UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

Projeto de Iniciação Científica:

Construção de cultura celular 3D de neuroblastomas para o estudo de viabilidade celular de novos complexos de cobre (II) para fins de terapia anticancerigena

**Maio/2022**

**Santo André**

**Resumo**

O cobre é o terceiro metal de transição mais abundante no meio biológico, e é elemento essencial à manutenção da vida. Dado a sua capacidade redox bastante versátil dentre os elementos da primeira série de transição, o cobre pode assumir as mais diferentes formas geométricas de coordenação e consequentemente sua alta reatividade pode ser controlada desta forma. Assim, sendo um elemento endógeno, cujas células possuem plena capacidade de regulação e transporte, e possuindo uma atividade redox que pode ser controlada, o cobre pode ser usado como um potencial fármaco contra células cancerígenas, e exatamente isso tem sido feito nos últimos 30 anos. Nosso grupo tem feito de maneira sistemática estas modificações na esfera de coordenação do cobre tanto alterando-se os ligantes ao formar complexos ou alterando o delicado equilíbrio do metal no interior da célula de modo a simular alterações metabólicas, patologias relacionadas ao estresse oxidativo e neurodegenerações. Seguindo nossa linha de trabalho, neste projeto de IC são propostas a utilização de novos complexos de cobre(II) com ligantes de origem vegetal obtidos naturalmente a partir de extratos de plantas que foram sintetizados e caracterizados em nosso laboratório, em estudos de viabilidade celular. Para isso serão utilizadas linhagens de neuroblastomas em cultura celular 3D. Os modelos 3D serão preparados através de técnica de agitação controlada em estufa de cultivo, e os novos complexos serão testados em relação a capacidade de causar morte nos esferoides formados. Este projeto faz parte de projeto de pesquisa regular FAPESP, e compõe importante estudo para compor um estudo fase 2 dos melhores complexos com ação anticancerígena, além de introduzir no grupo a cultura celular 3D.

**Abstract**

Copper is the third most abundant transition metal in the biological environment, and it is an essential element for the maintenance of life. Given its very versatile redox capacity among the elements of the first transition series, copper can assume the most different geometric forms of coordination and consequently its high reactivity can be controlled in this way. Thus, being an endogenous element, whose cells have full regulatory and transport capacity, and having a redox activity that can be controlled, copper can be used as a potential drug against cancer cells, and exactly this has been done in the last 30 years. Our group has systematically carried out these modifications in the copper coordination sphere, either by altering the ligands to form complexes or by altering the delicate balance of the metal within the cell in order to simulate metabolic alterations, pathologies related to oxidative stress and neurodegenerations. Following our work, this IC project proposes the use of new copper(II) complexes with plant-derived ligands obtained naturally from plant extracts that were synthesized and characterized in our laboratory, in cell viability studies. For this, neuroblastoma lines will be used in 3D cell culture. The 3D models will be prepared using a controlled agitation technique in a greenhouse, and the new complexes will be tested for their ability to cause death in the spheroids formed. This project is part of the regular research project from FAPESP, and composes an important study to compose a phase 2 study of the best complexes with anticancer action, in addition to introducing 3D cell culture to the group.

1. **Introdução**

Neste projeto de Iniciação científica pretendemos estudar a formação de cultura 3D de células de neuroblastoma, e testar estas culturas com os complexos de cobre desenvolvidos ao longo do projeto de pesquisa regular 2020/14175-0.

* 1. **Neuroblastoma**

O neuroblastoma (NB) é um tumor sólido extracraniano embrionária do sistema nervoso simpático, originário das células da crista neural com características biológicas, morfológicas, genéticas e clínicas extremamente heterogêneas, de modo que possui um caráter mais agressivo do que o ganglioneuroblastoma e o ganglioneuroma. Considerando que a metade de todos os casos são definidos como de alto risco (HR), com sobrevida global inferior a 40% em 5 anos diagnosticado como doença metastática (pacientes em estágio M) (FUSCO *et al.*, 2019), a falta de modelos *in vitro* capazes de recapitular a heterogeneidade intrínseca dos tumores primários do NB tem dificultado o progresso na compreensão da patogenia da doença e da resposta terapêutica (CORALLO *et al.*, 2020).

* 1. **Esferóides**

Estudos pré-clínicos *in vitro* de drogas candidatas anticancerígenas são geralmente conduzidos em culturas celulares bidimensionais (2D) bem estabelecidas, as quais ampliaram a compreensão dos mecanismos biomoleculares e biofísicos fundamentais ativos em ambas as condições fisiológicas e doenças. No entanto, este modelo, ao entregar às células em cultura um acesso ilimitado a oxigênio, nutrientes e metabólitos, gera-se a ausência de heterogeneidade tumoral e uma instabilidade genética, relacionada à necessidade de passagens consecutivas, podendo induzir a um acúmulo de mutações genéticas.

Nas últimas duas décadas, diante da necessidade de modelos tumorais *in vitro* mais complexos e confiáveis, houve um grande avanço de técnicas com culturas tridimensionais (3D) a partir de diversas metodologias de bioengenharia. Visto que o microambiente tumoral contribui significativamente para a iniciação, progressão e resistência do tumor à quimioterapia, sendo composto por células estromais, matriz extracelular (MEC) e fatores solúveis, providenciando suporte biofísico e bioquímico ao afetar a morfologia da célula cancerosa, expressão de genes e proteínas, migração, invasão e angiogênese, este microambiente deve ser reproduzido para que qualquer estudo obtenha resultados eficientes quando aplicados em testes clínicos.

Replicando ao máximo as condições *in vivo* ao simular o microambiente tumoral, retomando a complexidade da morfologia e polaridade do tumor (arquitetura tumoral, comportamento, características histopatológicas, assinaturas genéticas, perfil molecular e capacidade de resposta ao medicamento), as novas metodologias 3D *in vitro* permitiram uma maior quantidade de interações célula-célula e célula-MEC (CORALLO *et al.*, 2020; HARTWIG; KÖLL-WEBER; SÜSS, 2021).

Dentre os diferentes modelos 3D, o mais bem caracterizado para pesquisas referentes a câncer são os Esferóides Tumorais Multicelulares (MCTSs, do inglês Multicellular Tumor Spheroids), adquirida através da agregação de linhagens celulares de neuroblastoma sob condições de baixa adesão, ela foi a escolhida para reproduzir *in vitro* a interação que os complexos de cobre teriam com as células cancerígenas *in vivo*. Os MCTSs obtidos com a linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y apresentam maior sensibilidade à rapamicina e tricibina quando comparados à cultura 2D correspondente, enfatizando a importância dos modelos 3D in vitro como um sistema válido para testes iniciais de novos agentes anticancerígenos (BAHMAD *et al.*, 2018).

Caracterizados por um núcleo hipóxico que recapitula o gradiente de oxigênio e nutrientes e a penetração de drogas, visto que a taxa de proliferação se torna dependente da localização e é, portanto, maior na periferia dos esferóides, essa metodologia permite demonstrar que sinais bioquímicos nas células do neuroblastoma podem mudar drasticamente em resposta a mudanças em sua distribuição espaço-temporal. Além disso, a aplicação deste sistema 3D possibilita selecionar e testar compostos capazes de neutralizar a invasão de células de neuroblastoma. No caso deste projeto, iremos testar a ação de complexos de cobre formados por ligantes naturais (ATAT *et al.*, 2022).

No entanto, como na maioria dos modelos de cultura celular, os benefícios podem se tornar obstáculos, os quais no MCTS são significativos e devem ser ponderados. A densidade heterogênea e mutabilidade no tamanho dos esferóides afetam profundamente a resposta aos tratamentos com drogas, consequentemente dificultando reproduzir e confiar nos resultados obtidos. Ademais, ao longo prazo este tipo de cultura é dificultada, visto que são estruturas desprovidas de uma população de células-tronco capaz de autorrenovação do núcleo esferóide com acesso insuficiente à oxigênio, nutrientes e metabólitos e, portanto, necrótico. E, por fim, apesar de providenciar uma melhora na simulação da genética e microambiente do neuroblastoma quando em comparação às culturas 2D, ainda é infiel ao encontrado em humanos (CORALLO *et al.*, 2020).

* 1. **Construção de modelos celulares 3D**
     1. **Scaffold ou andaime**

O modelo de andaime, do inglês *scaffold*, muito vezes utiliza de uma matriz de colágeno para estabelecer sua estrutura, permitindo culturas de linhagens celulares como esferóides e, consequentemente, a observação da migração e invasão da células tumorais. Diferentes tipos de andaimes são investigados para estudos de neuroblastoma (CORALLO *et al.*, 2020). A técnica de sinterização (diminuição da energia livre superficial do conjunto de partículas) térmica para fabricação de andaimes rígidos com geometria definida fornece suporte mecânico para o crescimento celular, de modo que a morfologia e a distribuição das células dentro dos microcanais interconectados são diretamente influenciadas pela estrutura do andaime.

Outra forma é com uso de hidrogéis que mimetizam o meio extracelular para células que estão fundidas na sua estrutura, com a possibilidade das células serem geradas sobre a estrutura de hidrogel pré-fabricada. Hidrogéis a base de colágeno reproduze um microambiente 3D adequado para estudo das vias pró-migratórias ativadas nas células do neuroblastoma, permitindo analisar a eficácia de classe de medicamentos migrastáticos (CORALLO *et al.*, 2020). Por fim, a impressão de biotintas gera andaimes porosos com distribuição espacial definida.

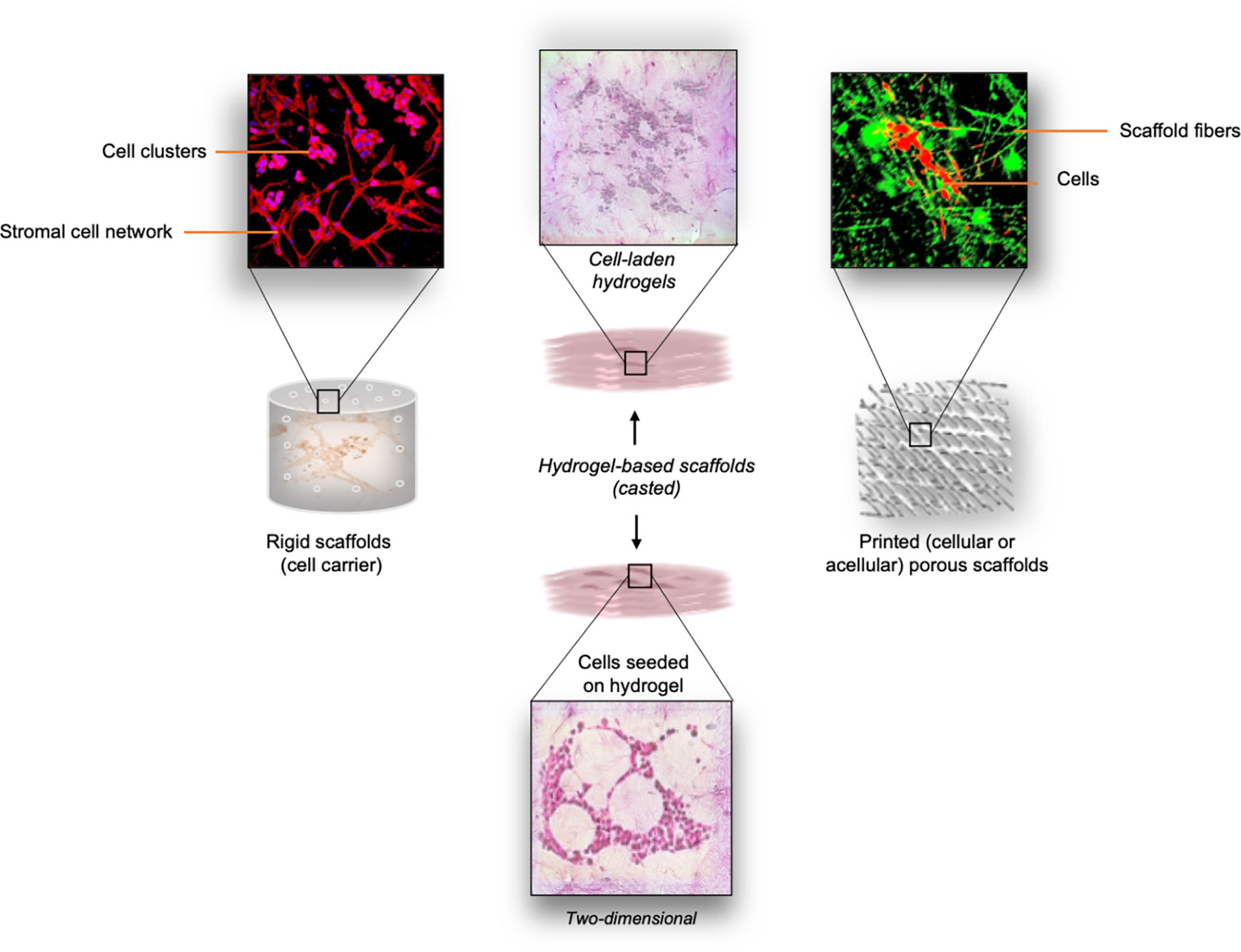


Figura 1: Diferentes formas de andaimes (CORALLO *et al.*, 2020).

Os biomateriais mais aplicados na fabricação dos andaimes são: colágeno, ácido hialurônico (HA), alginato, agarose, gelatina, fibrinogênio (natural); poli(co-glicólido lático) (PLGA), polietilenoglicol (PEG), poloxâmero 407 (Pluronic F127) e policaprolactona (PCL) (sintético); e gelatina metacrilada (GelMA) (semissintética) (CORALLO *et al.*, 2020). Especificamente para células do neuroblastomas do tipo SH-SY5Y, andaimes de micro e nanofibras de nanocelulose bacteriana revestidos por colágeno reforçam a adesão, assim como as fibras eletrofiadas, que, além disso, favorecem a proliferação e favorecem a formação de neuritos ao garantir alta porosidade das construções.

Outra nanofibra aplicada em modelos 3D de neuroblastomas são os scaffolds de nanofibras inorgânicas aumentadas de grafeno (GAIN), as quais, apesar de não mimetizar por completo a organização de células 3D semelhantes a tumores, abrem a oportunidade para uma validação rápida e altamente reprodutível de drogas anticâncer orientadas para a modulação da migração celular (CORALLO *et al.*, 2020).

Apesar de todas essas vantagens, o uso de andaimes porosos pré-formados tem como limitação a baixa reprodutibilidade da localização espaço-temporal de mais de um tipo celular, de modo que bioimpressão e plataformas microfluídicas, em conjunto, ampliam as possibilidades de triagem de drogas de alto rendimento para neuroblastoma em condições 3D.

* + 1. **Agitação**

Os modelos 3D por agitação geram esferoides com características de tumores nativos dependendo da linhagem celular, isto é, morfologia, proliferação e gradiente de hipóxia (SANTO *et al.*, 2016), incluindo métodos de rotação giratória (como agitadores giratórios), sistemas de cultura rotativa e sistemas de cultura em suspensão agitada (Hickman et al., 2014, Serra et al., 2012). Todas estas metodologias envolvem forças hidrodinâmicas ajustadas durante o cultivo para proporcionar interações e consequente agregação celular (Alves et al., 1996), o que demonstra sua simplicidade, baixo custo e produção eficiente de agregados.

Buscando comparar a eficácia da Hipericina-Terapia fotodinâmica (PDT) em culturas de carcinoma colorretal (CCR) 2D e esferoide, um experimento gerou a cultura de esferoides de frasco giratório por meio de técnicas de flutuação forçada e agitação (KHOT *et al.*, 2018). A PDT conta com a administração de um fotossensibilizador retentor de tumor (OS), envolvendo uma metodologia com incidência de luz para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam morte celular, enquanto que a hipericina, por sua vez, é um composto fotoativo achado na Erva de São João (*Hypericum perforatum*), destacado por sua aplicação medicinal em estudos pré-clínicos de câncer.

Alcançando a confluência de 80-90% após mantidas em condições ideais (37ºC, 5% C, 95% CO2), as culturas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco e incubadas por 5 minutos com 0,05% (v/v) de tripsina e 0,5% (v/v) de EDTA em DPBS. Com as células tripsinizadas, adicionou-se o meio contendo 10% (v/v) de FBS e as suspensões celulares foram centrifugadas (400g por 5 minutos), seguido do descarte do sobrenadante e ressuspensão das células peletizadas em meio fresco, finalmente sendo cultivadas em frascos de cultura de tecidos de 75 cm2 até 80-90% de confluência para os experimentos.

Para a PDT, as culturas esferoides foram mantidas em solução gelificada de agarose 1% em uma placa de 96 poços (500 células/poço, 50µL de agarose 1%/poço), a qual foi centrifugada (360 g por 10 minutos) após adição das células e incubadas (37ºC, 5% C, 95% CO2) por 48 horas. Em seguida, ambas a culturas (2D e esferoides) foram tratadas com hipericina no escuro por 16 horas, antes de serem lavadas, e mantidas em meio. Dependendo das condições experimentais, as culturas foram irradiadas com luz ou mantidas no escuro à temperatura ambiente (KHOT *et al.*, 2018).

Para avaliar a viabilidade celular, foi realizada a quantificação e visualização de citotoxicidade, a cultura de esferoides foi colocada em frasco giratório e, por fim, a coloração de imunofluorescência foi realizada (KHOT *et al.*, 2018). A quantificação de citotoxicidade foi realizada vinte e quatro horas após a irradiação, com as culturas tratadas com iodeto de propídio (1,3 μg/mL) por 15 minutos, seguido de duas lavagens com DPBS e adição de meio fresco novamente, a fim de que a fluorescência fosse medida num Leitor de Microplacas Mithras LB 940.

A visualização da citotoxicidade também foi realizada vinte e quatro horas após a irradiação, com as culturas de esferoides simultaneamente incubadas com iodeto de propídio (1,3 μg/mL) por 15 minutos e Hoechst 33342 (5 μg/mL) por 60 minutos, com os esferoides posteriormente lavados e a fluorescência observada usando o EVOSTM FL Imaging System. Então, houve a lavagem, tripsinização e transferência das células para frascos giratórios CELLSPIN Stirrer, nos quais foram cultivadas em meio de cultura com agitação constante a 75 rpm em plataforma agitadora e incubadas a 37ºC, 5% C e 95% CO2 (KHOT *et al.*, 2018), com troca de meio a cada três dias e, após quinze a vinte dias, os esferoides foram usados para experimentos.

Por fim, para o procedimento da coloração de imunofluorescência, os esferoides resultantes foram incorporados em leito Cryo-M e seccionados (5 µm) em lâminas de vidro usando um Criostato Leica CM3050 S Research. As secções foram então fixadas com PFA a 4%, bloqueadas com leite desnatado a 0,5% e incubadas com anticorpo anti-BCRP (1:20, BXP-21) por uma hora em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS e incubação com um anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (1:300) por 30 min à temperatura ambiente, houve lavagem e montagem das lâminas e lamínulas utilizando ProLongTM Gold Antifade Mountant com DAPI e fotografias foram realizadas com Zeiss Axio Imager Z1.

* + 1. **Biorreatores**

Os biorreatores são caracterizados como plataformas projetadas para estudar a modelagem celular *in vitro* e possui muitos benefícios, uma vez que possibilita utilizar poucas quantidades de reagentes e de células, além de que, quando miniaturizados, apresenta portabilidade, versatilidade e integração com outros equipamentos presentes na triagem de drogas de alto rendimento (CORALLO *et al.*, 2020). Neste estudo, um biorreator miniaturizado opticamente acessível (MOAB) foi desenvolvido com base em um protótipo de Raimondi et al., visando analisar os efeitos de um campo magnético estático em células de neuroblastoma SH-SY5Y.

O equipamento, com o potencial de estudos de neurodegeneração ao testar construções celulares 3D perfundidas para diferentes estímulos, é composto por três camadas de culturas independentes. Cada camada possui seu andaime de poliestireno e trava magnética, visto que possui dois imãs que garantem uma vedação hidráulica durante a perfusão das estruturas tridimensionais.

Já para o estudo vascular de neuroblastoma, um modelo denominado VITVO (Rigenerand srl, Itália) foi desenvolvido a partir do cultivo dessas células tumorais pré-vascularizadas separadas por camadas de fibrina em um biorreator de perfusão. Este modelo é um biorreator pequeno e portátil, integrando matriz à base de fibras sintéticas e biocompatíveis, podendo hospedar várias tipos celulares e até co-culturas (CORALLO *et al.*, 2020).

O experimento de Santo et. al. para geração de esferoides de células tumorais em sistemas de cultura em tanque agitado, ao incubar (37ºC, 5% CO2) uma suspensão celular única em vasos giratórios em agitador magnético, determinou e controlou a agregação celular e o tamanho do esferoide por meio da manipulação da taxa de agitação (SANTO et al., 2016), a qual foi ajustada para limitar a fusão e, assim, viabilizar a formação inicial de agregados e compactação do esferoide. Em seguida, uma vez agregados, compactos e esféricos, os sistemas de cultura baseados em agitação podem ser combinados com microencapsulação de alginato.

Um vez encapsulados, o alginato realiza o papel de *scaffold* ao aprisionar as células, fornecendo suporte físico, confinamento celular e, assim, um meio de cultura a longo prazo de agregados de células tumorais isoladamente ou em combinação com fibroblastos, continuamente monitorado com amostragem não destrutiva (ESTRADA *et al.*, 2016).

* + 1. **Co-cultura**

Todas essas técnicas citadas e as pontuadas posteriormente podem ser aplicadas em co-culturas que mimetizem ainda mais o microambiente dos neuroblastomas ao incluir outras células necessárias para sua manutenção, como astrócitos e micróglia. Corallo et. al. utilizou o Sistema Micro Fisiológico Cerebral (BMPS) de tetra cultura 3D, composta por neuroblastoma (N2a), astrócitos (C8-D1A), e microglia (BV-2), em conjunto com células endoteliais (bEnd.3) garantindo o ambiente neurovascular, tendo como meio de cultivo uma solução de colágeno tipo I para recriar o parênquima cerebral.

Tratando-se sobre a organização 3D adequada, condições de perfusão na plataforma micro fluídica possibilitam a aplicação para imagens automatizadas de alto rendimento e alto conteúdo com leituras relativamente rápidas. No entanto, é necessário legitimar o uso desta técnica na triagem de rotina de medicamentos (CORALLO *et al.*, 2020).

Em modelos de dupla co-cultura, esferoides podem ser constituídos de células cancerígenas e fibroblastos (MIYAZAKI *et al.*, 2019), de modo que os fibroblastos penetram na matriz de colágeno e formam a trilha pela qual as células cancerígenas migram, sem a necessidade da junção heterofílica E caderina/N caderina, normalmente essencial para a migração das células tumorais. Já em modelos de tripla co-cultura pode-se incluir, além dos fibroblastos: células endoteliais ou macrófagos (ATAT *et al.*, 2022).

Células endoteliais podem proporcionar células cancerígenas de fenótipo agressivo (AMANN *et al.*, 2017) e modelos de tumor sólido vascularizado, apresentando potencial para analisar a eficiência e toxicidade de agentes quimioterápicos (PAEK *et al.*, 2019). Além disso, a presença das células endoteliais produziu um nível mais alto de vários fatores pró-angiogênicos, pró-inflamatórios e indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT), possibilitando uma capacidade invasiva ao desenvolver estruturas semelhantes a túbulos, algo que pode ser confirmado a partir da técnica de nanofilme fibronectina-gelatina camada por camada (LbL, do inglês *Layer-by-Layer*) (WANG *et al.*, 2017).

Macrófagos, por outro lado, ao serem incubados com esferoides mistos formados por fibroblastos e esferoides tumorais do pulmão, são recrutados por altos níveis de citocina e fatores de crescimento como GM-SCF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e M-SCF (Fator de células-tronco murinas), de modo que essas moléculas são detectadas no sobrenadante dos esferoides tumorais cultivados em cultura agitada e microcápsula de alginato (KUEN *et al.*, 2017).

Além dessas combinações, células tumorais podem ser co-cultivadas com células T Vδ2, uma subpopulação de linfócitos predominante no sangue periférico humano (VARESANO; ZOCCHI; POGGI, 2018). Nesta pesquisa foram usados esferoides de CCR, gerados com uso do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e 3 outros ligantes naturais de Fator de Crescimento Transformante-α (TGFα), monitorando a proliferação e dimensão até o 14º dia e com triplicados analisados para cada condição de cultura (150 esferoides/experimento), de modo que os experimentos foram realizados no 6º dia da formação dos esferoides (vivas e com diâmetro de aproximadamente 250 µm).

* + 1. **Coating (revestimento)**

Em um estudo seminal, tumores foram removidos cirurgicamente, seccionados (2 mm de diâmetro) e posicionados em matrizes de gel de colágeno (VESCIO *et al.*, 1987), de modo que o DNA celular foi marcado em todas células que sofreram replicação dentro dos tumores, devido à exposição da emulsão NTB-2 ao DNA radioativo. Após esta marcação, as culturas foram, colocadas em cápsulas histológicas e fixadas em formol (10%), buscando desidratar para posteriormente embebê-las em parafina e seccioná-las. Finalmente, desparafinizadas, as culturas foram preparadas para autorradiografia por revestimento.

* + 1. **Organoides**

Os organoides são agregados celulares 3D originados *in vitro* capazes de auto renovação e organização, exibindo funções semelhantes ao órgão. São gerados, normalmente, a partir de células-tronco embrionárias (ECS) ou pluripotentes induzidas (iPSC), de modo que muitos foram estabelecidos para diversos tipos de câncer (FUSCO *et al.*, 2019). Apesar dos Organoides Tumorais Derivados do Paciente (PDTOs) apresentarem muitas semelhanças fenotípicas e genéticas com seu tumor de origem, assim contendo grande potencial para diversas aplicações, a geração de culturas organoides a partir amostras de neuroblastoma primário continua sendo um grande desafio (FUSCO *et al.*, 2019).

Em outra pesquisa, ESCs/iPSCs foram usados para gerar culturas de corpos embrioides (EB) (HEYDARI *et al.*, 2021), os quais podem gerar aglomerados de células neuroepiteliais que se auto-organizam em estruturas semelhantes a estruturas estratificadas complexas que retomam o córtex cerebral em desenvolvimento, geradas pela extensão do tempo gasto na fase inicial de cultura 3D antes do plaqueamento em placas pré-revestidas.

* 1. **Complexos metálicos no tratamento de câncer.**

Os complexos metálicos são interessantes para o tratamento de câncer. Os metais possuem seus orbitais d parcialmente preenchido e isso proporciona características únicas, entre elas o potencial redox, diversas estruturas de coordenação possíveis, geometrias das mais diversas além de diferentes reatividades com moléculas orgânicas. Propriedades essas que estão ausentes nos fármacos atuais a base de carbono (FREZZA *et al.*, 2010). Os compostos baseados em metais podem se ligar a biomoléculas de forma seletiva alterando mecanismos celulares, como indução de apoptose (CARTER *et al.*, 2016), aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, diminuição do potencial de membrana da mitocôndria (ZHANG *et al.*, 2016), fragmentação do DNA (AZAB *et al.*, 2013), inibição do processo de transcrição (WANG *et al.*, 2014). Além de interações com proteínas específicas, como inibição da PARP-I (WANG *et al.*, 2014) e da TrxR (FERNÁNDEZ-GALLARDO *et al.*, 2014) e ativação da caspase-3 e caspase-7 (FLORINDO *et al.*, 2015).

Vários compostos à base de metal foram sintetizados com propriedades anticâncer, alguns dos quais já estão em uso na prática e outros em fase de testes clínicos, ou pré-clínicos. Nos últimos anos o desenvolvimento de fármacos a base de complexos metálicos não foca mais apenas em citotoxicidade e sim em um design racional da estrutura da molécula com alvos celulares específicos (FREZZA *et al.*, 2010).

A descoberta da cisplatina a décadas atrás representou um avanço expressivo na busca de terapias para o câncer. A partir disso foram realizados esforços para o desenvolvimento de compostos com outras estruturas como a carboplatina e oxaliplatina que fazem parte da segunda e terceira geração dos complexos de platina, respectivamente. Tais complexos são recomendados para o tratamento de diversos tipos de câncer, como câncer de ovário, colo de útero, testículos, cabeça e pescoço, mama, bexiga, estômago, próstata e pulmão. Suas atividades também se estendem a linfomas, neuroblastomas, sarcomas, melanomas e mieloma múltiplo (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011). A atividade dos complexos de platina está totalmente relacionada a sua cinética de troca de ligante, embora essas ligações sejam mais fracas que ligações C-C, C-N ou C-O a troca de ligante acontece de maneira lenta, configurando uma alta estabilidade cinética. Os complexos a base de platina têm como alvo sua ligação ao DNA interferindo em vários processos celulares, incluindo transcrição e replicação do DNA provocando assim a morte celular via apoptose (FREZZA *et al.*, 2010). Além de poder interagir com o DNA mitocondrial e proteínas. Contudo, devido a problemas recorrentes como elevada toxicidade, incluindo neurotoxicidade, hepatotoxicidade, efeitos colaterais gastrointestinais e resistências indesejáveis (LIN *et al.*, 2019), têm se buscado alternativas inovadoras como as próximas gerações de complexos de platina ou a utilização de complexos contendo outros íons metálicos, como cobre(II), zinco(II), ouro e rutênio (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017).

* 1. **Complexos de Cobre**

De acordo com seu estado de oxidação, o cobre fará uma interação distinta com os ligantes. O cobre em sua forma reduzida (Cu+), possui orbital d completamente preenchido, essa configuração d10 não possui uma forte preferência por alguma geometria específica, baseada na energia de estabilização do campo ligante. O cobre nessa forma mostra preferências por ligantes suavemente doadores, entre eles enxofre como a cisteína ou metionina, aminas aromáticas, fósforo ou carbono. Já o Cu2+, possui uma configuração d9, com um elétron desemparelhado, permitindo assim transições eletrônicas d-d e o efeito Jan-Teller. A camada d incompleta permite hibridizações, por isso tem uma variedade nas suas geometrias. Tende a formação de complexos de número de coordenação de quatro a oito. Sendo as mais predominantes são 4 (quadrado planar), 5 (bipirâmide trigonal ou pirâmide de base quadrada) e 6 (octaédricas distorcida ou tetragonaol). A grande variedade de arranjos possíveis permite a utilização de diversos tipos de ligantes, sendo suas propriedades variadas conforme a natureza dos seus ligantes, efeitos estéricos e natureza do átomo doador (RORABACHER, 2004).

Os complexos de cobre demonstram serem mais versáteis em relação a sua atividade quando comparado aos complexos de platina, além de serem menos tóxicos. Analogamente os complexos de platina, os complexos de cobre possuem a habilidade de interagirem com o DNA, tendo assim uma atividade citotóxica. Outra atividade evidenciada desses compostos é a inibição das topo isomerases, que são enzimas essenciais para os processos de replicação e transcrição do DNA (SANTINI *et al.*, 2014). A capacidade redox dos complexos de cobre também confere uma ação anticancerígena, já que é capaz de produzir radicais livres intracelularmente. Essa capacidade redox pode mudar drasticamente de acordo com a natureza do ligante. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da interação dos complexos de cobre com a catálise de substratos endógenos, podem desencadear um processo de stress oxidativo, que danificam biomoléculas podendo gerar processos apoptóticos (SHI; HUDSON; LIU, 2004).

Uma classe importante de complexos de cobre são aqueles formados pelos ligantes do tipo tiossemicarbazonas, que são N, S-doadores, capazes de se ligar ao cobre de forma aniônica. São complexos com baixa solubilidade em água e possuem capacidade antifúngica, antibacteriana, antivirais, anti-inflamatórios e quimioterápicos, com potencial de comprometer a atividade de células cancerosas via inibição da síntese de DNA. As tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre são uma importante classe de compostos que foram amplamente estudados nos últimos anos, principalmente por causa de seu amplo perfil de atividade farmacológica (ARJMAND; YOUSUF, 2013; PAHONŢU *et al.*, 2016).

As bases de Schiff são uma classe de compostos orgânicos que se caracterizam pelo grupo imina, formado pela reação de condensação do grupo amina primária de uma molécula com o grupo aldeído ou cetona de outra, a reação de síntese da imina é reversível, envolvendo um intermediário de carbinolamina e a eliminação de moléculas de água. Por possuírem um grupo N2O2 como doador fazem parte de um gama extremamente versátil de ligantes utilizados na química de coordenação. Seus complexos com o cobre tem a capacidade de se ligar ao DNA, formação de radical hidroxila intracelular, ação citotóxica e promovem apoptose (ARJMAND; YOUSUF, 2013; SANTINI *et al.*, 2014).

As polipiridinas e seus derivados estão presentes em uma grande variedade de compostos que compartilham a estrutura da piridina. Uma série de complexos de cobre com ligantes derivados da piridina tem ações citostáticas em ensaios in vitro, além de um potencial citotóxico maior que a cisplatina (PUSZKO *et al.*, 2011; SANTINI *et al.*, 2014).

* 1. **Metabolismo do Cobre**

O cobre é um micronutriente essencial, um homem adulto contém aproximadamente 100 mg de Cu pelo corpo. É um importante cofator catalítico e componente estrutural de proteínas envolvido em diversos processos bioquímicos essenciais para a vida. O cobre pode existir em dois estados de oxidação em sistemas biológicos Cu2+ e Cu+, tendo cada um deles afinidade por ligantes específicos, o Cu2+ tem preferência por ligantes de enxofre como a cisteína e metionina, já o Cu+ se liga preferivelmente a doadores nitrogenados, como a histidina ou oxigenados como glutamato e aspartato. Essa propriedade redox é responsável pela catálise de uma ampla gama de processos enzimáticos com alta importância em processos biológicos (LINDER, 1996).

A obtenção do cobre ocorre através da alimentação, o intestino delgado é responsável pela maior parte da absorção desse micronutriente através das células epiteliais desse tecido. Uma vez que o cobre atravessa o intestino ele é transportado para o fígado onde ocorre a incorporação desse metal a proteínas, entre elas a ceruloplasmina, albumina e outras proteínas. Essas proteínas têm uma função fundamental na distribuição e absorção do cobre, já que a maior parte do cobre cérico está ligado principalmente a ceruloplasmina (HELLMAN; GITLIN, 2002).

No processo de absorção do cobre pela célula, o metal é inicialmente reduzido pela ação de proteínas redutases férrica/cúprica presente no exterior da célula, esse processo é necessário devido ao alto teor redutor do citosol. Em seguida a entrada do cobre na célula acontece através de uma proteína integral de membrana rica em histidina e metionina, transportadora de cobre (CTR1). As proteínas transportadoras de cobre dependentes de ATP, ATP7A e ATP7B, desempenham também um importante papel na homeostase do cobre, incluindo a entrega intracelular de cobre para inclusão em metaloproteínas, tráfico de membrana e excreção de cobre em excesso das células. Mutações nos genes que codificam essas proteínas causam anomalias como a doença de Menkes (ATP7A) e Wilson (ATP7B) (LUTSENKO *et al.*, 2007).

Uma vez dentro da célula, o cobre se liga à metalochaperonas que guiam o metal a destinos intracelulares específicos em outras proteínas. As chaperonas CCS, COX17 e ATOX1 são responsáveis por transferir o cobre à superóxido dismutase (SOD), citocromo c oxidase e as cobre ATPases, respectivamente. Essas transferências são realizadas através de interações específicas proteína-proteína, de modo que o cobre não fique livre no interior da célula. Por isso estima-se que haja apenas um átomo de cobre livre por célula, já que ele está sempre ligado a proteínas (DENOYER *et al.*, 2015).

* 1. **Produtos naturais**

Produtos naturais, ao longo de milhares de anos tem sido empregado na forma de extratos vegetais como medicamento no tratamento de diversas doenças. Estudos químicos e farmacológicos desses medicamentos tradicionais, foram o primeiro passo para o desenvolvimento de medicamentos. O número total de espécies vivas no planeta Terra ultrapassa os oitos milhões (KHAN, 2018), todas elas produzem substâncias químicas denominadas produtos naturais. Os produtos naturais são divididos em duas classes, os primários e secundários (metabolitos secundários). Os produtos naturais primários são os principais envolvidos em processos moleculares fundamentais, como crescimento, desenvolvimento, e reprodução da espécie. Por outro lado, os produtos naturais secundários possuem uma estrutura química complexa e geralmente não são essenciais para processos básicos como crescimento, desenvolvimento e reprodução (KOWALSKI, 2018). No entanto eles desempenham funções importantes, são produzidos muitas vezes em situações de adversidade e para combater organismos concorrentes. Além de serem responsáveis pelo odor, cor, sabores de plantas e servirem como atração para animais polinizadores.

Extratos obtidos de fontes vegetais como os fotoquímicos tem diversas aplicações como corantes, perfumes, ação psicoativa e principalmente como medicamentos antibacterianos, antifúngicos e anticancerígenos. Avanços em técnica química de separação e purificação permitiu o isolamento de compostos bioativos, de bactérias, fungos, plantas e invertebrados. Incluindo espécies raras extremófilas de difícil acesso (DELGODA; MURRAY, 2017).

Produtos naturais bioativos apresentam enorme importância em diversas aplicações químicas e biológicas, entretanto, apenas uma pequena porcentagem da flora tem sido investigada de forma aprofundada, demonstrando que a biodiversidade vegetal permanece pouco explorada. Diversas metodologias têm sido utilizadas na descoberta de novas drogas a partir destes recursos vegetais. Nesse sentido, diversos estudos são direcionados para a avaliação das atividades biológicas de compostos naturais ativos de plantas, bem como a investigação dos mecanismos de ação dos compostos com esse potencial, buscando estes, nos recursos regionais, como o bioma Mata Atlântica (BERLINCK *et al.*, 2017).

A mata atlântica constitui um vasto e complexo ecossistema contribuindo substancialmente para a biodiversidade brasileira, sendo considerado um hot stop de biodiversidade, sendo um dos biomas mais ricos do mundo (ZWIENER *et al.*, 2017). Com isso temos uma enorme gama de espécies a serem estudadas, de forma a extrair compostos bioativos, entre elas *Ocotea puberula* e *Piper tuberculatum.*

*Ocotea puberula* (Rich.) Nees é uma espécie encontrada em todas as regiões do país, várias pesquisas têm sido feitas no objetivo de isolar e caracterizar compostos dessa espécie, já que acumulam uma enorme variedade de metabólitos bioativos (SALLEH; AHMAD, 2017). Dentre esses compostos se destacam os alcalóides aporfínicos, que são moléculas formadas por quatro anéis, possuindo um sistema difenílico, podendo ser di-, tri-, tetra-, penta- ou hexa substituído (TSEOMASHKO *et al.*, 2013). Alguns desses alcalóides já mostraram atividade biológica tais como antiparasitária e citotóxica (DANTAS *et al.*, 2020).

A *Piper tuberculatum*, conhecida no nordeste brasileiro como “pimenta longa” ou “pimenta-’arta” tem sido utilizada como antídoto para picada de cobra, sedativo e tratamento de problemas estomacais. Essa espécie produz amidas, que possuem ação antifúngica, inseticida e atividade antitripanossoma (REGASINI *et al.*, 2009; SALEHI *et al.*, 2019).

* 1. **Complexos metálicos de produtos naturais**

Produtos naturais tem uma gama de ações como citando anteriormente, porém existem aqueles que conseguem se coordenar a metais. Um bom número de produtos naturais possui capacidade de quelar íons metálicos, incluindo peptídeos cíclicos, ionóforos, sideróforos, fitoquelatinas, flavonóides e outros tipos de compostos, como polissacarídeos e oligossacarídeos (SHI *et al.*, 2015). A coordenação do metal a um produto natural, pode potencializar sua atividade biológica, um exemplo disso são os flavonoides que possuem uma ampla e potente atividade biológica. Porém complexos flavonoides-metais tem ainda mais eficácia quando comparado a flavonoides isolados. Estudos têm mostrado que os complexos flavonóides-metal têm uma combinação de ampla utilização para várias doenças, incluindo infecções bacterianas, diabetes mellitus e até mesmo câncer (KOSTOVA; BALKANSKY, 2013; QIAN *et al.*, 2015).

Complexos formados pelo ácido hennotânico (2-hidroxi-1,4 naftoquinona) pigmento laranja-vermelho isolado das folhas de Lawsonia inermis coordenados a vários íons metálicos como Zn(II), Co(II), Cu(II), Ni(II) e Mn(II) tem sido reportados na literatura possuindo forte ação anticancerígena podendo induzir apoptose via ativação da caspase em células de hepatocarcinoma. Derivados do ácido hennotânico coordenados ao íon Cu(II) exibiram atividades antitumorais significativas em células de câncer de mama humano (ORAMAS-ROYO *et al.*, 2013).

As antraquinonas (9,10-dioxoantracenos) são uma classe de compostos de ocorrência natural e muito abundantes, sendo comuns em diversos organismos, como bactérias, fungos, plantas e alguns animais. As plantas são fonte de cerca de 200 compostos pertencentes a esta classe, e estão presentes em raízes, rizomas, flores e frutos (DIAZ-MUÑOZ *et al.*, 2018). Complexos de vanádio (V) com antraquinonas exibem atividades anticâncer in vitro contra células de carcinoma de cólon via regulação de ROS. Já os complexos de Ru (II) exibem atividades anticâncer contra linhagens celulares cervicais, de mama adenocarcinoma e carcinoma hepatocelular além de atuar na inibição da topoisomerase I e II e intercalação de DNA (DU *et al.*, 2013; KOU *et al.*, 2012).

As tetraciclinas foram desenvolvidas como resultado da pesquisa de organismos antibióticos em amostras de solo. Modificações estruturais deram origem a outros antibióticos importantes como doxiciclina e minociclina (DOUGHERTY; PUCCI, 2014). Complexos de Cu(II) e tetraciclina apresentaram grande interação com o DNA inibindo crescimento de células leucêmicas. Além disso complexos de Pt(II) de tetraciclina e doxiclina também apresentaram propriedades antitumorais inibindo o crescimento de células de leucemia mieloide crônica (KHAN; MUSTAFA; MUSARRAT, 2003; SILVA *et al.*, 2010).

A curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) 1,6-heptadieno-3,5-diona], obtida do rizoma de Curcuma longa é uma planta da família Zingiberaceae, mesma família do gengibre. É um composto amarelo presente na cúrcuma (uma especiaria tradicional usada em culinária indiana), sendo também o principal pigmento amarelo no caril e na mostarda. Esse composto demostrou diversas ações como atividade anticâncer, incluindo efeitos como agente antiproliferativo, anti-invasivo e antiangiogênico (PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). A porção α, β-insaturada β-diceto da curcumina permite a formação de complexos muito estáveis com a maioria dos íons metálicos conhecidos permitindo uma abordagem nova e promissora desse tipo de composto. Sendo maioria da atividade anticâncer descrita para complexos de Cu (II), derivados de V e Zn. Complexos de Cu(II) - curcumina apresentaram a capacidade de geração de ROS, danos ao DNA e desencadeamento de processos apoptóticos em células cancerosas. Assim a presença do cobre aumenta significativamente a atividade antitumoral frente a células de câncer de mama, cervical, cólon e pancreático quando comparado ao ligante sozinho (BANERJEE; CHAKRAVARTY, 2015; WANNINGER *et al.*, 2015).

Os alcalóides já citados anteriormente também possuem a capacidade de se complexar a metais, como Cu(II), Au(III), Zn(II), Co(II), Mn(II) e Pt(II). Possuindo ação antitumoral, interação com o DNA, inibição da topoisomerase I e efeitos citotóxicos (AHMAD KHAN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2011; HERAS *et al.*, 2018).

1. **Justificativa**
2. **Objetivo**

O projeto tem como objetivo realizar testes *in vitro* com modelos 3D esferóides de células do neuroblastoma, investigando a possível ação anticancerígena dos novos complexos de cobre utilizando metabólitos de plantas como ligantes, oriundos do projeto de pesquisa FAPESP 20/14175-0.

1. **Objetivos específicos**

Estabelecimento de Esferóides Tumorais Multicelulares (MCTSs) pelo método de agitação. Teste de viabilidade celular e morte celular com Kit especifico após ação dos complexos de cobre.

1. **Metodologia**
   1. **Síntese dos complexos de cobre(II)**

Os complexos de cobre descritos na figura 2 foram sintetizados e caracterizados no grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), e serão utilizados purificados pela aluna, para os testes em cultura de esferoide.

* 1. **Formação dos MCTSs**

Para a formação dos MCTSs serão testados alguns métodos descritos na introdução deste projeto, em especial métodos mais simples envolvendo agitação especifica em meio de cultura. As células utilizadas serão SH-SY5Y e CHP-212, ambas neuroblastomas adquiridas da ATCC (USA) e capazes de formar esferoides e cultura 3D.

* 1. **Análise de viabilidade celular em cultura 2D**

A viabilidade celular será avaliada pelo método do MTT. Após os tratamentos feito tanto com os ligantes isolados, quanto com os complexos a fim de comparar sua ação. As células serão incubadas com MTT (0,5 mg/ml em tampão HEPES/salina) por 30 minutos a 37°C. O MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolium) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (LIU *et al.*, 1997). O formazam é solubilizado com a adição de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em 550 nm em uma leitora de placas de 96 poços. A atividade mitocondrial (viabilidade celular) é diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT e, portanto, à produção de cromógeno.

* 1. **Análise de viabilidade celular em cultura 3D**

Para analisar a viabilidade celular nos MCTSs, será utilizado o Kit LIVE-DEAD da Thermo, seguindo seu modo de uso. Neste kit, se usa cromóforos que reagem a substâncias do metabolismo indicando se as celulas estão vivas ou mortas em cada organoide, através de análise em microscópio de fluorescência. Os complexos de cobre(II) da Fig 1 serão incubados na cultura MCTSs nas concentrações pre-determinadas em seu IC50 e 2x o IC50. A partir daí as análises de quantidade de células vivas e mortas em cada organoide será realizada, e os resultados comparados com os obtidos na cultura 2D das mesmas culturas. Com isso será possível obtermos um panorama sobre a ação destes complexos em MCTSs cerebrais.

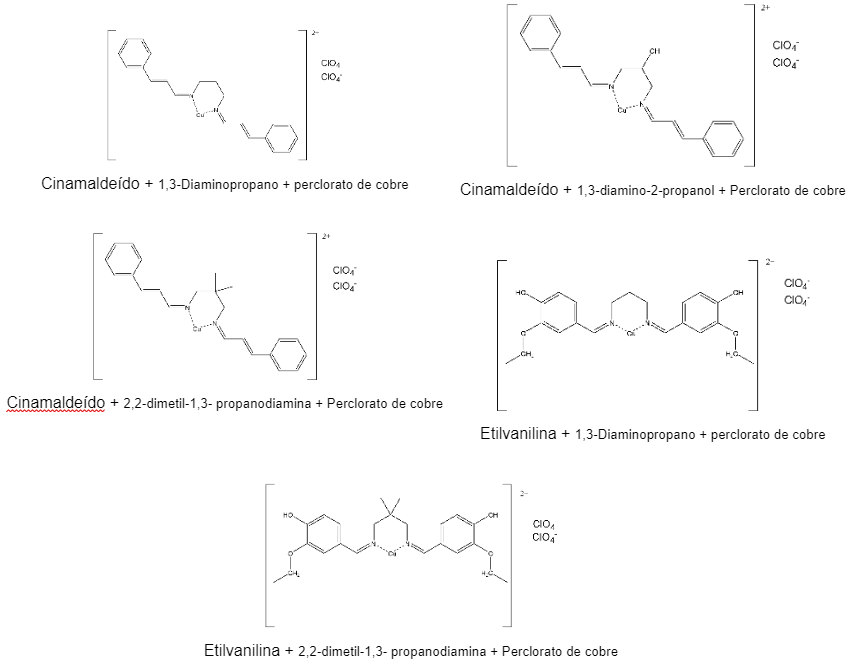


Figura 2. Complexos de Cu(II) que serão testados no projeto (complexos preparados e caracterizados no projeto de pesquisa 20/14175-0).

1. **CRONOGRAMA**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1º trimestre | 2º trimestre | 3º trimestre | 4º trimestre |
| Buscas bibliográficas | x | x | x | x |
| Testes de preparação de esferoides | x | x |  |  |
| Testes celulares cultura 2D | x | x |  |  |
| Execução dos experimentos com o método adequado de esferoides, e verificação da viabilidade celular |  | x | x | x |
| Elaboração de relatório |  | x |  | x |

1. **Referências**

AHMAD KHAN, Rais *et al.* Light-stable bis(norharmane)silver(I) compounds: Synthesis, characterization and antiproliferative effects in cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [*s. l.*], v. 140, p. 1–5, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.06.019.

AMANN, Arno *et al.* Development of a 3D angiogenesis model to study tumour - endothelial cell interactions and the effects of anti-angiogenic drugs. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

ARJMAND, Farukh; YOUSUF, Imtiyaz. Synthesis, characterization and in vitro DNA binding of chromone Schiff base organotin(IV) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, [*s. l.*], v. 743, p. 55–62, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.06.018.

ATAT, Oula El *et al.* 3D modeling in cancer studies. **Human Cell**, [*s. l.*], v. 35, n. 1, p. 23–36, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13577-021-00642-9.

AZAB, Hassan A. *et al.* Bis(acridine-9-carboxylate)-nitro-europium(III) dihydrate complex a new apoptotic agent through Flk-1 down regulation, caspase-3 activation and oligonucleosomes DNA fragmentation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 21, n. 1, p. 223–234, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.10.020.

BAHMAD, Hisham F. *et al.* The Akt/mTOR pathway in cancer stem/progenitor cells is a potential therapeutic target for glioblastoma and neuroblastoma. **Oncotarget**, [*s. l.*], v. 9, n. 71, p. 33549–33561, 2018.

BANERJEE, Samya; CHAKRAVARTY, Akhil R. Metal Complexes of Curcumin for Cellular Imaging, Targeting, and Photoinduced Anticancer Activity. **Accounts of Chemical Research**, [*s. l.*], v. 48, n. 7, p. 2075–2083, 2015.

BERLINCK, Roberto G.S. *et al.* The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Quimica Nova**, [*s. l.*], v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

CARTER, R. *et al.* Radiosensitisation of human colorectal cancer cells by ruthenium(II) arene anticancer complexes. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 6, n. February, p. 1–12, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/srep20596.

CHEN, Zhen Feng *et al.* Potential new inorganic antitumour agents from combining the anticancer traditional Chinese medicine (TCM) matrine with Ga(III), Au(III), Sn(IV) ions, and DNA binding studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [*s. l.*], v. 105, n. 2, p. 171–180, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.10.007.

CORALLO, Diana *et al.* Emerging Neuroblastoma 3D In Vitro Models for Pre-Clinical Assessments. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 11, n. November, p. 1–12, 2020.

DANTAS, Erick P. *et al.* Dereplication of Aporphine Alkaloids by UHPLC-HR-ESI-MS/MS and NMR from. [*s. l.*], v. 31, n. 9, p. 1908–1916, 2020. Disponível em: https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200089%0AJ.

DELGODA, Rupika; MURRAY, J. E. **Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites**. [*S. l.*]: Elsevier Inc., 2017. *E-book*. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00007-X.

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

DIAZ-MUÑOZ, Gaspar *et al.* Anthraquinones: An Overview. **Studies in Natural Products Chemistry**, [*s. l.*], v. 58, n. October 2019, p. 313–338, 2018.

DOUGHERTY, Thomas J.; PUCCI, Michael J. **Antibiotic discovery and development**. [*S. l.: s. n.*], 2014.

DU, Shizhen *et al.* The syntheses and characterizations of vanadium complexes with 1,2-dihydroxyanthraquinone and the structure-effect relationship in their in vitro anticancer activities. **Dalton Transactions**, [*s. l.*], v. 42, n. 26, p. 9699–9705, 2013.

ESTRADA, Marta F. *et al.* Modelling the tumour microenvironment in long-term microencapsulated 3D co-cultures recapitulates phenotypic features of disease progression. **Biomaterials**, [*s. l.*], v. 78, p. 50–61, 2016.

FERNÁNDEZ-GALLARDO, Jacob *et al.* Organometallic titanocene-gold compounds as potential chemotherapeutics in renal cancer. Study of their protein kinase inhibitory properties. **Organometallics**, [*s. l.*], v. 33, n. 22, p. 6669–6681, 2014.

FLOREA, Ana Maria; BÜSSELBERG, Dietrich. Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**, [*s. l.*], v. 3, n. 1, p. 1351–1371, 2011.

FLORINDO, Pedro R. *et al.* Cyclopentadienyl-ruthenium(II) and iron(II) organometallic compounds with carbohydrate derivative ligands as good colorectal anticancer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 58, n. 10, p. 4339–4347, 2015.

FREZZA, Michael *et al.* Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, [*s. l.*], v. 16, n. 16, p. 1813–1825, 2010.

FUSCO, P. *et al.* Patient-derived organoids (PDOs) as a novel in vitro model for neuroblastoma tumours. **BMC Cancer**, [*s. l.*], v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

HARTWIG, Friederike; KÖLL-WEBER, Monika; SÜSS, Regine. Preclinical in vitro studies with 3d spheroids to evaluate cu(Ddc)2 containing liposomes for the treatment of neuroblastoma. **Pharmaceutics**, [*s. l.*], v. 13, n. 6, 2021.

HELLMAN, Nathan E.; GITLIN, Jonathan D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, [*s. l.*], v. 22, n. 39, p. 439–458, 2002.

HERAS, Beatriz L. *et al.* Metal Complexes of Natural Product Like-compounds with Antitumor Activity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 19, n. 1, p. 48–65, 2018.

HEYDARI, Zahra *et al.* Organoids: a novel modality in disease modeling. **Bio-Design and Manufacturing**, [*s. l.*], v. 4, n. 4, p. 689–716, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s42242-021-00150-7.

KHAN, Riaz A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [*s. l.*], v. 26, n. 5, p. 739–753, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015.

KHAN, Mateen A.; MUSTAFA, Jamal; MUSARRAT, Javed. Mechanism of DNA strand breakage induced by photosensitized tetracycline-Cu(II) complex. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [*s. l.*], v. 525, n. 1–2, p. 109–119, 2003.

KHOT, M Ibrahim *et al.* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the e ffi cacy of hypericin- mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of colorectal cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [*s. l.*], v. 23, n. June, p. 221–229, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.027.

KOSTOVA, Irena; BALKANSKY, Stefan. Metal Complexes of Biologically Active Ligands as Potential Antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 20, n. 36, p. 4508–4539, 2013.

KOU, Jun Feng *et al.* Chiral ruthenium(II) anthraquinone complexes as dual inhibitors of topoisomerases i and II. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [*s. l.*], v. 17, n. 1, p. 81–96, 2012.

KOWALSKI, Konrad. Recent developments in the chemistry of ferrocenyl secondary natural product conjugates. **Coordination Chemistry Reviews**, [*s. l.*], v. 366, p. 91–108, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.008.

KUEN, Janina *et al.* Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 12, n. 7, p. 1–19, 2017.

LIN, Xixi *et al.* Diplatin, a novel and low-toxicity anti-lung cancer platinum complex, activation of cell death in tumors via a ROS/JNK/p53-dependent pathway, and a low rate of acquired treatment resistance. **Frontiers in Pharmacology**, [*s. l.*], v. 10, n. September, p. 1–13, 2019.

LINDER, C. and molecular biology”2. [*s. l.*], 1996.

LIU, Yuanbin *et al.* Diphenyltetrazolium Bromide ( MTT ) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, [*s. l.*], 1997.

LUTSENKO, Svetlana *et al.* Function and regulation of human copper-transporting ATPases. **Physiological Reviews**, [*s. l.*], v. 87, n. 3, p. 1011–1046, 2007.

MIYAZAKI, Kaoru *et al.* Cancer cell migration on elongate protrusions of fibroblasts in collagen matrix. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

NDAGI, Umar; MHLONGO, Ndumiso; SOLIMAN, Mahmoud E. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, [*s. l.*], v. 11, p. 599–616, 2017.

ORAMAS-ROYO, Sandra *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 21, n. 9, p. 2471–2477, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.002.

PAEK, Jungwook *et al.* Microphysiological Engineering of Self-Assembled and Perfusable Microvascular Beds for the Production of Vascularized Three-Dimensional Human Microtissues. **ACS Nano**, [*s. l.*], v. 13, n. 7, p. 7627–7643, 2019.

PAHONŢU, Elena *et al.* Synthesis and characterization of novel Cu(II), Pd(II) and Pt(II) complexes with 8-ethyl-2-hydroxytricyclo(7.3.1.02,7)tridecan-13-one-thiosemicarbazone: Antimicrobial and in Vitro antiproliferative activity. **Molecules**, [*s. l.*], v. 21, n. 5, p. 1–18, 2016.

PRASAD, Sahdeo; TYAGI, Amit K.; AGGARWAL, Bharat B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. **Cancer Research and Treatment**, [*s. l.*], v. 46, n. 1, p. 2–18, 2014.

PUSZKO, Aniela *et al.* Systematic coordination chemistry and cytotoxicity of copper(II) complexes with methyl substituted 4-nitropyridine N-oxides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [*s. l.*], v. 105, n. 8, p. 1109–1114, 2011.

QIAN, J. Z. *et al.* QSAR study of flavonoid-metal complexes and their anticancer activities. **Journal of Structural Chemistry**, [*s. l.*], v. 56, n. 2, p. 338–345, 2015.

REGASINI, Luis Octávio *et al.* Antimicrobial activity of Piper arboreum and Piper tuberculatum (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **African Journal of Biotechnology**, [*s. l.*], v. 8, n. 12, p. 2866–2870, 2009.

RORABACHER, David B. Electron Transfer by Copper Centers. **Chemical Reviews**, [*s. l.*], v. 104, n. 2, p. 651–697, 2004.

SALEHI, Bahare *et al.* **Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications**. [*S. l.: s. n.*], 2019-. ISSN 14203049.v. 24

SALLEH, Wan Mohd Nuzul Hakimi Wan; AHMAD, Farediah. Phytochemistry and biological activities of the genus Ocotea (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [*s. l.*], v. 7, n. 5, p. 204–218, 2017.

SANTINI, Carlo *et al.* Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical Reviews**, [*s. l.*], v. 114, n. 1, p. 815–862, 2014.

SANTO, Vítor E. *et al.* Adaptable stirred-tank culture strategies for large scale production of multicellular spheroid-based tumor cell models. **Journal of Biotechnology**, [*s. l.*], v. 221, p. 118–129, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.031.

SHI, Yutong *et al.* Several Classes of Natural Products with Metal ion Chelating Ability. **Current Organic Chemistry**, [*s. l.*], v. 19, n. 19, p. 1935–1953, 2015.

SHI, Honglian; HUDSON, Laurie G.; LIU, Ke Jian. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, [*s. l.*], v. 37, n. 5, p. 582–593, 2004.

SILVA, Priscila P. *et al.* Platinum(II) compounds of tetracyclines as potential anticancer agents: Cytotoxicity, uptake and interactions with DNA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [*s. l.*], v. 21, n. 7, p. 1237–1246, 2010.

TSEOMASHKO, N. E. *et al.* Synthesis of convolinine and cytotoxic activity of alkaloids of the genus Convolvulus and their derivatives. **Chemistry of Natural Compounds**, [*s. l.*], v. 48, n. 6, p. 1039–1041, 2013.

VARESANO, Serena; ZOCCHI, Maria Raffaella; POGGI, Alessandro. Zoledronate triggers Vδ2 T cells to destroy and kill spheroids of colon carcinoma: Quantitative image analysis of three-dimensional cultures. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 9, n. MAY, 2018.

VESCIO, R. A. *et al.* In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported primary culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*s. l.*], v. 84, n. 14, p. 5029–5033, 1987.

WANG, Yang *et al.* Microenvironment of a tumor-organoid system enhances hepatocellular carcinoma malignancyrelated hallmarks. **Organogenesis**, [*s. l.*], v. 13, n. 3, p. 83–94, 2017.

WANG, Zhigang *et al.* Multi-targeted organometallic ruthenium(II)-arene anticancer complexes bearing inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1: A strategy to improve cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [*s. l.*], v. 131, p. 47–55, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.017.

WANNINGER, Simon *et al.* Metal complexes of curcumin - synthetic strategies, structures and medicinal applications. **Chemical Society Reviews**, [*s. l.*], v. 44, n. 15, p. 4986–5002, 2015.

ZHANG, Jing Jing *et al.* A multi-target caffeine derived rhodium(i) N-heterocyclic carbene complex: Evaluation of the mechanism of action. **Dalton Transactions**, [*s. l.*], v. 45, n. 33, p. 13161–13168, 2016.

ZWIENER, Victor P. *et al.* Planning for conservation and restoration under climate and land use change in the Brazilian Atlantic Forest. **Diversity and Distributions**, [*s. l.*], v. 23, n. 8, p. 955–966, 2017.