostos. Todavia, é importante destacar que neste ensaio foi necessário utilizar uma maior concentração do complexo para obter o mesmo efeito inibitório observado no primeiro teste. Este fato, provavelmente, se deveu à diferença na concentração da CKD1 utilizada em cada ensaio. Usamos proteínas de fornecedores diferentes, Biolabs no primeiro caso (Fig. 21.) e life technologies no segundo (Fig. 22.). O primeiro fabricante deixou de produzir a proteína, que era caracterizada em unidades de atividade, foi utilizado 1 unidade de atividade por reação, e assim tivemos que obter este reagente de outra fonte. No segundo caso, a quantidade da proteína é expressa em ng, sendo utilizado 100 ng por reação. Assim, aparentemente as concentrações diferentes da enzima resultaram em proporções diferentes entre a proteína e o complexo de cobre, tornando os resultados dos testes não-comparáveis.

5.2. EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

Visando determinar se a atividade dos compostos é específica para a CDK1, foi realizado a análise sobre a atividade de desfosforilação da fosfatase alcalina sobre a histona H1. Com este objetivo, a histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo ciclina B-CDK1, seguido da desfosfolilação pela fosfatase alcalina

na presença ou ausência de 5 ou 50 μM dos compostos Isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ foi desnaturada e analisada por SDS-PAGE.

Ao realizar a comparação da intensidade das bandas na presença ou ausência dos compostos, é possível notar que os compostos não inibem significativamente a atividade da fosfatase alcalina.

A) Ligante isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$

B) Quantificação das atividades relativas de desfosforilação da fosfatase alcalina

FIG. 23. Inibição da atividade da fosfatase alcalina na presença do isapn, [Zn(isapn)]⁺, [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isaepy)]²⁺ ou [Cu(isaepy)]⁺. A) SDS-PAGE da histona H1 radioativa após a fosforilação pelo complexo ciclina B- CDK1 seguido de desfosforilação pela fosfatase alcalina na presença ou ausência de 5 ou 50 µM de isapn, [Zn(isapn)]⁺, [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isaepy)]²⁺, ou [Cu(isaepy)]⁺; B) Atividade relativa de desfosforilação da fosfatase alcalina medida pela quantificação das bandas da histona H1 que permanecem fosforiladas em A.

Além da análise da atividade da fosfatase alcalina por SDS-PAGE, também, foi realizada a análise desta por cromatografia em camada fina (TLC) após o fim da reação. Neste ensaio foi separado γ -³²P -ATP do ³²Pi liberado pela hidrólise da ³²P-histone H1.

O resultado deste ensaio, conforme esperado, apresenta o ³²Pi apenas nas reações que continham a fosfatase alcalina. E, confirmando os dados obtidos no teste anterior, mostrou praticamente nenhuma diferença na quantidade de ³²Pi após a incubação com a fosfatase na presença ou ausência dos compostos. Ou seja, reforça que estes compostos apresentam pouca atividade sobre a fosfatase alcalina, sendo, portanto, específicos para a CDK1.

C) Cromatografia em camada fina (TLC)

FIG. 24. Inibição da atividade da fosfatase alcalina na presença do isapn, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$ ou $[\text{Cu(isaepy)}]^+$. A) Reação realizada como descrito na fig. 23 sendo analisada por TLC para a separação de excesso de $^{32}\text{P-}\gamma\text{-ATP}$ do ^{32}Pi liberado após a hidrólise do $^{32}\text{P-}\gamma\text{-ATP}$ ou ^{32}P -histona H1 pela fosfatase alcalina.

5.3. CURVA DE DESNATURAÇÃO DE DNA e RNA EM PRESENÇA DOS COMPLEXOS

Estes experimentos foram feitos com a colaboração da Profa. Carla Columbano de Oliveira (Departamento de Bioquímica, IQ-USP).

Tendo ciência de que o cobre apresenta alta afinidade pelo DNA (36), sendo capaz de se coordenar ao nitrogênio N7 do da guanina (37), intendeu se examinar a capacidade de o complexos $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ de interagir com o DNA ou com o RNA de levedura.

Nesta análise, foi evidenciado que a temperatura de desnaturação do DNA na presença e ausência do $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ sofre pouca alteração quando o complexo se encontra nas concentração 50, 100, 200 μM quando comparado com a temperatura dos controles com água ou com 2% de DMSO. Entretanto, ocorreu uma grande queda neste parâmetro quando o composto está na concentração de 250 μM .

Além disso, foi possível acompanhar a diminuição da fluorescência do SYBR Green como consequência do aumento da concentração do complexo em ambos os biopolímeros. Devido ao fato de a fluorescência do SYBR Green ser dependente da sua intercalação, a diminuição desta indica que o complexo intercala nos biopolímeros, impedindo que o marcador realize esta ação. Portanto, o ensaio evidenciou a capacidade do $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ de intercalar tanto em DNA quanto em RNA.

Ademais, é notável a mudança do padrão de emissão apresentado pelo SYBR Green no ensaio com o DNA quando o complexo se encontra na concentração de 250 μM . Esta mudança indicou a ocorrência de clivagem no material genético.

Visando comprovar a ocorrência da clivagem, após o ensaio, o DNA foi coletado após a análise da temperatura de desnaturação e, em seguida, foi realizado uma corrida de eletroforese com ele. Neste ensaio, é nítido a diminuição da intensidade de emissão das bandas nas maiores concentrações do complexo, confirmando a clivagem do DNA.

TABELA 9. Temperatura de desnaturação do DNA na presença ou ausência do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ em diversas concentrações.

	Temperatura de desnaturação
H_2O	79,3 °C
2% DMSO	76,4 °C
$[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ 50 μM	76,6 °C
$[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ 100 μM	76,7 °C
$[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ 200 μM	77,5 °C
$[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ 250 μM	29,4 °C

A) DNA

FIG. 25. Temperatura de desnaturação do DNA na presença ou ausência do [Cu(isaepy)]⁺. A) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no DNA na ausência ou presença de [Cu(isaepy)]⁺ nas concentrações de 50, 100, 200 ou 250 µM. B) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no RNA na ausência ou presença de [Cu(isaepy)]⁺ nas concentrações de 50 ou 100 µM.

B) RNA

FIG. 26. Temperatura de desnaturação do RNA na presença ou ausência do [Cu(isaepy)]⁺. A) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no DNA na ausência ou presença de [Cu(isaepy)]⁺ nas concentrações de 50, 100, 200 ou 250 μ M. B) Intensidade da fluorescência do SYBR Green intercalado no RNA na ausência ou presença de [Cu(isaepy)]⁺ nas concentrações de 50 ou 100 μ M.

FIG. 27. Eletroforese em gel com DNA, na presença ou ausência do $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. Nas várias colunas tem-se bandas do marcador de DNA, SYBR Green, do grupo controle, na presença de 2 % de DMSO ou do $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ nas concentrações de 50, 100, 200 ou 250 μM .

5.4. ENSAIO COM CARBOXIFLUORESCEÍNA

Estando interessado em obter informação sobre a capacidade dos complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ em desestruturar membranas lipídicas que mimetizam as membranas celulares, foi realizado o ensaio com a sonda fluorescente carboxifluoresceína encapsulada nos fosfolípídios *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, produzindo vesículas neutras, ou *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)*, gerando vesículas com carga negativa.

Este teste evidenciou que os complexo testados na faixa de concentração de 20 a 50 μM não apresentaram efeito sobre as vesículas com carga negativa, as quais são constituídas por POPG. Quando se trata das vesículas de POPC, as

quais são neutras, a atividade dos complexos sobre elas continua pequena. Todavia, é necessário dar destaque para o complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, o qual na concentração de $50\ \mu\text{M}$ causou um pequeno dano, causando a liberação de, aproximadamente, 10% da carboxifluoresceína, após 120 min de incubação e evidenciou uma tendência no aumento desta liberação, indicando que seja necessário realizar este teste por um tempo maior para obter informações mais completas desta capacidade.

A) Vesículas constituídas por 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (POPG)

FIG. 28. Atividade do complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ sobre vesículas fosfolipídicas. A) Gráfico da intensidade de fluorescência emitida pela carboxifluoresceína liberada de vesículas constituídas por 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholine, sob a influência dos complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^+$.

B) Vesículas constituídas por 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC)

FIG. 29. Atividade dos complexos $[Cu(isapn)]^{2+}$, $[Zn(isapn)]^{+}$, $[Cu(isaepy)]^{+}$ e $[Zn(isaepy)]^{2+}$ sobre vesículas fosfolipídicas. Gráfico da intensidade de fluorescência emitida pela carboxifluoresceína liberada de vesículas constituídas por 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), sob a influência dos complexos $[Cu(isapn)]^{2+}$, $[Zn(isapn)]^{+}$, $[Cu(isaepy)]^{+}$ e $[Zn(isaepy)]^{2+}$.

6. ENSAIOS *IN CELLULO*

Também foram realizados vários ensaios *in cellulo* com os complexos estudados, visando caracterizar suas interações com biomoléculas e estruturas no meio biológico e assim elucidar melhor seus prováveis modos de ação, que explicassem suas propriedades antitumorais.

6.1. ENSAIOS *IN CELLULO* COM CÉLULAS HELA

6.1.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA E FIBROBLASTO P4

Visando evidenciar a citotoxicidade dos complexos e obtermos os respectivos valores de IC₅₀ desses compostos frente a HeLa e o Fibroblasto P4, foi realizado o ensaio de MTT. Os resultados mostraram que os ligantes, isapn e isaepy, os complexos de Zn, [Zn(isapn)]⁺, [Zn(misapn)]²⁺, [Zn(isaepy)]²⁺ e [Zn(isaepy)₂]²⁺, e o complexo de Cu com o ligante misapn, [Cu(misapn)H₂O]¹⁺, não apresentaram citotoxicidade na faixa de concentração testada. Ao passo que os complexos de cobre com os ligantes isapn e isaepy foram capazes de desencadear a morte das células. Evidenciando a importância do cobre e a influência do ligante para a atividade citotóxicas dos compostos.

Além disso, ao analisar todos os valores obtidos é possível notar que os complexos de cobre que possuem o isaepy como ligante são mais citotóxicos do que os demais complexos. Entretanto, o complexo de cobre ligado a dois ligantes isaepy ([Cu(isaepy)₂]²⁺) apresentou pouca seletividade para a célula tumoral quando comparada ao Fibroblasto P4.

TABELA 10. Valores de IC₅₀ dos vários compostos estudados para as linhagens tumorais HeLa e para a linhagem não tumoral fibroblasto P4.

	HeLa (μM)	Fibroblastos P4 (μM)
Ligante isapn	>100	
[Cu(isapn)]²⁺ 1	82,3 ± 1,5	>100
[Zn(isapn)]⁺ 2	>100	
[Cu(misapn)]⁺ 3	>100	
[Zn(misapn)]²⁺ 4	>100	
Ligante isaepy	>100	
[Cu(isaepy)]⁺ 5	19,2 ± 2,1	51,2 ± 1,5
[Cu(isaepy)₂]²⁺	10,9 ± 0,8	15,6 ± 1,1
[Zn(isaepy)]²⁺ 6	>100	
[Zn(isaepy)₂]²⁺	>100	

6.1.2. IMAGEM ÓPTICA DAS CÉLULAS HeLa

Na busca por evidenciar modificações morfológicas nas células na após o tratamento com os complexos por 24h na concentração do IC₅₀, imagens ópticas das células foram capturadas. Estas imagens evidenciam que os ligantes isapn e isaepy não apresentam modificações significativas na morfologia das células. Enquanto que a imagem das expostas ao complexo [Zn(isapn)]⁺ mostraram algumas células mortas e a das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺ permitiram que fosse visualizado um grande aumento na quantidade de vacúolos nas células. Ao passo que as imagens das células tratadas com os complexos de cobre evidenciam uma grande quantidade de células mortas.

FIG. 30. Imagem óptica das células HeLa expostas por 24h aos compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ na concentração de IC₅₀ e dos controles na ausência de estímulos ou com 2% de DMSO.

6.1.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE E ZINCO NOS LISADOS CELULARES

Na intenção de determinar o cobre e do zinco presentes nos lisados celulares foi utilizado a espectroscopia de fluorescência de raio X de reflexão total (TXRF) (53), sendo o valor obtido, normalizado pela quantidade de proteína presente neste material. A quantidade de proteína foi evidenciada pelo protocolo de Bradford (54).

As concentrações de cobre e zinco obtidas para as células HeLa que não receberam tratamento: $(0,020 \pm 0,002 \text{ ng Cu}/\mu\text{g proteína})$ e $(0,36 \pm 0,005 \text{ ng Zn}/\mu\text{g proteína})$, respectivamente, se encontram abaixo dos valores apresentados na

literatura pelo artigo de González e colaboradores, o qual evidenciou a presença de $0,32 \pm 0,03$ nmols de Cu/mg de proteína e $5,53 \pm 0,09$ nmols de Zn/mg de proteína (65).

Os valores das concentrações desses metais de transição após a incubação por 24h dos complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ nos IC_{50} demonstraram que os complexos de cobre aumentaram a concentração desse metal no interior da célula em 17,3 e 10,3 vezes, respectivamente, enquanto que para o complexo de zinco $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ a incubação resultou em um aumento de apenas 2,3 vezes na concentração de zinco e o tratamento com o $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ alterou muito pouco a concentração desse metal na célula, conforme mostrado na Tabela 11.

Comparativamente, os complexos com o ligante isaepy aumentam mais a concentração dos metais no interior da célula do que os complexos com o ligante isapn. Este dado indica que os complexos com o ligante isaepy entram em maior quantidade nas células HeLa do que os com o ligante isapn. Portanto, o resultado deste teste evidencia que a natureza do ligante influencia na capacidade de o complexo entrar nas células.

TABELA 11. Concentração de cobre e zinco no lisado de células HeLa, na ausência ou em presença dos complexos.

	Conteúdo de Cu (ng Cu/μg proteína)	Conteúdo de Zn (ng Zn/μg proteína)
Controle	0,007 $\pm$ 0,001	0,059 $\pm$ 0,002
Células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺ 4	0,121 $\pm$ 0,012	0,067 $\pm$ 0,002
Células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺ 5	0,007 $\pm$ 0,001	0,138 $\pm$ 0,018
Células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺ 1	0,072 $\pm$ 0,003	0,069 $\pm$ 0,002
Células tratadas com [Zn(isapn)]⁺ 2	0,007 $\pm$ 0,001	0,071 $\pm$ 0,006

6.1.4. CICLO CELULAR

Sabendo que os complexos apresentavam a capacidade de inibir a atividade do complexo CDK1-ciclina B, o qual age na passagem de G2 para M no ciclo celular (66), buscou-se aprofundar o conhecimento do efeito destes complexos metálicos sobre o ciclo celular. Com este ensaio, tornou se evidente que o tratamento das células com [Cu(isapn)]²⁺ e com [Cu(isaepy)]⁺ resultaram em um aumento na quantidade de células que se encontram em G2/M quando comparada ao controle. Uma porcentagem de 25,00 $\pm$ 1,10 células do grupo

controle se encontrava nesta fase do ciclo, enquanto que esta porcentagem subiu para $33,09 \pm 2,40$ no grupo das células tratadas com o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e para $34,01 \pm 3,10$ nas expostas ao $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, evidenciando a parada do ciclo celular nesta fase para as células tratadas com o complexos de cobre. Condizendo com os dados prévios que demonstraram a capacidade destes compostos de inibir a atividade do complexo ciclina B-CDK1 (59). Portanto, o acúmulo de células na fase G2/M pode ser consequência da inibição desta quinase.

A) Controle

B) 2% DMSO

C) 100 μM isapn

D) 80 μM $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$

E) 100 μM $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$

F) 100 μM isaepy

G) 20 μM $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$

H) 100 μM $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$

Com base nestes dados, construiu-se um Gráfico geral em que se comparou o efeito do tratamento com os compostos **1,2, 5 e 6** sobre as células HeLa.

FIG. 31. Análise do efeito do tratamento por 24 h na concentração de IC₅₀ dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺ 1, [Zn(isapn)]⁺ 2, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ 5 e [Zn(isaepy)]²⁺ 6, sobre o ciclo de células HeLa. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2%DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Histogramas das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Histogramas das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) Gráfico da porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular de todos os grupos testados.

6.1.5. Citometria de fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio

Pretendendo diferenciar se a morte celular desencadeada pelos complexos metálicos ocorria devido a apoptose ou necrose, foi realizada a marcação das células com anexina V (marcador de apoptose) e iodeto de propídio (marcador de necrose), após o tratamento com os compostos isapn, [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺ por 24h, nas respectivas concentrações IC₅₀.

A apoptose pode ser iniciada por estímulos extrínsecos via receptores de morte presentes na membrana celular, como TNF α (fator de necrose tumoral- α) ou pela via intrínseca através da mitocôndria. Nesta via de morte ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a ativação das caspases. Tais eventos levam ao arredondamento das células e ao aparecimento de corpos apoptóticos, vacúolos

contidos em citoplasmas e organelas intactas. A apoptose ocorre tanto em resposta a danos celulares quanto no desenvolvimento normal do organismo (67).

Na necrose, ocorre o inchaço das organelas, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias, a ruptura da membrana plasmática e a lise da célula. A morte por necrose não está associada com a ativação das caspases e é seguida por resposta inflamatória. Este mecanismo de morte ocorre em resposta a danos ou em processos patológicos, porém não durante o desenvolvimento do organismo (67).

A) Controle

B) 2% DMSO

C) 100 μ M isapn

D) 80 μM $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$

E) 100 μM $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$

F) 100 μM isaepy

G) 20 μM $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$

H) 100 μM $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$

FIG. 32. Análise do processo de morte desencadeado pelo tratamento de HeLa por 24 h na concentração do IC50 dos compostos isapn $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2% DMSO. C) Histogramas das

células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$. E) Histogramas das células tratadas com $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. H) Histogramas das células tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$.

Com este ensaio, foi possível confirmar os dados do ensaio de MTT no que tange a importância do cobre para a citotoxicidade dos compostos testados, pois apenas os complexos com este metal desencadearam um aumento significativo no número de células mortas, após o estímulo. Ademais, este teste permitiu evidenciar que as mortes provocadas em células HeLa pelo tratamento com os complexos de cobre, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, ocorrem via necrose.

6.1.6. VERIFICAÇÃO DE DANOS CELULARES ATRAVÉS DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS POR MICROSCOPIA RAMAN CONFOCAL

Estes estudos foram realizados em colaboração com a Dra. Mónica B. Mamián-López, Pós-Doutora no grupo da Profa. Marcia L. Arruda Temperini, (Laboratório de Espectroscopia Molecular, no IQ-USP) e contou ainda com a colaboração do Dr. Manuel F.G. Huila, do grupo do Prof. Koiti Araki, que disponibilizou o microscópio WITec Alpha-300R e treinamento.

Visando verificar os danos causados pela atividade dos complexos de cobre ou zinco com o ligante isaepy nas células da linhagem HeLa, foi realizada a aquisição dos espectros Raman dos vários componentes celulares e, posteriormente, estes foram analisados utilizando imageamento Raman e processamento multivariado de dados hiperespectrais (MCR-ALS), originando imagens das células, nas quais a intensidade dos espectros obtidos são apresentadas em uma escala de cores.

Através desta técnica, foram obtidos fatores característicos de componentes das células. As alterações nestes fatores, após o tratamento das células com os complexos, indicaram os danos causados por estes, sendo então possível detectar indícios do desencadeamento da sinalização que resulta em um processo apoptótico nas células tratadas com os complexos. Este efeito foi observado ser mais intenso nas células tratadas com o $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ do que com o $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$, provavelmente devido à atividade redox do cobre.

Nas células do grupo controle, foram resolvidos quatro fatores. O fator A apresentou bandas características do citocromo c, em 756, 1127, 1310 e 1580 cm^{-1} (68) (69), permitindo a identificação das mitocôndrias (70). O fator B apresentou as bandas características de timina e citosina em 730 e 783 cm^{-1} , das cadeias de fosfato do DNA em 1097 cm^{-1} , das guanina e adenina em 1340 cm^{-1} e dos anéis das bases do DNA em 1579 cm^{-1} , identificando a localização do núcleo e dos nucléolos. O fator C é caracterizado pela predominância de bandas em frequências elevadas, entre 3110 e 3600 cm^{-1} , que correspondem ao alongamento simétrico e antissimétrico do -OH da água. Além disso, este espectro (controle) também apresentou a banda da água em 1560 cm^{-1} . Este fator se mostra mais intenso no exterior da célula, tornando possível distinguir as regiões intra- e extracelular. Por fim, no fator D as bandas entre 2854 e 2962 cm^{-1} que indicam a presença de uma grande quantidade de proteínas e fosfolipídios, evidenciou a presença de vesículas ou organelas celulares (71).

A) Células controle - Fatores

*

B) Células controle - Imagens

FIG. 33. Análise espectral e imageamento Raman das células Hela. A) Espectros dos fatores A, B, C e D obtidos para as células controle. B) Imagens das células controles evidenciando a intensidade dos fatores A, B, C e D. A barra de cor à direita demonstra a intensidade dos fatores.

Para as células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, também foram identificados quatro fatores. Três são idênticos aos identificados nas células controles (A^* , B^* , C^*) e um distinto (D^*). Este fator distinto apresenta algumas bandas iguais às do fator A^* , as quais são características do citocromo c. Entretanto, no fator D^* , também é possível notar a presença das bandas características do -OH da água com maior intensidade em comparação ao fator A^* , sugerindo que o citocromo c esteja solúvel no citoplasma. Desta maneira evidencia-se a liberação deste composto das mitocôndrias para o citoplasma, indicando a existência da sinalização que desencadeia a morte celular por apoptose.

Outra modificação interessante, evidenciada nas células tratadas com o complexo de cobre, foi a alteração na distribuição do fator B^* nas células, o qual

é utilizado para evidenciar a localização do material genético das células. Este, nas células controles, se encontra restrito a uma região bem definida, revelando o núcleo celular. Contudo, nas tratadas com o $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, este deixa de estar restrito a uma área definida e se encontra distribuído pela célula, deixando claro a ocorrência do desmantelamento da membrana nuclear, que de tal forma permite o extravasamento do conteúdo nuclear.

Além do extravasamento do conteúdo nuclear, outra alteração apresentada nas células tratadas com o complexo de cobre, em relação às não tratadas, concerne com a intensidade do fator C*, o qual evidencia a água, no interior e exterior das células. Este fator evidenciou que nas células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ ocorre um grande aumento na quantidade de água no interior da célula, quando comparado com as células não tratadas, sugerindo que as células, após a exposição ao complexo, perderam a capacidade de regular o fluxo da água pela membrana plasmática.

A) Células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ - Fatores

B) Células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ - Imagens

FIG. 34. Análise espectral e imageamento Raman das células Helas tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. A) Espectros dos fatores A*, B*, C* e D* obtidos para as células Helas tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. B) Imagens das células Helas tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ evidenciando a intensidade dos fatores A*, B*, C* e D*. A barra de cor à direita demonstra a intensidade dos fatores.

Para as células tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ foram identificados os mesmos quatro fatores (A** B** C** D**) observados nas células expostas ao complexo de cobre. Portanto, também foi possível visualizar a presença do citocromo c no citoplasma. Entretanto, os fatores B** e C** apresentaram o mesmo comportamento observado nas células que não receberam tratamentos, não tendo ocorrido o aumento da quantidade de água no interior das células e nem o extravasamento do seu conteúdo nuclear. Isto indica uma menor intensidade na ação do complexo de zinco em relação ao de cobre.

C) Células tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ - Fatores e Imagens

FIG. 35. Análise espectral e imageamento Raman das células HeLa tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$. A) Espectros dos fatores A**, B**, C** e D** obtidos para as células HeLa tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$. B) Imagens das células HeLa tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ evidenciando a intensidade dos fatores A**, B**, C** e D**. A barra de cor à direita demonstra a intensidade dos fatores.

6.1.7. ESTRESSE OXIDATIVO

Em virtude da capacidade do cobre de produzir espécies reativas de oxigênio através da reação tipo Fenton (17), decidiu-se analisar o status redox das células da linhagem HeLa na ausência e em presença dos compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ por 24 h na concentração dos respectivos IC_{50} . Nestes ensaios utilizou-se o equipamento Muse (da Merck Millipore) e o *Muse Oxidative Stress Kit* (MCH100111), o qual

permite quantificar espécies reativas de oxigênio, principalmente o radical superóxido intracelular.

Os gráficos abaixo apresentam o histograma de EROs obtido para as células que receberam ou não o tratamento com os compostos. Este histograma é dividido em duas zonas, M1 e M2. A primeira contém as células com pouca ou nenhuma marcação (ROS-) e a segunda evidencia as células que apresentam intensa marcação (ROS+).

A) Controle

B) 2% DMSO

C) 100 μ M isapn

D) 80 μ M [Cu(isapn)]²⁺

E) 100 μ M [Zn(isapn)]⁺

F) 100 μ M isaepy

G) 20 μ M [Cu(isaepy)]⁺

H) 100 μ M [Zn(isaepy)]²⁺

FIG. 36. Análise do estresse oxidativo das células HeLa tratadas por 24 h na concentração de IC50 dos compostos isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2% DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Histogramas das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Histogramas das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) Gráfico da porcentagem de células sem ou com pouca marcação (ROS-) e com intensa marcação (ROS+).

O ensaio permitiu evidenciar que as células da linhagem HeLa expostas a 2% de DMSO ou aos ligantes isapn e isaepy não apresentaram modificação significativa em relação à quantidade de células em M2, quando comparada com as células do controle. Já as células tratadas com os complexos com zinco mostraram um aumento de aproximadamente duas vezes na quantidade de células marcadas para EROs. Os complexos de cobre, por sua vez, desencadearam um processo oxidativo, com um grande aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio nas células, chegando a apresentar um aumento de mais do que quatro vezes na quantidade de células marcadas.

Estes resultados mostram a inserção do metal no interior da célula, indicando que a capacidade do cobre em produzir EROs intracelularmente é de grande importância para a citotoxicidade dos complexos.

6.1.8. CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA EM CÉLULAS HELA

A partir de estudos anteriores, havia sido verificada uma grande diminuição no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) no tratamento de neuroblastomas humanos, SH-SY5Y, com 50 μM do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]$ por 6 e 12 h. Ao contrário, no tratamento com o complexo $[\text{Zn}(\text{isaepy})]$ este efeito foi pouco intenso (72) (73).

Recentemente, deu-se início ao estudo do potencial de membrana mitocondrial em células HeLa expostas ou não aos compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ por 24h, em concentrações dos seus respectivos IC_{50} .

Neste ensaio foi evidenciado que os compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ apresentaram uma ligeira atividade sobre o potencial de membrana mitocondrial nas HeLas diminuindo-o, enquanto, que a exposição das células aos compostos isaepy e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ não causa alteração em relação ao potencial das células do grupo controle.

Essa ligeira atividade sobre o $\Delta\Psi_m$ em células Hela foi surpreendente, devido ao fato de os complexos apresentarem as características estruturais de compostos conhecidos como cátions deslocalizados lipofílicos, os quais tendem a se acumular nas mitocôndrias e interferir no potencial de membrana desta organela (74). Todavia, este experimento indicou que as mitocôndrias, nas células HeLa, não são o alvo principal da atividade dos compostos testados.

Na Figura 37. abaixo são mostradas as curvas referentes aos histogramas verificados no tratamento de células HeLa com os compostos estudados.

FIG. 37. Análise do potencial de membrana mitocondrial de células HeLa na presença ou ausência dos compostos isapn $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$, $[\text{Zn(isapn)}]^+$, isaepy, $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$. A) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina), controle positivo (apenas rodamina), com estímulo de 2% de DMSO, com isapn, com $[\text{Cu(isapn)}]^{2+}$ e com $[\text{Zn(isapn)}]^+$. B) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina), controle positivo (apenas rodamina), com estímulo de 2% de DMSO, com isaepy, com $[\text{Cu(isaepy)}]^+$ e com $[\text{Zn(isaepy)}]^{2+}$.

6.1.9. ENSAIOS COMETA – Danos a DNA em células

Tendo ciência de que os complexos com ligantes oxindolimínicos utilizados neste trabalho já haviam apresentado a capacidade de realizar a clivagem simples e dupla do DNA em ensaios *in vitro*, na presença de peróxido de hidrogênio em trabalhos anteriores do grupo (73) e de que o complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ apresentou a capacidade de intercalar no DNA e RNA, além de clivar o primeiro no ensaio apresentado neste trabalho, partiu-se para analisar o efeito dos compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ no material genético das células HeLa, quando estas são expostas a eles por 24h na concentração dos respectivos IC_{50} .

Com este objetivo, primeiramente realizou-se o ensaio de Cometa, no qual é possível, através do valor do parâmetro *Olive Tail Moment* que relaciona a cauda com a cabeça do cometa, avaliar a clivagem no DNA.

Neste teste, foi possível evidenciar o valor de $0,54 \pm 0,05$ para as células do controle, $0,54 \pm 0,09$ para as células tratadas com 2% de DMSO, $1,01 \pm 0,06$ para as expostas ao isapn, $11,97 \pm 2,03$ para as tratadas com o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $0,69 \pm 0,07$ para as expostas ao $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $0,71 \pm 0,13$ para as tratadas com o isaepy, $14,54 \pm 0,77$ para as que tiveram contato com o $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $1,09 \pm 0,12$ para com o $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$.

Devido à grande diferença do valor *Olive Tail Moment* para as células expostas aos complexos de cobre, em relação às do grupo controle, ou as tratadas com os ligantes ou complexos de zinco, é possível destacar a importância do cobre para realizar a clivagem do DNA. Portanto, os dados obtidos por este ensaio reforçaram que os complexos de cobre apresentam a habilidade de interagir com o material genético, danificando-o oxidativamente.

A) Controle

B) 2% DMSO

C) 100 μM isapn D) 80 μM $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ E) 100 μM $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ F) 100 μM isaepy G) 20 μM $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ H) 100 μM $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$

Comparando-se estes resultados, isto é, as medidas da cauda “cometa” obtidas em cada ensaio, construiu-se o gráfico mostrado na Fig. 38.

FIG. 38. Ensaio cometa alcalino da linhagem celular HeLa, tratada por 24 h na concentração do IC₅₀ dos compostos: isapn [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺. A) Imagem de um cometa representativo do grupo controle. B) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com 2% DMSO. C) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com isapn. D) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Cu(isapn)]²⁺. E) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Zn(isapn)]⁺. F) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com isaepy. G) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Cu(isaepy)]⁺. H) Imagem de um cometa representativo do grupo das células tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺. I) gráfico comparativo do Olive Tail Moment obtido para cada grupo de células.

6.1.10. CLIVAGEM DO DNA

Dando continuidade ao estudo da atividade dos complexos sobre o DNA e pretendendo aprofundar o entendimento desta ação, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo utilizando o *Muse Multi-Color DNA Damage kit* (MCH200107) (Merck Millipore), o qual monitora a fosforilação das proteínas ATM e histona H2A.X. Em função de a fosforilação destas proteínas serem ocasionadas como resposta celular à dupla clivagem no DNA, é possível correlacionar esta modificação nas proteínas com o dano no material genético (75).

Neste experimento é possível notar que ocorreu pouca modificação nos níveis de fosforilação da ATM ou da histona H2A.X nas células expostas ao 2%

de DMSO ou aos compostos isapn, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy^+ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$, em relação ao grupo controle, indicando que estes compostos não possuem a capacidade de desencadear a dupla clivagem do DNA. Todavia, ocorreu um aumento na fosforilação da ATM nas células tratadas com ambos os complexos de cobre. Além disso, para o caso do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, além do aumento na fosforilação da ATM, ocorreu um aumento na quantidade de células que apresentam a dupla marcação para *anti-phospho-ATM* e *anti-phospho-histona H2A.X*.

Portanto, as informações extraídas deste teste indicaram que o sistema de reparo de dupla quebra do DNA se encontra ativo nas células tratadas com estes complexos de cobre. Portanto, foram verificados indícios de que estes complexos são capazes de realizar a dupla clivagem das células Hela, quando estas são expostas a eles por 24 h, na concentração dos respectivos IC_{50} . Isto reforça os dados obtidos pelo teste de cometa, por evidenciar que os complexos de cobre $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ possuem a capacidade de clivar o DNA tanto em ensaios *in vitro*, como *in cellulo*.

A) Controle

B) 2% DMSO

C) 100 μ M isapn

D) 80 μ M [Cu(isapn)]²⁺

E) 100 μM $[\text{Zn(isapn)}]^+$

F) 100 μM isaepy

G) 20 μM $[\text{Cu(isaepy)}]^+$

H) $100 \mu\text{M}$ $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$

FIG. 39. Análise do dano no DNA das HeLa tratadas por 24 h na concentração do IC50 dos compostos isapn $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$. A) Histogramas das células do controle. B) Histogramas das células tratadas com 2% DMSO. C) Histogramas das células tratadas com isapn. D) Histogramas das células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$. E) Histogramas das células tratadas com $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$. F) Histogramas das células tratadas com isaepy. G) Histogramas das células tratadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. H) Histogramas das células tratadas com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$. I) Gráfico comparativo das células marcadas para fosfo-ATM e fosfo-histona H2A.X.

6.2. ENSAIOS *IN CELLULO* COM AS LINHAGENS MES-SA E MES-SA/DX5

6.2.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR DE MES-SA E MES-SA/DX5

Em resposta ao problema de resistência apresentado pelos complexos de platina, buscou-se demonstrar se os complexos utilizados neste trabalho seriam capazes de superar este desafio. Para isto, iniciou o estudo do efeito dos compostos nas células das linhagens MES-SA e MES-SA/DX5. Sendo a segunda resistente a inúmeros compostos em função da superexpressão da glicoproteína-P, a qual apresenta a capacidade de realizar o efluxo de compostos antitumorais impedindo-os de agir (76).

Como primeiro passo, pretendeu-se evidenciar a citotoxicidade dos complexos frente estas linhagens através o ensaio de MTT. Os resultados mostraram que apenas os complexos de cobre com os ligantes isapn e isaepy foram capazes de desencadear a morte das células na faixa de concentração testada. Destacando a importância deste metal para a atividade citotóxicas dos compostos, de maneira similar aos resultados obtidos com a linhagem HeLa.

Devido à super-expressão da glicoproteína-P, era esperado que o valor do IC_{50} para as células MES-SA/DX5 fosse maior do que para a MES-SA. Interessantemente, quando se compara os valores obtidos para cada composto frente as duas linhagens, é possível notar que são bastante próximos. Indicando que a linhagem resistente não apresenta resistência aos complexos testados.

TABELA 12. Valores de IC_{50} dos compostos isapn $[Cu(isapn)]^{2+}$, $[Zn(isapn)]^{+}$, $[Cu(misapn)]^{+}$, $[Zn(misapn)]^{2+}$, isaepy, $[Cu(isaepy)]^{+}$, $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$, $[Zn(isaepy)]^{2+}$ e $[Zn(isaepy)_2]^{2+}$ para as linhagens tumorais MES-SA e MES-SA/DX5.

	MES-SA (μM)	MES-SA/DX5 (μM)
Isapn	>100	>100
$[Cu(isapn)]^{2+}$	$>103 \pm 1,6$	$93,7 \pm 1,0$
$[Zn(isapn)]^{+}$	>100	>100
$[Cu(misapn)]^{+}$	>100	>100
$[Zn(misapn)]^{2+}$	>100	>100
Isaepy	>100	>100
$[Cu(isaepy)]^{+}$	$15,3 \pm 2,3$	$12,6 \pm 0,7$
$[Cu(isaepy)_2]^{2+}$	$7,1 \pm 0,3$	$6,4 \pm 1,0$
$[Zn(isaepy)]^{2+}$	>100	>100
$[Zn(isaepy)_2]^{2+}$	>100	>100

6.2.2. TESTE DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P COM RODAMINA 123

Visando aprofundar o entendimento de como ou porque os complexos apresentavam o valor do IC_{50} frente à linhagem MES-SA/DX5 próximo ao valor da linhagem MES-SA, foi realizado um ensaio que permite evidenciar a atividade da glicoproteína-P utilizando a rodamina 123. A rodamina 123 é uma sonda fluorescente que acumula na mitocôndria (77), todavia, essa sonda é um substrato para a glicoproteína-P (78). Portanto, devido ao efluxo realizado por essa proteína, a sua fluorescência não é visualizada no interior de linhagens celulares que superexpressam a glicoproteína-P.

As imagens obtidas demonstram que a rodamina 123 apenas se acumulou nas células do controle positivo, no qual foi usado 10 μM de Verapamil que possui a capacidade de inibir a glicoproteína-P (76). Em todos os outros grupos

estudados não ocorreu o acúmulo de rodamina 123 no interior das células indicando que os compostos testados não interferem na atividade dessa proteína.

Portanto, as células da linhagem MES-SA/DX5 não apresentam resistência aos compostos e que essa falta de resistência não ocorre devido à perda de função da p-glicoproteína.

FIG. 40. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para detecção de Rodamina 123 no interior das células MES-SA/DX5, tratadas por 24 h, na concentração do IC_{50} dos compostos isapn $[Cu(isapn)]^{2+}$, $[Zn(isapn)]^{+}$, isaepy, $[Cu(isaepy)]^{+}$ e $[Zn(isaepy)]^{2+}$, na presença de 1 μ M de Hoechst e 1 μ M de Rodamina.

6.2.3. CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA 123

Pretendendo aprofundar o conhecimento sobre os alvos dos complexos frente a linhagem MES-SA, partiu para a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) destas células quando expostas ou não aos compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ por 24, nos respectivos IC_{50} .

Interessantemente, os resultados obtidos frente a esta linhagem foram distintos dos obtidos frente a HeLa, indicando a importância do modelo celular adotado para o entendimento do mecanismo de ação dos compostos. Enquanto que nas células HeLa a despolarização da mitocôndria ocorreu, apenas, ligeiramente, nas da linhagem MES-SA, para alguns dos compostos, essa despolarização foi bastante intensa.

Para os compostos da série isapn (isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$), é possível notar a despolarização mitocondrial nos tratamentos realizados com os três compostos. Sendo a atividade do ligante pouco intensa em comparação a dos complexos e a atividade do complexo de cobre a mais intensa. Já para os compostos da série isaepy (isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2]^{2+}$) enquanto que o ligante isaepy livre causou uma pequena queda no potencial de membrana mitocondrial, o complexo de cobre com um ligante não foi capaz de causar alteração e o com dois ligantes causou uma despolarização bastante intensa. Ambos os complexos de zinco desencadearam intensa diminuição no $\Delta\Psi_m$.

Assim, espera-se que essa diminuição do $\Delta\Psi_m$ nas células MES-SA ocorra devido a um modo de ação semelhante ao anteriormente verificado na ação dos complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]$ sobre as mitocôndrias de neuroblastomas SH-SY5Y, em que esses complexos agiram como agentes desacopladores e inibidores dos complexos I e IV da cadeia respiratória (72).

A diferença na intensidade de ação dos complexos de cobre-isaepy, com um ou dois ligantes, pode estar relacionada com a carga destes complexos. Devido ao fato de o complexo com dois ligantes apresentar uma carga $2+$ é possível que este seja direcionado para a mitocôndria com maior probabilidade do que o com um ligante e carga $1+$. Devido ao fato desta organela apresentar uma diferença

de potencial negativa internamente (79), permite que este complexo se acumule em maior quantidade em seu interior e atue mais intensamente.

Outro dado importante apresentado por este ensaio foi a diminuição do potencial de membrana mitocondrial desencadeada pela exposição aos complexos de zinco, sendo importante destacar a ação do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})_2]^{2+}$. Tal efeito, possivelmente, se deve à capacidade do zinco de também diminuir o potencial de membrana mitocondrial, sendo este efeito o resultado da inibição da cadeia respiratória (80) (81).

A) isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$

FIG. 41. Análise do potencial de membrana mitocondrial de células MES-SA na presença ou ausência dos compostos isapn $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$. A) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina 123), controle positivo (apenas rodamina 123), com estímulo de 2% de DMSO, com isaepn, com $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e com $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$. B) Histogramas das células do controle negativo (sem rodamina 123), controle positivo (apenas rodamina 123), com estímulo de 2% de DMSO, com isaepy, com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e com $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$.

6.3. ENSAIOS *IN CELLULO* COM A LINHAGEM HACAT

6.3.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)

Tendo como meta analisar possíveis efeitos dos compostos sobre os lisossomos e no processo de autofagia, foi iniciado um estudo utilizando a linhagem de células de queratinócitos humanos (HaCaT) como modelo. Primeiramente, foi realizado o ensaio de MTT, para evidenciar a citotoxicidade dos complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ frente a esta linhagem.

Os resultados desses ensaios demonstraram que os complexos de cobre são mais citotóxicos que os de zinco, confirmando dados anteriores com diferentes tipos de células (73), evidenciando a importância desse metal. Além disso, também foi possível notar, ao comparar os valores de IC_{50} de cada complexo após diferentes tempos de incubação (24 e 48 h), que apenas com o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ houve alteração significativa nesses valores.

TABELA 13. Valores de IC_{50} dos compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ frente a linhagem HaCaT.

	24h (μM)	48h (μM)
$[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$	$61,2 \pm 2,6$	$33,1 \pm 1,25$
$[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$	$119,6 \pm 7,7$	$112,6 \pm 2$
$[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$	$37,0 \pm 2,0$	$34,1 \pm 0,4$
$[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$	$116,7 \pm 1,9$	$110,4 \pm 1,4$

6.3.2. ENSAIO COM ALARANJADO DE ACRIDINA

Dando continuidade ao estudo com as células HaCaT e pretendendo evidenciar o acúmulo de vesículas ácidas nas células, foi realizado o ensaio utilizando o corante alaranjado de acridina. O qual possui a capacidade de se difundir através das membranas celulares quando em pH neutro, porém quando em pH baixo perde esta habilidade. Como consequência desta alteração, este corante se acumula nas vesículas ácidas e se agrega. Em tal situação passa a emitir fluorescência na região do vermelho, enquanto que nas outras regiões celulares emite fluorescência no verde (82).

Neste ensaio ficou evidente que apenas a incubação das células com 100 μM do complexo $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ resultou em um aumento dessas vesículas ácidas no interior das células sinalizando para a possibilidade de este complexo de zinco apresentar a capacidade de interferir no ciclo autofágico celular. Enquanto que nenhum outro composto apresenta esta capacidade na condição em que foram testados.

FIG. 42. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para detecção de vesículas ácidas por meio de marcação com o corante laranja de acridina nas células da linhagem HACAT tratadas por 24 h na concentração do IC_{50} dos compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$.

6.3.3. ENSAIOS DE IODETO DE PROPÍDIO

Com o intuito de obtermos indicativos do mecanismo de morte desencadeado pelos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ nas células da linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), foi realizado a marcação destas com o iodeto de propídio, a qual evidencia as células que estejam morrendo por necrose.

As imagens obtidas neste ensaio revelaram que apenas as células tratadas com 35 μM do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ durante 24h apresentaram essa marcação com o iodeto de propídio. Portanto, este ensaio indicou que esse é o único composto com a capacidade de causar necrose nas células HACAT.

FIG. 43. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para detecção de células em processo necrótico por meio de marcação com o corante iodeto de propídio, nas células da linhagem HACAT, tratadas por 24 h na concentração do IC_{50} dos compostos isapn $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, isaepy, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$.

7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O amplo uso da cisplatina e complexos correlatos para o tratamento tumoral, após sua aprovação pela FDA (*Food and Drugs Administration*), nos USA, direcionou a atenção dos pesquisadores para o uso dos metalofármacos no tratamento desta doença. Todavia, os problemas apresentados por estas drogas, como os efeitos colaterais e a resistência induzida, incentivaram a busca por novos metalofármacos, baseados em diferentes metais, capazes de melhorar sua eficiência e diminuir seus efeitos deletérios (30).

Neste cenário, os potenciais metalofármacos de cobre surgem com bastante força como possíveis alternativas para substituir os complexos de platina. Sendo baseados num metal essencial, que atua no sítio ativo de diversas metaloproteínas e metaloenzimas, é esperado que estes complexos apresentem uma menor toxicidade e superem o problema da resistência, em função dos seus distintos mecanismos de ação (30).

Buscando cooperar nesta busca por complexos de cobre com atividade tumoral, os ligantes, isapn e isaepy, e complexos de cobre ou zinco com os referidos ligantes foram sintetizados e caracterizados por diferentes técnicas. Os resultados obtidos pela análise elementar estão condizentes com os cálculos das estruturas propostas dos compostos, sendo que em alguns casos foi necessário adicionar água. Nas análises por espectroscopia na região do Infravermelho ficou evidente a presença das bandas características dos ligantes e dos íons percloratos, quando estes estão presentes no complexo.

A espectroscopia na região do ultravioleta-visível dos ligantes apresentou bandas de transferências de cargas internas dos ligantes e nos espectros de todos os complexos foi possível notar as transferências de cargas internas dos ligantes e as transferências de cargas dos ligantes para os metais. Além disto, nos complexos de cobre também foi visível as transições d-d do metal.

Tendo os compostos já caracterizados, iniciou-se uma série de ensaios *in vitro*. Nesta etapa do trabalho, foi possível evidenciar a capacidade dos compostos $[Zn(isapn)]^+$, $[Cu(isapn)]^{2+}$, $[Zn(isaepy)]^{2+}$ ou $[Cu(isaepy)]^+$ de causar inibição da atividade da proteína humana CDK1/ciclina B em realizar a fosforilação da histona H1, enquanto que o ligante isapn causou apenas uma pequena inibição.

Além disso, também foi possível evidenciar que os compostos isapn, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ ou $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ não foram capazes de inibir a atividade de desfosforilação realizada pela fosfatase alcalina sobre a histona H1, evidenciando que estes compostos são seletivos para o complexo humano CDK1/ciclina B.

Outros possíveis alvos dos complexos, estudados nesta etapa do trabalho, foram o DNA e o RNA. A análise do efeito sobre estes biopolímeros ocorreu através do teste de temperatura de sua desnaturação na presença do $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. Este ensaio evidenciou a capacidade deste complexo de intercalar no DNA e no RNA, além de causar a clivagem do primeiro, apontando para estas biomoléculas como prováveis alvos na ação citotóxica do $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e de outros compostos semelhantes.

Outro dado importante, obtido com os testes *in vitro*, foi a incapacidade dos complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ em agir sobre as vesículas de fosfolípidios POPG e uma pequena atividade do $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ sobre as de POPC, sinalizando para o fato de as membranas celulares não serem alvo da ação destes compostos.

Dando início aos estudos *in cellulo*, o trabalho foi dividido em três frentes. Em uma destas, foi utilizado a linhagem celular HeLa, na qual pretendeu-se demonstrar o mecanismo de ação dos compostos. Na segunda frente, os testes foram feitos com as células MES-SA e MES-SA/DX5, com o objetivo de evidenciar que os complexos testados são capazes de superar o problema da resistência que a cisplatina muitas vezes enfrenta. Na terceira frente de trabalho, na qual foi utilizada células HACAT, pretendeu-se relacionar a ação dos compostos com os lisossomos e o ciclo autofágico.

Os resultados obtidos com a HeLa demonstraram que apenas os complexos de cobre com os ligantes isapn e isaepy foram capazes de desencadear a morte destas células, deixando claro a indispensabilidade deste metal para a citotoxicidade dos compostos.

Além disso, esses resultados também evidenciaram que os complexos com o ligante isaepy são os mais ativos, provavelmente por esses compostos conseguirem entrar nas células em maior quantidade, como sinalizado por um maior aumento na concentração do cobre no interior das células quando estas são expostas a eles, por 24 h, na contração do IC_{50} . Ademais, foi evidenciado que os

complexos de cobre $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ também desencadeavam nestas células a morte celular por necrose.

Foi interessante notar que apesar de os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ apresentarem valores de IC_{50} frente a HeLa próximos, $19,2 \pm 2,1 \mu\text{M}$ e $10,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$, respectivamente, o complexo com dois ligantes apresentou um IC_{50} bastante inferior ($15,6 \pm 1,1 \mu\text{M}$) frente ao fibroblasto P4 do que o com um ligante ($51,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$), evidenciando que o $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ apresenta uma menor seletividade para a célula tumoral do que o $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$.

Além de desencadear a morte celular, outro efeito apresentado pelos compostos de cobre $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ foi bloquear o ciclo celular em G2/M tendo este efeito possível relação com a capacidade destes compostos de inibir a atividade do complexo CDK1/ ciclina B, o qual age nesta etapa do ciclo.

Aprofundando a busca por informações sobre o mecanismo de ação dos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$, ensaios de imageamento por microscopia Raman evidenciaram que ocorre a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, indicando a sinalização para um processo de morte por apoptose, juntamente, com a entrada significativa de água na célula e o extravasamento do conteúdo nuclear para o citoplasma, principalmente nas células expostas ao $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$.

Em uma segunda etapa dos testes com a HeLa, passou-se a buscar possíveis alvos intracelulares dos compostos. Nesta etapa, foi dada atenção à mitocôndria e ao núcleo, em virtude de resultados obtidos em trabalhos anteriores pelo nosso grupo, que evidenciaram um aumento de cobre nestas organelas após a exposição das células de linhagem SH-SY5Y a uma concentração $50 \mu\text{M}$ de $[\text{Cu}(\text{isapn})]$ ou $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]$ (73)

Na busca por alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), foi evidenciado que os compostos isapn, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ apresentaram apenas uma ligeira atividade sobre o potencial de membrana mitocondrial nas células HeLa diminuindo-o, enquanto que a exposição das células aos compostos isaepy e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ não causou alteração significativa em relação ao potencial das células do grupo controle.

Todavia, os compostos que apresentaram a capacidade de diminuir o $\Delta\Psi\text{m}$ das células HeLa não foram capazes de causar alterações semelhantes ao ocorrido em outras linhagens celulares, como SH-SY5Y, descritas no trabalho de

Filomeni G et al (72) ou em células MES-SA, descritas neste trabalho. Estes novos resultados indicam que esta organela não deve ser o alvo principal para a ação destes compostos na linhagem HeLa.

Voltando a atenção para o núcleo, realizou-se o ensaio de cometa e de clivagem de DNA para todos os compostos estudados. No primeiro caso, foi possível evidenciar que o ligante isapn e os complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ apresentam a habilidade de causar danos no material genético. Todavia, a intensidade destes danos causados pelos complexos de cobre é muito superior. O tratamento das células com isapn ou $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^{2+}$ causou um aumento de aproximadamente duas vezes no *Olive Tail Moment*, enquanto que a exposição aos complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ ou $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ causou um aumento de vinte duas ou vinte sete vezes, respectivamente neste parâmetro.

Dando continuidade à análise da ação dos complexos no DNA, o ensaio de citometria com *Muse Multi-Color DNA Damage kit* (MCH200107) (Merck Millipore) explicitou a ocorrência de dupla clivagem no material genético das células HeLa, quando expostas aos complexos de cobre $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$. Estes dados reforçaram aqueles obtidos com o ensaio de cometa, indicando que o DNA é um alvo importante para a citotoxicidade destes complexos frente a células HeLa.

Em uma segunda frente de trabalho, na qual foram utilizadas as linhagens MES-SA e MES-SA/DX5, com o intuito de demonstrar a capacidade dos complexos de cobre em superar o problema da resistência apresentado pela cisplatina, inicialmente determinou-se os valores de IC_{50} dos complexos frente a essas duas linhagens. Os resultados mostraram que, para os complexos que foram capazes de desencadear a morte destas células, ($[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ ou $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$), na faixa de concentração testada, a diferença no valor do IC_{50} entre as duas linhagens é muito pequena, indicando a inexistência da necessidade de uma maior concentração para matar a linhagem resistente, em relação a concentração usada para a não resistente. Ou seja, estes complexos de cobre são capazes de superar a resistência desencadeada pela super-expressão da glicoproteína-P, que atua no efluxo de drogas, sendo responsável pela resistência observada com outros compostos.

Tendo ciência de que a resistência apresentada pela linhagem MES-SA/DX5 é decorrente da atividade de efluxo realizada pela glicoproteína-P, buscou-se

evidenciar se a falta de resistência poderia ser decorrente de perda de atividade desta glicoproteína, como consequência da exposição das células aos nossos compostos. Entretanto, as imagens das células MES-SA/DX5 utilizando rodamina 123 deixaram claro que a glicoproteína-P se mantém ativa mesmo após o tratamento com os compostos, na concentração do IC₅₀, indicando que a falta de resistência não é devido à inibição ou degradação da glicoproteína-P, na membrana dessas células.

Na intenção de evidenciar um alvo dos compostos nestas linhagens, foi realizado a análise do potencial de membrana mitocondrial da MES-SA, quando expostas aos compostos. Os dados obtidos indicaram uma ação nesta organela dos compostos isapn, [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, isaepy, [Cu(isaepy)]²⁺, [Zn(isaepy)]²⁺ e [Zn(isaepy)₂]²⁺. Sendo que os ligantes apresentaram um efeito menos intenso do que os complexos e sendo necessário destacar que o tratamento das células com o [Zn(isaepy)₂]²⁺ resultou em uma grande queda no $\Delta\Psi_m$.

Quanto à terceira frente de trabalho, focou-se o trabalho sobre o efeito dos complexos [Cu(isapn)]²⁺, [Zn(isapn)]⁺, [Cu(isaepy)]⁺ e [Zn(isaepy)]²⁺ nos lisossomos e no ciclo autofágico.

Iniciou-se esta frente de trabalho com o estudo da citotoxicidade destes complexos frente a células HACAT. Nesta etapa, os dados mantiveram a mesma tendência já observada frente as outras linhagens deste trabalho e de trabalhos anteriores (73), isto é, de que é maior a toxicidade dos complexos de cobre em detrimento dos de zinco, com os mesmos ligantes. Todavia, diferentemente dos ensaios realizados para as outras linhagens, para esta linhagem o teste foi realizado com duração de 24h, e também com 48 h. Esta maior duração do ensaio permitiu evidenciar uma queda no valor do IC₅₀ após 48 h de incubação, em relação ao de 24 h para o complexo [Cu(isapn)]²⁺, indicando uma ação mais lenta deste complexo em relação aos outros.

Além disso, os experimentos com células HaCaT, evidenciaram a ocorrência de acúmulo de vesículas ácidas nessas quando tratadas com [Zn(isaepy)]²⁺ por 24 h, na concentração do IC₅₀, indicando que este complexo provavelmente interfere no ciclo autofágico das células. Todavia, outros experimentos são necessários para compreender melhor esta característica e confirmar esta

hipótese. Por fim, também se verificou a ocorrência de necrose nas células desta linhagem incubadas com $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, por 24h em concentração 35 μM .

Concluindo, nossos estudos permitiram avançar na investigação da reatividade de complexos oxindolímínicos de cobre(II) e de zinco(II) frente a diferentes alvos biológicos (DNA, mitocôndrias, lisossomas, proteínas específicas). Também evidenciaram diferenças de reatividade, dependendo do metal e do ligante utilizado, frente a diferentes células (HeLa, MES-SA, MES-SA/DX5, HaCaT). Nossos resultados também indicaram que este tipo de compostos são promissores agentes farmacológicos quanto a sua possível utilização em terapias antitumorais.

Referências

1. **Pakravan P, Kashanian S, Khodaei MM, Harding FJ.** *Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity.* Pharmacol Rep. , 2013. 65(2):313-35.
2. **Vine KL, Matesic L, Locke JM, Ranson M, Skropeta D.** *Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008.* Anticancer Agents Med Chem., 2009. May;9(4):397-414.
3. **Wu P, Nielsen TE, Clausen MH.** *FDA-approved small-molecule kinase inhibitors.* Trends Pharmacol Sci. , 2015. Jul;36(7):422-39.
4. **Medvedev A, Buneeva O, Gnedenko O, Ershov, Ivanov .** *Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications.* Biofactors, 2018 .
5. **Cane A, Tournaire MC, Barritault D, Crumeyrolle-Arias M.** *The endogenous oxindoles 5-hydroxyoxindole and isatin are antiproliferative and proapoptotic.* Biochem Biophys Res Commun. , 2000. 2000 Sep 16;276(1):379-84.
6. **Song J, Hou L, Ju C, Zhang J, Ge Y, Yue W.** *Isatin inhibits proliferation and induces apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro and in vivo.* Eur J Pharmacol. , 2013. Feb 28;702(1-3):235-41.
7. **Cui J, Placzek WJ.** *Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members.* Int J Mol Sci. , 2018 . Jan 20;19(1).
8. **Vine KL, Locke JM, Ranson M, Benkendorff K, Pyne SG, Bremner JB.** *In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives.* Bioorg Med Chem., 2007. Jan 15;15(2):931-8. Epub 2006 Oct 20.
9. **Vine KL, Locke JM, Ranson M, Pyne SG, Bremner JB.** *An investigation into the cytotoxicity and mode of action of some novel N-alkyl-substituted isatins.* J Med Chem. , 2007 . Oct 18;50(21):5109-17. Epub 2007 Sep 21.
10. **Yu B, Wang SQ, Qi PP, Yang DX, Tang K, Liu HM.** *Design and synthesis of isatin/triazole conjugates that induce apoptosis and inhibit migration of MGC-803 cells.* Eur J Med Chem. , 2016. Nov 29;124:350-360.
11. **Kozub MM, Carr RM, Lomberk GL, Fernandez-Zapico ME.** *LSD1, a double-edged sword, confers dynamic chromatin regulation but commonly promotes aberrant cell growth.* F1000Res. , 2017 . Nov 16;6:2016.

12. Jautelat R, Brumby T, Schäfer M, Briem H, Eisenbrand G, Schwahn S, Krüger M, Lücking U, Prien O, Siemeister G. *From the insoluble dye indirubin towards highly active, soluble CDK2-inhibitors*. *Chembiochem.* , 2005. Mar;6(3):531-40.
13. Ibrahim HS, Abou-Seri SM, Abdel-Aziz HA. *3-Hydrazinoindolin-2-one derivatives: Chemical classification and investigation of their targets as anticancer agents*. *Eur J Med Chem.* , 2016. Oct 21;122:366-381.
14. Evdokimov NM, Magedov IV, McBrayer D, Kornienko A. *Isatin derivatives with activity against apoptosis-resistant cancer cells*. *Bioorg Med Chem Lett.* , 2016. Mar 15;26(6):1558-1560.
15. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. *Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'*. *Metallomics.*, 2015. Nov;7(11):1459-76.
16. Adman ET. *Copper protein structures*. *Adv Protein Chem.* , 1991. ;42:145-97.
17. Valko M, Morris H, Cronin MT. *Metals, toxicity and oxidative stress*. *Curr Med Chem.* , 2005. ;12(10):1161-208.
18. Guido C, Valeria MN, Daniela F, Clara G, Sonia N, Gavino F. *Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology*. *Coordination Chemistry Reviews* , 2010. 254, 876–889.
19. Hatori Y, Inouye S, Akagi R. *Thiol-based copper handling by the copper chaperone Atox1*. *IUBMB Life.*, 2017 . Apr;69(4):246-254.
20. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. *Chem Rev.* , 1996 . Nov 7;96(7):2563-2606.
21. Collman JP, Boulatov R, Sunderland CJ, Fu L. *Functional analogues of cytochrome c oxidase, myoglobin, and hemoglobin*. *Chem Rev.*, 2004 . Feb;104(2):561-88.
22. Iryna AK, Daniel P, Arno FS, Patrick G, Bernt K e Jan R. *The Dicopper(II) Complex of the Novel Asymmetric Dinucleating Ligand Hpy3asym as a Structural Model of Catechol Oxidase*. *Eur. J. Inorg. Chem.* 9 (2003) 1669., 2003. 9. 1669-1674.
23. Whittaker JW. *Free radical catalysis by galactose oxidase*. *Chem Rev.* , 2003. Jun;103(6):2347-63.
24. Solomon EI, Heppner DE, Johnston EM, Ginsbach JW, Cirera J, Qayyum M, Kieber-Emmons MT, Kjaergaard CH, Hadt RG, Tian L. *Copper active sites in biology*. *Chem Rev.* , 2014 . Apr 9;114(7):3659-853.
25. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. *Science.*, 1999 . Apr 30;284(5415):805-8.
26. Banci L, Bertini I, McGreevy KS, Rosato A. *Molecular recognition in copper trafficking*. *Nat Prod Rep.* , 2010. May;27(5):695-710.

27. **Boal AK, Rosenzweig AC.** *Structural biology of copper trafficking.* Chem Rev. , 2009 . Oct;109(10):4760-79.
28. **Wang T, Guo Z.** *Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design.* Curr Med Chem. , 2006. ;13(5):525-37.
29. **Mercer JF, Llanos RM.** *Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals.* J Nutr. , 2003 . May;133(5 Suppl 1):1481S-4S.
30. **Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C.** *Advances in copper complexes as anticancer agents.* Chem Rev. , 2014 . Jan 8;114(1):815-62.
31. **Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T.** *Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode.* Nature. , 1965 . Feb 13;205:698-9.
32. **Marloye M, Berger G, Gelbcke M, Dufrasne F.** *A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes.* Future Med Chem. , 2016 . Dec;8(18):2263-2286.
33. **Würtenberger I, Angermaier B, Kircher B, Gust R.** *Synthesis and in vitro pharmacological behavior of platinum(II) complexes containing 1,2-diamino-1-(4-fluorophenyl)-2-alkanol ligands.* J Med Chem. , 2013 . Oct 24;56(20):7951-64.
34. **Kelland L.** *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.* . Nat Rev Cancer. , 2007. Aug;7(8):573-84.
35. **Gupte A, Mumper RJ.** *Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment.* Cancer Treat Rev. , 2009. Feb;35(1):32-46.
36. **Eichhorn GL, Shin YA.** *Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity.* J Am Chem Soc. , 1968. Dec 18;90(26):7323-8.
37. **Kagawa TF, Geierstanger BH, Wang AH, Ho PS.** *Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl₂.* J Biol Chem. , 1991. Oct 25;266(30):20175-84.
38. **Paixão DA, Marzano IM, Jaimes EHL, Pivatto M, Campos DL, Pavan FR, Deflon VM, Maia PIDS, Da Costa Ferreira AM, Uehara IA, Silva MJB, Botelho FV, Pereira-Maia EC, Guillard S, Guerra W.** *Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies.* J Inorg Biochem. , 2017 . Jul;172:138-146.
39. **Silva PP, Guerra W, Dos Santos GC, Fernandes NG, Silveira JN, da Costa Ferreira AM, Bortolotto T, Terenzi H, Bortoluzzi AJ, Neves A, Pereira-Maia EC.** *Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands.* J Inorg Biochem. , 2014 . Mar;132:67-76.
40. **Ruiz-Azuara L, Bravo-Gómez ME.** *Copper compounds in cancer chemotherapy.* Curr Med Chem. , 2010. 2010;17(31):3606-15.

41. **Serment-Guerrero J, Bravo-Gomez ME, Lara-Rivera E, Ruiz-Azuara L.** *Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action.* J Inorg Biochem. , 2017. Jan;166:68-75.
42. **Garcia-Ramos JC, Vertiz-Serrano G, Macias-Rosales L, Galindo-Murillo R, Toledano-Magana Y, Bernal JP, Cortes-Guzman F, Ruiz-Azuara L.** *Isomeric Effect on the Pharmacokinetic Behavior of Anticancer Cull Mixed Chelate Complexes: Experimental and Theoretical Approach .* Eur. J. Inorg. Chem. , 2017. 1728–1736 .
43. **Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H.** *Topoisomerases as anticancer targets.* Biochem J., 2018 . Jan 23;475(2):373-398.
44. **Qin Y, Meng L, Hu C, Duan W, Zuo Z, Lin L, Zhang X, Ding J.** *Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by binding to its ATPase domain.* Mol Cancer Ther. , 2007 . Sep;6(9):2429-40.
45. **Hall IH, Taylor K, Miller MC, Dothan X, Khan MA, Bouet FM.** *Cytotoxicity of copper complexes of 2-furaldehyde oxime derivatives in murine and human tissue cultured cell lines.* Anticancer Res. , 1997 . Jul-Aug;17(4A):2411-8.
46. **Katkar P, Coletta A, Castelli S, Sabino GL, Couto RA, Ferreira AM, Desideri A.** *Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity.* Metallomics. , 2014 . Jan;6(1):117-25.
47. **Fang S, Hou Y, Ling L, Wang D, Ismail M1, Du Y, Zhang Y, Yao C, Li X.** *Dimeric camptothecin derived phospholipid assembled liposomes with high drug loading for cancer therapy.* Colloids Surf B Biointerfaces. , 2018 . Feb 22;166:235-244.
48. **Yang L, Guo W, Zhang S, Wang G.** *Ubiquitination-proteasome system: A new player in the pathogenesis of psoriasis and clinical implications.* J Dermatol Sci. , 2018 . Mar;89(3):219-225.
49. **Dou QP, Smith DM, Daniel KG, Kazi A.** *Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy.* Prog Cell Cycle Res., 2003. ;5:441-6.
50. **Fujie T, Murakami M, Yoshida E, Tachinami T, Shinkai Y, Fujiwara Y, Yamamoto C, Kumagai Y, Naka H, Kaji T.** *Copper diethyldithiocarbamate as an activator of Nrf2 in cultured vascular endothelial cells.* J Biol Inorg Chem. , 2016 . Apr;21(2):263-73.
51. **Buac D, Schmitt S, Ventro G, Kona FR, Dou QP.** *Dithiocarbamate-based coordination compounds as potent proteasome inhibitors in human cancer cells.* Mini Rev Med Chem. , 2012 . Oct;12(12):1193-201.
52. **Zhang Z, Wang H, Yan M, Wang H, Zhang C.** *Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review).* Mol Med Rep. , 2017 . Jan;15(1):3-11.
53. **Franco C.** *Multielement analysis of a municipal landfill leachate with total reflection X-ray fluorescence (TXRF). A comparison with ICP-OES analytical results.* J Radioanal Nucl Chem , 2012. 293:119–126.

54. **Bradford MM.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem. , 1976. May 7;72:248-54.
55. **Givan AL.** *Flow Cytometry: First Principles.* New York: Wiley-Liss, Inc., 2001. 2nd Edition.
56. **Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ.** *Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry.* Cold Spring Harb Protoc. , 2016. Nov 1;2016(11).
57. **Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR.** *Interaction of Rhodamine 123 with Living Cells Studied by Flow Cytometry.* . Cancer Res. , 1982. 42, 799-806.
58. **Cerchiaro G, Saboya PL, da Costa Ferreira AM, Maria D, Marcos T, Eberlin N.** *Keto-enolic equilibria of an isatin-schiff base copper(II) complex and its reactivity.* Transition Metal Chemistry , 2004. 29: 495–504.
59. **Miguel RB, Petersen PA, Gonzales-Zubiate FA, Oliveira CC, Kumar N, do Nascimento RR, Petrilli HM, da Costa Ferreira AM.** *Inhibition of cyclin-dependent kinase CDK1 by oxindolimine ligands and corresponding copper and zinc complexes.* J Biol Inorg Chem. , 2015 . Oct;20(7):1205-17.
60. **da Silveira VC, Luz JS, Oliveira CC, Graziani I, Ciriolo MR, da Costa Ferreira AM.** *Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity.* J Inorg Biochem., 2008. 102(5-6):1090-103.
61. **Cerchiaro G, Micke GA, Tavares MFM, da Costa Ferreira AM.** *Kinetic studies of carbohydrate oxidation catalyzed by novel isatin–Schiff base copper(II) complexes.* Journal of Molecular Catalysis A: Chemical , 2004. 221; 29–39.
62. **Castellia S, Gonçalves MB, Katkara P, Stuchic GC, Couto RAA, Petrilli HM, da Costa Ferreira AM.** *Comparative studies of oxindolimine-metal complexes as inhibitors of human DNA topoisomerase IB.* Journal of Inorganic Biochemistry , 2018. 186; 85–94.
63. **Shriver DF, Atkins PW, Langford CH.** *Inorganic Chemistry* . Oxford. Univ. Press , 1992. 4 edição.
64. **Müller J, Felix K, Maichle C, Lengfelder E, Strähle J, Weser U.** *Phenyl-substituted copper di-Schiff base, a potent Cu₂Zn₂ superoxide dismutase mimic surviving competitive biochelation.* Inorganica Chimica Acta, 1995. Volume 233, Issues 1–2, Pages 11-19.
65. **Mauricio G, Lucía T, Milton A, Jesús DT, Ramón F.** *Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry.* Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999. 14, 885–888.
66. **Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, Morris MC.** *Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors.* Cancers (Basel)., 2015. Jan 23;7(1):179-237.
68. **Nikolietopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N.** *Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy.* Biochim Biophys Acta. , 2013 . 1833(12):3448-3459.

69. **Mamián-López M, Miguel RB, Huila MFG, Araki K, Temperini MLA, da Costa Ferreira AM.** *M. Mamián-López, R. B. Confocal Raman Imaging and Multivariate Analysis of Intracellular Modifications upon Treatment with Metal-Based Antitumor Compounds.* Submetido a publicação no Dalton Trans. DT-ART-02-2018-000491.
70. **El-Mashtoly SF, Yosef HK, Petersen D, Mavarani L, Maghnouj A, Hahn S, Kötting C, Gerwert K.** *Label-Free Raman Spectroscopic Imaging Monitors the Integral Physiologically Relevant Drug Responses in Cancer Cells.* Anal Chem. , 2015 . Jul 21;87(14):7297-304.
71. **Brazhe NA, Treiman M, Brazhe AR, Find NL, Maksimov GV, Sosnovtseva OV.** *Mapping of redox state of mitochondrial cytochromes in live cardiomyocytes using Raman microspectroscopy.* PLoS One. , 2012 . ;7(9):e41990.
72. **Hamada K, Fujita K, Smith NI, Kobayashi M, Inouye Y, Kawata S.** *Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells.* J Biomed Opt. , 2008 . Jul-Aug;13(4):044027.
73. **Matthäus C, Chernenko T, Newmark JA, Warner CM, Diem M.** *Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy.* Biophys J. , 2007 . Jul 15;93(2):668-73.
74. **Filomeni G, Piccirillo S, Graziani I, Cardaci S, Da Costa Ferreira AM, Rotilio G, Ciriolo MR.** *The isatin-Schiff base copper(II) complex Cu(isaepy)2 acts as delocalized lipophilic cation, yields widespread mitochondrial oxidative damage and induces AMP-activated protein kinase-dependent apoptosis.* Carcinogenesis. , 2009 . Jul;30(7):1115-24.
75. **Filomeni G, Cerchiaro G, Da Costa Ferreira AM, De Martino A, Pedersen JZ, Rotilio G, Ciriolo MR.** *Pro-apoptotic activity of novel Isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage.* J Biol Chem. , 2007 . Apr 20;282(16):12010-21.
76. **Modica-Napolitano JS, Aprille JR.** *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells.* Adv Drug Deliv Rev. , 2001. Jul 2;49(1-2):63-70.
77. **Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ.** *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.* J Biol Chem. , 2001 . Nov 9;276(45):42462-7. Epub 2001 Sep 24.
78. **Wesolowska O, Paprocka M, Kozlak J, Motohashi N, Dus D, Michalak K.** *Human sarcoma cell lines MES-SA and MES-SA/Dx5 as a model for multidrug resistance modulators screening.* Anticancer Res. , 2005 . Jan-Feb;25(1A):383-9.
79. **Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR.** *Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry.* Cancer Res. , 1982. Mar;42(3):799-806.
80. **Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM.** *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. , 1999. ;39:361-98.

81. **Murphy MP.** *Targeting lipophilic cations to mitochondria.* Biochim Biophys Acta. , 2008 . Jul-Aug;1777(7-8):1028-31.

82. **Wudarczyk J, Debska G, Lenartowicz E.** *Zinc as an inducer of the membrane permeability transition in rat liver mitochondria.* Arch Biochem Biophys., 1999 . Mar 1;363(1):1-8.

83. **Zanella A, Gandin V, Porchia M, Refosco F, Tisato F, Sorrentino F, Scutari G, Rigobello MP, Marzano C.** *Cytotoxicity in human cancer cells and mitochondrial dysfunction induced by a series of new copper(I) complexes containing tris(2-cyanoethyl)phosphines.* Invest New Drugs. , 2011 . Dec;29(6):1213-23.

84. **Swanson J.** *fluorescence microscopy of living cells in culture, part A: Fluorescent labeling of endocytic compartments.* Academic Press, 1989. 9:137-151.