

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA**  
**REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**Pietra Stefany da Silva Gomes**

**COMPLEXO DE OXOVANÁDIO COM OROTATO: AVALIAÇÃO DA**  
**CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE, GENOTOXICIDADE E**  
**PERMEABILIDADE *IN VITRO***

Araraquara, SP

2021

**Pietra Stefany da Silva Gomes**

**COMPLEXO DE OXOVANÁDIO COM OROTATO: AVALIAÇÃO DA  
CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE, GENOTOXICIDADE E  
PERMEABILIDADE *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

Araraquara, SP

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

G616c Gomes, Pietra Stefany da Silva

Complexo de oxovanádio com orotato: avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e permeabilidade *in vitro*/Pietra Stefany da Silva Gomes. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.  
73f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

1. Complexo oxovanádio. 2. Antitumoral. 3. Toxicogenética.  
4. Citotoxicidade. I. Título.

CDU 57.089

## PIETRA STEFANY DA SILVA GOMES

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 22 de fevereiro de 2021.

### BANCA EXAMINADORA

*Flávia Aparecida Resende Nogueira*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Orientadora)  
Universidade de Araraquara - UNIARA

*Mônica R da Costa Iemma*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA  
Universidade de Araraquara - UNIARA

*Denise Crispim Tavares*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. DENISE CRISPIM TAVARES  
Universidade de Franca - UNIFRAN

*Dedico especialmente este trabalho aos meus pais, por todo o amor, o apoio e o incentivo durante todas as etapas de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Junto a conclusão deste trabalho, finalizo um ciclo muito importante em minha vida, um ciclo marcado por muito aprendizado profissional e pessoal. Para o desenvolvimento deste, vivi momentos que sempre almejei, mas, não imaginava o quanto me fariam crescer. Em uma rotina diferente do habitual, sonhei e tracei planos que me fizeram perceber o quão sou capaz. Ao longo desses anos, em muitas situações, contei com pessoas insubstituíveis ao meu lado. À essas pessoas, que estiveram presentes em momentos de dificuldade e alegria na minha vida, deixo registrado aqui meus agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus, por me sustentar até aqui, guiando meus passos, dia após dia;

Aos meus pais, Cícero e Cleonice, por me ensinarem as virtudes e valores da vida, sempre com muito amor e paciência, me repreendendo quando preciso, formando assim a minha educação. Fizeram o possível e impossível para que eu chegasse até aqui, incentivando e apoiando minhas escolhas, acreditando sempre que seria o melhor caminho rumo ao conhecimento e aprendizagem;

À minha avó, “In Memoriam”, que em vida sempre acreditou no meu potencial, e com sua árdua trajetória, foi inspiração para atuar na área em que me encontro, buscando contribuir nem que seja com o mínimo, em prol dos que passam por enfermidades. Obrigada por ser meu anjo da guarda!

Ao meu namorado Paulo, que durante toda minha jornada de estudos, principalmente durante o mestrado, mesmo sendo privado muitas das vezes da minha presença e atenção, foi calma e aconchego em meus dias turbulentos;

À minha orientadora Professora Dra. Flávia Resende, que desde o início, sem ao menos me conhecer, esteve de braços e coração abertos para me receber, me ensinar, me advertir e afagar. Por todas as oportunidades concedidas ao abrir as portas do seu laboratório e por toda a confiança em mim depositada. Obrigada por todo o empenho e carinho dispensado a mim!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Nádia, Gabriela, Vanessa, Maria Julia, Rafaela, Washington e Igor. Serei eternamente grata a vida, por proporcionar que nossos caminhos se cruzassem, e eu pudesse compartilhar momentos inesquecíveis ao lado de vocês. Vocês foram meu porto seguro em muitas

situações, souberam me auxiliar em cada momento, foram incentivos em dias difíceis. Obrigada por tudo o que vivemos juntos;

À querida Renata Aquino, que segurou minha mão em momentos em que me senti necessitada, seja afetivamente ou profissionalmente. Foi amiga e mãe, quando mais precisei. Gratidão pela amizade que construímos;

Aos meus companheiros do laboratório LECER, Gabriela Gastaldi, Mariana Rios e Guilherme Benevenuto por todo o apoio e compreensão em todas as vezes que compartilhamos fluxo, bolos e risadas;

À secretaria de pós graduação, em especial a Sandra, por todo o apoio, me assessorando em várias questões. Obrigada pela paciência e dedicação ao desempenhar suas funções;

Aos professores do PPG-MRQM, sempre solícitos em me ajudar. Gostaria de expressar todo o meu carinho e gratidão, por cada auxílio e cada mão estendida, gratidão por todo o conhecimento compartilhado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), bem como ao CNPq, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro;

Ao Laboratório de Mutagênese e Toxicidade (LAMUT) e a Universidade de Araraquara (UNIARA), por ter sido local de grande aprendizado nesses anos, tornando-se minha verdadeira morada em Araraquara. Hoje tenho o orgulho em dizer, “me sinto em casa”;

À cooperação com os Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Odontologia - UNESP, em especial ao pós-graduando Ms. Jonata Augusto de Oliveira e a Profa. Dra. Paula Aboud Barbugli, que nos auxiliaram na conclusão de alguns ensaios;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência ao analisar este trabalho, compartilhando conhecimentos, trazendo contribuições essenciais para que este seja concluído com êxito e fundamentais para meu aprendizado;

A todos que foram importantes e estiveram comigo direta ou indiretamente na construção deste trabalho, meu mais sincero **MUITO OBRIGADA!!!**

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota. **Madre Teresa de Calcuta**



## RESUMO

GOMES, Pietra Stefany da Silva. “**Complexo de oxovanádio com orotato: avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e permeabilidade *in vitro***”. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal) Universidade de Araraquara.

Apesar de décadas de pesquisas após a descoberta da atividade antitumoral do complexo cisplatina, o interesse por novos metalofármacos para o tratamento do câncer não diminuiu, uma vez que o câncer continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo. O desafio da química inorgânica medicinal concentra-se na descoberta de complexos que possam ser ativos contra diferentes tipos de tumores e que apresentem menor toxicidade em células não tumorais. Muitos metais já foram estudados, entre eles o vanádio, que quando complexado tem se mostrado ativo contra células tumorais, levando as células à morte por distintos mecanismos de ação, entre eles a produção de espécies reativas de oxigênio e a instabilidade genômica. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do complexo de oxovanádio(IV) com o ligante ácido orótico,  $[\text{VO}(\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4)_2]$ , denominado VO (oro), bem como sua permeabilidade *in vitro*, devido a importância do conhecimento farmacocinético de novos fármacos. Para tanto, a avaliação citotóxica foi realizada por meio dos ensaios de exclusão com azul de *trypan*, sobrevivência clonogênica e visualização da alteração morfológica, além da determinação do tipo de morte celular pelo ensaio utilizando anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do iodeto de propídio (IP). Tais ensaios foram conduzidos com a linhagem não tumoral de fibroblastos de pulmão humano (GM 07492A) e tumoral de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). O perfil mutagênico e genotóxico foi investigado pelos ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella* Typhimurium (teste de Ames), do micronúcleo (MN) e do cometa, enquanto a permeabilidade intestinal *in vitro* foi avaliada utilizando a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). Os resultados mostraram que o complexo VO (oro) foi mais citotóxico frente a linhagem HepG2 do que contra as células GM 07492A. VO (oro) interferiu na integridade das membranas celulares e na capacidade proliferativa, impedindo que as células se dividissem e formassem colônias, de forma dose dependente, induzindo a morte celular por apoptose. Além disso, foi possível observar a alteração na morfologia celular das células HepG2 nas maiores concentrações avaliadas. Sobre a genotoxicidade/ mutagenicidade, VO (oro) não induziu níveis consideráveis de danos ao DNA em células HepG2 (teste do Cometa) e mutações gênicas (teste de Ames), mas provocou um aumento estatisticamente significativo na frequência de MNs na maior concentração testada, sugerindo que a citotoxicidade pode estar relacionada em parte com a mutagenicidade. Ademais, apesar do complexo ter baixa lipofilicidade, ele demonstrou alta capacidade de permear a membrana celular das células Caco-2. Frente ao exposto, os dados do presente estudo fornecem informações sobre variados aspectos biológicos do complexo VO (oro), que poderão dar subsídio na elucidação mais detalhada sobre os mecanismos de ação do complexo como possível quimioterápico.

**Palavras-chave:** complexo oxovanádio, antitumoral, toxicogenética, citotoxicidade.

## ABSTRACT

GOMES, Pietra Stefany da Silva. “**Oxovanadium with orotate complex: evaluation of cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity and *in vitro* permeability**”. 2021. Dissertation (Master in Biotechnology in Regenerative Medicine and Medicinal Chemistry) University of Araraquara.

Despite decades of research after the discovery of the antitumoral activity of the cisplatin complex, the interest for new metalopharmaceuticals for the treatment of cancer has not decreased, since cancer remains one of the main public health problems in the world. The challenge of medicinal inorganic chemistry focuses on the discovery of complexes that can be active against different types of tumors and that present less toxicity in non-tumoral cells. Many metals have already been studied, among them vanadium, which when complexed has been shown to be active against tumor cells, leading cells to death by different mechanisms of action, among them the production of reactive oxygen species and genomic instability. In this context, the objective of this study was to evaluate the cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of the oxovanadium(IV) complex with the orotic acid ligand,  $[\text{VO}(\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4)_2]$ , called VO (oro), as well as its permeability *in vitro*, due to the importance of the pharmacokinetic knowledge of new drugs. For this purpose, the cytotoxic evaluation was performed by means of *trypan* blue exclusion tests, clonogenic survival and visualization of the morphological alteration, in addition to the determination of the type of cell death by the assay using annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate fluorochrome (FITC) and propidium iodide (IP). Such assays were conducted with the non-tumoral lineage of human lung fibroblasts (GM 07492A) and tumor of human hepatocellular carcinoma (HepG2). The mutagenic and genotoxic profile was investigated by reverse gene mutation assays with *Salmonella* Typhimurium (Ames test), micronucleus (MN) and comet, while *in vitro* intestinal permeability was evaluated using the human colorectal adenocarcinoma cell lineage (Caco-2). The results showed that the VO (oro) complex was more cytotoxic against HepG2 than against GM 07492A cells. VO (oro) interfered with the integrity of cell membranes and proliferative capacity, preventing cells from dividing and forming colonies, in a dose dependent manner, inducing cell death by apoptosis. In addition, it was possible to observe the alteration in the cellular morphology of HepG2 cells in the highest concentrations evaluated. On genotoxicity/mutagenicity, VO (oro) did not induce considerable levels of DNA damage in HepG2 cells (Comet test) and gene mutations (Ames test), but caused a statistically significant increase in the frequency of MNs in the highest concentration tested, suggesting that cytotoxicity may be related in part to mutagenicity. Furthermore, although the complex has low lipophilicity, it has demonstrated a high capacity to permeate the cell membrane of Caco-2 cells. In view of the above, the data of the present study provide information on various biological aspects of the VO (oro) complex, which may assist in the more detailed elucidation of the mechanisms of action of the complex as possible chemotherapy.

**Keywords:** oxovanadium complexes, antitumoral, toxicogenetics, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Fases da carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e metástase.....	14
<b>Figura 2.</b> Características das células tumorais e seus respectivos direcionamentos terapêuticos.....	15
<b>Figura 3.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, por sexo, exceto o de pele não melanoma.....	16
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático do direcionamento celular de complexos de oxovanádio .....	21
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia das linhagens de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) e de fibroblastos de pulmão humano (GM 07492A). Microscópio invertido em aumento de 10x, sem corantes.....	28
<b>Figura 6.</b> Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral HepG2 e não tumoral GM 07492A após o tratamento de 24 horas com o complexo VO (oro), sal metálico (VOSO <sub>4</sub> ), ligante (ácido orótico) e o complexo referência (cisplatina).....	41
<b>Figura 7.</b> Fração de Sobrevivência (%) da linhagem tumoral HepG2 e não tumoral GM 07492A após o tratamento de 24 horas com o complexo VO (oro), sal metálico (VOSO <sub>4</sub> ), ligante (ácido orótico) e o complexo referência (cisplatina).....	43
<b>Figura 8.</b> Imagens representativas da formação de colônias de células HepG2 e GM 07492A coradas com cristal de violeta após o tratamento de 24 horas com o complexo VO (oro).....	44
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografias das linhagens HepG2 e GM 07492A após tratamento com o complexo VO (oro), por 24 horas.....	47
<b>Figura 10.</b> Determinação do tipo de morte celular nas linhagens HepG2 e GM 07492A, após 24 horas de tratamento com o complexo VO (oro).....	49

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
<b>Tabela 1.</b> Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P.....	<b>38</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores de IC <sub>50</sub> (µM) e IS do complexo VO (oro), sal metálico (VOSO <sub>4</sub> ) e ligante (ácido orótico), além do complexo referência (cisplatina), nas linhagens HepG2 e GM 07492A obtidos pelo ensaio de exclusão com azul de <i>trypan</i> e sobrevivência clonogênica.....	<b>45</b>
<b>Tabela 3.</b> Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>Salmonella</i> Typhimurium expostas à diferentes concentrações do complexo metálico VO (oro), com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.....	<b>51</b>
<b>Tabela 4.</b> Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2, após 24 horas de tratamento com o complexo VO (oro) .....	<b>52</b>
<b>Tabela 5.</b> Migração de DNA no ensaio do cometa observado para culturas de HepG2 tratadas com diferentes concentrações dos complexos VO (oro), por 24 horas.....	<b>53</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ANOVA** - Análise de variância

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

**Caco-2** - Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano

**CN** - Controle Negativo

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**CP** - Controle Positivo

**°C** - Graus Celsius

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**DMEM** - *Dulbecco's modification of Eagle's medium*

**DP** - Desvio Padrão

**ERO** - Espécie Reativa de Oxigênio

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**Globocan** - Observatório Global do Câncer

**GM 07492A** - Linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**HBSS** - *Hanks' Balanced Salt solution*

**HepG2** - Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano

**IARC** - *International Agency for Research on Cancer*

**IC<sub>50</sub>** - Índice de citotoxicidade, concentração inibitória de 50%

**IDN** - Índice de divisão nuclear

**IM** - Índice de Mutagenicidade

**INCA** - Instituto Nacional de Câncer

José Alencar Gomes da Silva

**IP** - Iodeto de propídio

**IS** - Índice de Seletividade

**Log P** - coeficiente de partição

**Metvan** - bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxovanádio(IV)

**mL** - Mililitros

**MMS** - Metilmetanosulfonato

**MN** - Micronúcleo

**NaVO<sub>3</sub>** - Metavanadato de sódio

**NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>** - Metavanadato de amônio

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**Papp** - Permeabilidade aparente

**PBS** - Tampão Fosfato-Salino

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**PTPs** - Proteínas Tirosina Fosfatase

**Rpm** - Rotação por minuto

**S9** - Fração microsomal de fígado de rato

**SBF** - Soro Bovino Fetal

**VO (oro)** - Complexo oxovanádio com orotato

**VOSO<sub>4</sub>** - Sulfato de Vanadil

**TEER** - Resistência elétrica transepitelial

**µL** - Microlitros

**µM** - Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 O Câncer.....	14
1.2 Quimioterapia como tratamento do câncer .....	17
1.3 Complexos de vanádio.....	18
1.4 Ligantes bioativos .....	22
1.5 Desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Obtenção do complexo metálico.....	27
3.2 Linhagens celulares e condições de cultivo .....	27
3.2.1 Descongelamento e manutenção das linhagens celulares .....	28
3.3 Citotoxicidade .....	29
3.3.1 Ensaio de exclusão com azul de <i>trypan</i> .....	29
3.3.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica.....	30
3.3.3 Índice de seletividade .....	30
3.3.4 Morfologia celular .....	31
3.4 Determinação de morte celular .....	31
3.5 Mutagenicidade e Genotoxicidade.....	32
3.5.1 Ensaio de mutação gênica reversa com <i>Salmonella</i> Typhimurium (Teste de Ames).....	32
3.5.2 Ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese.....	33
3.5.3 Ensaio do cometa .....	35
3.6 Permeabilidade <i>in vitro</i> .....	36
3.6.1 Ensaio de permeabilidade <i>in vitro</i> em células Caco-2 .....	36
3.6.2 Coeficiente de permeabilidade aparente .....	37
3.6.3 Coeficiente de partição (log P).....	38
3.7 Análise estatística .....	38
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Citotoxicidade .....	40
4.2 Determinação de morte celular .....	47
4.3 Mutagenicidade e Genotoxicidade.....	50
4.4 Permeabilidade <i>in vitro</i> .....	54
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>

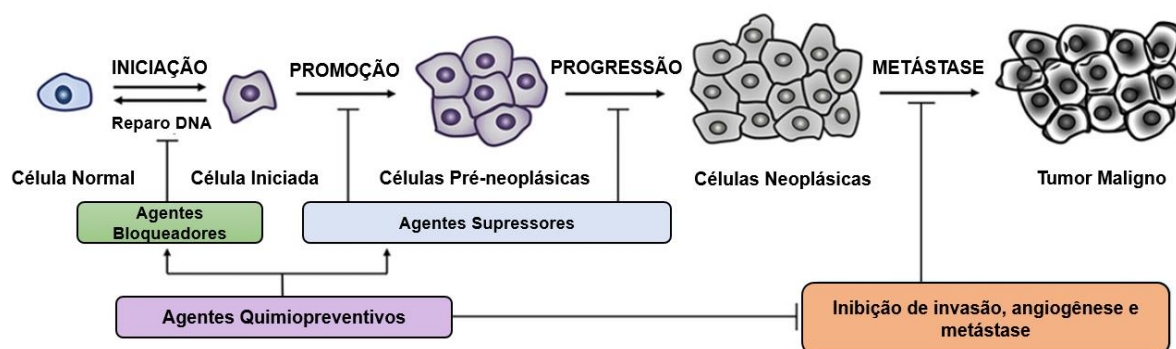
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O Câncer

O câncer aflige a humanidade desde os tempos pré-históricos, embora sua prevalência tenha aumentado acentuadamente nas últimas décadas. O primeiro registro escrito que relata a doença em humanos aparece em manuscritos egípcios, como no papiro de Edwin Smith, possivelmente escrito por Imhotep, médico-arquiteto egípcio, entre 1500 e 1600 a.C. (FAGUET, 2015). Hipócrates (460-360 a.C.) defendia que o câncer era iniciado por causas naturais, e em seus escritos, são retratadas doenças produtoras de massas (“onkos”) e nódulos ulcerantes e não cicatrizantes que variavam de processos benignos a malignos (“karkinos”) (FAGUET, 2015; HAJDU, 2011). No início do século 19, haviam três teorias fundamentais para causa do câncer: irritação crônica, tecido embrionário deslocado ou agentes infecciosos. A natureza do câncer foi discutida por gerações. No entanto, apenas no início do século 20, novas ferramentas científicas permitiram que pesquisadores explorassem novas hipóteses, estimulando o progresso no estudo oncológico (BLACKADAR, 2016).

Atualmente, sabe-se que o desenvolvimento do câncer é um processo de várias etapas (Figura 1), caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas nos vários genes que regulam a proliferação celular (COOPER, 2000).

**Figura 1.** Fases da carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e metástase



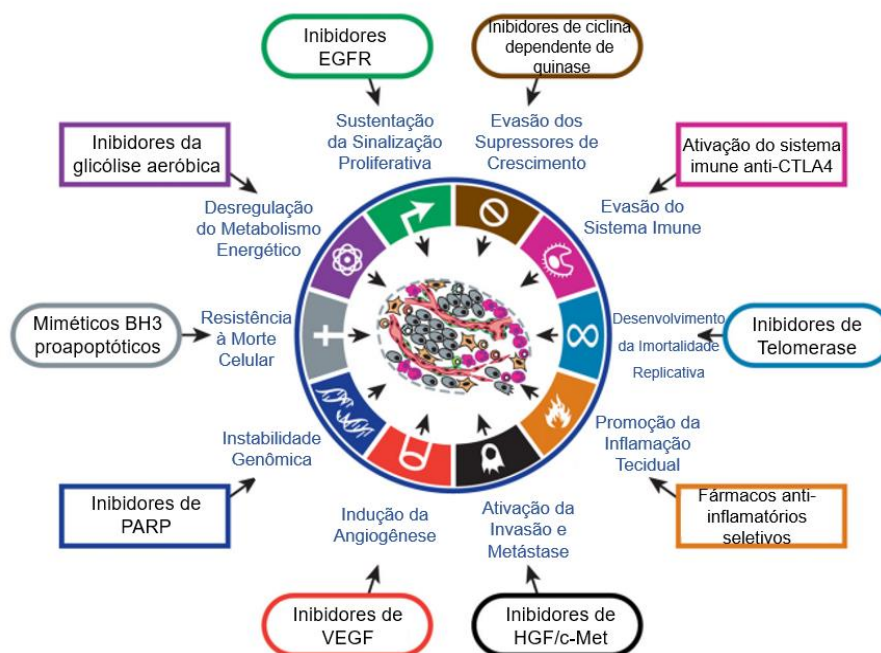
**Fonte:** Adaptado de SIDDIQUI et al. (2015).

As células cancerígenas possuem características distintas, que por sua vez, são responsáveis pela complexidade do tumor. Suas características consistem em: sustentação dos sinais proliferativos, resistência a sinais inibitórios de crescimento,

resistência à morte celular, possibilitando a imortalidade replicativa, indução à angiogênese, promoção da invasão e metástase, instabilidade e mutação do genoma, modulação do metabolismo celular e fuga à destruição imune. As características são adquiridas através da cooperação entre diferentes elementos celulares e não celulares dos tumores que definem o microambiente do tumor (BELLI et al., 2018; XU; MAO, 2016).

As características tipicamente associadas as células tumorais as distinguem das células não tumorais, permitindo que os tumores sejam reconhecidos como “estranhos” pelo sistema imunológico. No entanto, os tumores raramente são rejeitados espontaneamente, refletindo sua capacidade de manter um microambiente imunossupressor (XU; MAO, 2016). Assim, as capacidades funcionais adquiridas pelas células tumorais, permitem que estas células escapem dos mecanismos de defesa anticâncer existentes no interior das células e dos tecidos (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 2.** Características das células tumorais e seus respectivos direcionamentos terapêuticos



**Fonte:** Adaptado de HANAHAN & WEINBERG (2011).



O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (INCA, 2019).

Segundo a IARC (International Agency for Research on Cancer), agência da Organização Mundial da Saúde (OMS) de pesquisa sobre o câncer, a mais recente estimativa mundial, no ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando em todo mundo, tanto pelo envelhecimento e crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente os associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY et al., 2018).

De acordo com o relatório do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (Figura 3) (INCA, 2019).

**Figura 3.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, por sexo, exceto o de pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

**Fonte:** Adaptado de Globocan/IARC (2018).

Nas últimas décadas, avanços notáveis na ciência básica levaram a novas estratégias para o tratamento do câncer, que estão justificadamente gerando otimismo de que as pesquisas caminham na direção correta.

## 1.2 Quimioterapia como tratamento do câncer

Os avanços nas cirurgias, quimioterapias, radioterapias e novas modalidades, como terapias com alvos moleculares e imunoterapias como tratamento para o câncer, tem reduzido aos poucos as taxas de mortalidade e melhorado a qualidade de vida dos pacientes. Apesar desse progresso, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo (MAHVI et al., 2018).

A quimioterapia sistêmica convencional é o método mais utilizado para a terapia do câncer (GAO et al., 2019). Os agentes quimioterápicos possuem vários mecanismos de ação e afetam as células cancerígenas de várias maneiras. Em geral, interferem no processo de divisão celular e induzem a apoptose (LUNDQVIST; FUJIWARA; SEOUD, 2015).

Os medicamentos podem atuar no DNA (ácido desoxirribonucleico) quebrando a própria hélice, interferindo nas proteínas ou modificando a expressão de genes específicos. A maioria dos agentes antineoplásicos clássicos possui um desses mecanismos de ação e novos medicamentos são incorporados a cada ano (ESPINOSA et al., 2003). Hoje, mais de 100 medicamentos são utilizados na quimioterapia de tratamento do câncer, podendo ser administrado isoladamente, ou em combinação com outros fármacos e/ou métodos terapêuticos, administrados continuamente ou a intervalos regulares, variando de acordo com os esquemas terapêuticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os antineoplásicos podem ser classificados de acordo com suas diferentes atividades farmacológicas, sendo estes: (1) *agentes alquilantes*, que formam ligações cruzadas entre cadeias alterando a estrutura ou função do DNA, impedindo a replicação; (2) *antimetabólitos*, que atuam nas vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA; (3) *antibióticos antineoplásicos*, que atuam em diferentes enzimas envolvidas na cópia do DNA durante o ciclo celular; (4) *inibidores da topoisomerase*, que impedem a ação da enzima topoisomerase, envolvida no processo de replicação do DNA; (5) *inibidores mitóticos*, que levam à paralisação da divisão celular; (6) *imunoterápicos*, que auxiliam o sistema imunológico a identificar e combater células tumorais; (7) *antagonistas de hormônios*, que inibem o crescimento de células responsivas à esteroides; e (8) *agentes alvo-dirigidos*, que atuam em receptores ou proteínas citoplasmáticas relacionadas com vias de proliferação ou sobrevivência celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; ESPINOSA et al., 2003).

Entre os medicamentos antineoplásicos existentes, o composto inorgânico cis-[diaminodicloroplatina(II)], denominado como cisplatina, é um dos agentes quimioterapêuticos mais utilizados para o tratamento de vários tipos de câncer, principalmente testicular, de ovário, cabeça, cervicais e pulmão. Após a descoberta da cisplatina, muitas pesquisas foram desenvolvidas para a síntese de novos complexos metálicos a base de platina, dos quais a oxaliplatina e carboplatina foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (BARRA; NETTO, 2015; FREIRE et al., 2017) .

As investigações sobre as propriedades citotóxicas da cisplatina em quimioterapia revelaram que esta, exibe ligação intrínseca ao DNA nos locais N7 das bases adenina (A) ou guanina (G), gerando, dessa forma, reticulações intra e inter-filamentos e aductos de DNA monofuncionalmente ligados. Nas células malignas, essas transformações podem ser mutagênicas ou letais. Nesse sentido, a interação entre cisplatina e DNA constitui a base de seu mecanismo quimioterápico e desempenha o papel fundamental na administração clínica (LI et al., 2019; XIAO et al., 2013).

Embora a cisplatina demonstre efeitos positivos na terapia do câncer, os efeitos colaterais graves, como náusea e vômito, mielossupressão, imunossupressão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e perda auditiva, limitam a dose que pode ser administrada. Além disso, as resistências inatas e adquiridas à cisplatina limitam fortemente sua aplicação clínica (AMABLE, 2016; MANOHAR; LEUNG, 2018; SHAHID; FAROOQUI; KHAN, 2018).

Assim, pesquisas com outros centros metálicos, como cobre, ouro, rutênio e vanádio, estão sendo realizados na tentativa de substituir a cisplatina, com propriedades farmacocinéticas melhoradas e suas atividades tumorais mais abrangentes, com efeitos adversos reduzidos (CARVALHO et al., 2013; FREIRE et al., 2017; FRÍAS GONZÁLEZ et al., 2013; GAÁL et al., 2018; GRAU et al., 2018; RUBBIANI; WAHRIG; OTT, 2014; WANG; WANG; GUO, 2015) .

### **1.3 Complexos de vanádio**

Entre os metais de transição, a possível aplicação dos compostos de vanádio na medicina ganhou um crescente interesse nos últimos anos (CRANS et al., 2019). O vanádio é um metal de transição presente em toda a natureza e pode ser

encontrado nas formas catiônica e aniônica. Do ponto de vista biológico, as valências mais relevantes são III, IV e V (LEÓN et al., 2014). Além disso, é considerado essencial para a manutenção do organismo, regulando a atividade de várias enzimas metabólicas, estando presente tanto no estado de oxidação +5 (íons vanadato) quanto +4 (cátions vanadil) (TREVIÑO et al., 2019; YEH et al., 2019; ZWOLAK, 2020).

Na corrente sanguínea, a transferrina é a principal proteína sérica responsável pelo transporte de vanádio do sangue para os tecidos (COSTA PESSOA; TOMAZ, 2010; SANNA; MICERA; GARRIBBA, 2009). Sabe-se que a interação entre metalofármacos e proteínas séricas está fortemente ligada a distribuição e biotransformação de substâncias. O vanadil, por sua vez, é capaz de se ligar a apo-transferrina (apo-Tf) e a albumina sérica humana (HSA), podendo este evento ser crucial à eficácia da droga (THOMPSON; ORVIG, 2006).

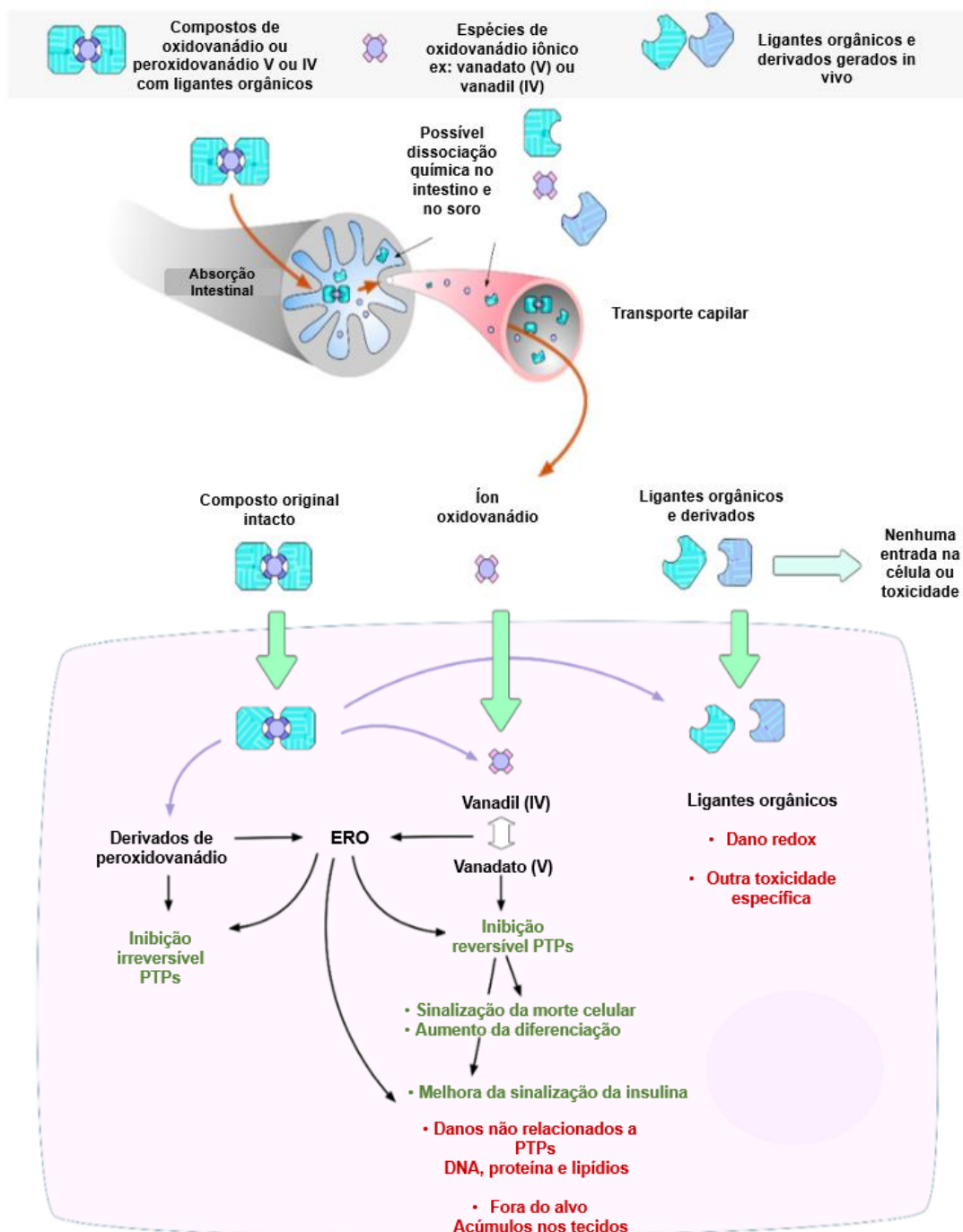
Dado o seu potencial para modular uma ampla gama de redes de sinalização, o vanádio é um candidato atraente para o tratamento de uma variedade de distúrbios humanos. Na segunda metade do século XX, a atividade mimética/ intensificadora de insulina dos íons vanádio começou a ser caracterizada (HEYLIGER; TAHILIANI; MCNEILL, 1985). Hoje, estudos *in vivo* e *in vitro* confirmam as propriedades antidiabéticas dos compostos. O bis(etilmaltolato)oxovanádio(IV) (BEOV) e bis(maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV) se tornaram os complexos de referência para as novas moléculas com ação antidiabética, sendo que o BEOV chegou aos ensaios clínicos na fase IIa (KORBECKI et al., 2020). Posteriormente, os complexos de vanádio foram testados e propostos como agentes antiparasitários, antivirais, anti-HIV, antituberculose e na redução da hiperlipidemia e hipertensão (GAMBINO, 2011; PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015; REHDER, 2016; ROZZO et al., 2017). No entanto, a potencial aplicação terapêutica dos compostos de vanádio parece ser o tratamento do câncer (ROZZO et al., 2017).

O primeiro relatório da atividade anticâncer foi em 1965, e desde então, esforços consideráveis de pesquisa descrevem o potencial de compostos à base de vanádio na prevenção do início da tumorigênese e no tratamento de cânceres. Os compostos de vanádio são capazes de inibir a iniciação e a progressão do câncer nos sistemas modelos, agindo contra várias das características de câncer, incluindo a indução de apoptose ou outras vias de morte celular, reduzindo a proliferação e inibindo a migração e as metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011; IRVING; STOKER, 2017).

Os compostos de vanádio promovem apoptose e levam as células à morte principalmente devido ao aumento dos níveis de EROs (espécies reativas de oxigênio) (LEÓN et al., 2014), que por sua vez podem causar instabilidade genômica. Esse efeito é constituído por vários eventos que levam à quebra de fita do DNA, à oxidação das bases e pentoses, às alterações na expressão gênica e na sequência do DNA, sendo responsável pelo surgimento de mutações no genoma de uma célula (CADET; RICHARD WAGNER, 2013; KUMARI et al., 2018). Portanto, agentes que possuam a capacidade de induzir alterações no material genético podem ser explorados como agentes anticâncer, pois a indução da instabilidade genômica é um efeito desejável contra células tumorais (ROWE; DEGTYAREVA; DOETSCH, 2008).

Irving e colaboradores (2017) destacam ainda o fato de que o vanádio é capaz de inibir os fenótipos de células cancerígenas por meio de múltiplos fatores, devido à sua capacidade de inibir PTPs (proteínas tirosina fosfatase), seja diretamente ou pela produção de EROs (Figura 4), impactando em várias vias de sinalização, o que em muitos casos, também resulta na proliferação reduzida e o aumento de apoptose (IRVING; STOKER, 2017).

**Figura 4.** Diagrama esquemático do direcionamento celular de complexos de oxovanádio



**Fonte:** Adaptado de IRVING e STOKER (2017).

Os primeiros estudos com complexos oxovanádio(IV) com atividade antitumoral promissora foi do  $[VCp_2Cl_2]$ , bis(ciclopentadienilo)dicloro-V(IV),  $[VO(oda)(bpy)] \cdot H_2O$  e  $[VO(oda)(phen)] \cdot 1.5H_2O$ , em seguida outros complexos com atividades semelhantes foram desenvolvidos (NI et al., 2018).

O bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxovanádio(IV), também conhecido como Metvan ( $[\text{VO}(\text{SO}_4)\text{Me}_2\text{-phen}]_2$ ), foi identificado como o complexo de vanádio anticâncer multitarefa mais promissor com atividade indutora de apoptose. Em concentrações nanomolares e micromolares, induz apoptose em células de leucemia humana, células de mieloma múltiplo e células tumorais sólidas derivadas de pacientes com câncer de mama, glioblastoma, ovário, próstata e câncer testicular. Metvan é mais eficaz que o quimioterápico padrão vincristina na indução de apoptose em células de leucemia primária (CRUZ; UCKUN, 2002; NARLA et al., 2000).

Como visto acima, a determinação das atividades biológicas exercidas pelos complexos metálicos não se baseia apenas pela presença do metal, mas também nas suas propriedades estruturais e de reatividade características, como estado de oxidação, geometria do complexo, número e tipo de ligantes aderidos, características termodinâmicas e cinéticas, e estabilidade do complexo (BARRY; SADLER, 2013; CHEN et al., 2009; GRAU et al., 2018). O ligante, por sua vez, influencia amplamente a eficácia de um composto, determinando o seu transporte, estabilidade e biodisponibilidade para diferentes tecidos, podendo ainda, em alguns casos, garantir a proteção dos tecidos contra íons metálicos tóxicos (THOMPSON; ORVIG, 2006; TREVIÑO et al., 2019).

#### **1.4 Ligantes bioativos**

Quando sais ou complexos de vanádio entram no corpo, eles podem sofrer troca de ligantes com outros pequenos ligantes biologicamente disponíveis, como os aminoácidos, vitaminas e hormônios, formando complexos de vanádio *in situ* com esses bioligantes (LU et al., 2010). Além disso, ligantes de ocorrência natural representam uma poderosa fonte de recursos relativamente baratos e amplamente disponíveis, mesmo em grande escala (HITCHINGS; ELION; VANDERWERFF, 1948; LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2015; SILVEIRA-DORTA; MARTÍN; PADRÓN, 2015).

O ácido orótico, também conhecido como vitamina B13, desempenha um papel fundamental na biossíntese de ácidos nucleicos, onde atua como um precursor essencial na via de formação da pirimidina em todos os organismos vivos. Ele exibe funcionalidade multidentada em complexos com metais de transição, formando

ligações fortes, e desempenhando papel importante na química bioinorgânica (LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2015; NAGLAH et al., 2018).

Orotatos metálicos são penetráveis nas células, portanto, eles podem ser favoravelmente explorados como veículo de transporte e entrega dos íons metálicos, por exemplo para tratar condições associadas à disfunção intracelular (deficiência de cálcio, zinco ou ferro). Seguindo esse mesmo princípio, a construção de compostos de coordenação de platina, paládio e estanho com ácido orótico foram estudados como potenciais agentes anticâncer (CASTAN et al., 1990; LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2016; NATH; VATS; ROY, 2013). Além disso, um complexo de vanádio com ácido orótico  $[(\text{OAH}_1)(\text{VO})(\text{NH}_3)_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  também já foi explorado e demonstrou ser eficaz como um modelo alternativo de medicamento antidiabético (NAGLAH et al., 2018).

Diante do exposto acima, observa-se que assim como o vanádio, o ácido orótico também já possui sua atividade biológica explorada, podendo ser a junção entre os mesmos um candidato promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos.

### **1.5 Desenvolvimento de novos agentes terapêuticos**

Considerando que a química inorgânica medicinal representa um campo de grande promessa, com potencial de expansão devido a diversidade química e reatividade dos metais, a investigação de novas moléculas na busca de um potencial antitumoral é um dos principais objetivos da Química Medicinal envolvendo metais, ou seja, a descoberta de complexos que possam ser ativos contra os tipos de tumores que não respondem ou adquiriram resistência à cisplatina. Além disso, uma toxicidade menor em células não tumorais é notadamente uma característica fundamental para qualquer novo complexo ativo sob desenvolvimento clínico (BRUIJNINCX; SADLER, 2008).

Diante dessa necessidade, recentemente Payolla e colaboradores (2020), sintetizaram três novos complexos com sulfato de vanadil ( $\text{VOSO}_4$ ) e os ligantes ácidos orótico ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$ ) e glutâmico ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ),  $[\text{VO}(\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4)_2]$ ,  $\text{Na} [\text{VO}(\text{OH})(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4)]$  e  $\text{Na} [\text{VO}(\text{OH})_2(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4)]$ , denominados VO (oro), VO ( $\alpha$ -glu) e VO ( $\gamma$ -glu) respectivamente, com a finalidade de explorar sua possível atividade antitumoral. Os resultados mostraram que os complexos foram citotóxicos contra as



linhagens celulares tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano), e seletivos quando comparado com a linhagem não tumoral MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano). Comparando os resultados com dados da literatura, os autores mostraram que os complexos foram mais citotóxicos que a cisplatina nos ensaios *in vitro* (PAYOLLA et al., 2020), sendo assim foram considerados candidatos promissores a medicamentos antitumorais. Por isso, no presente estudo, a fim de complementar os dados já obtidos, o complexo VO (oro) foi selecionado e avaliado quanto ao seu potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e de permeação *in vitro*.

Sabe-se que os efeitos mutagênicos são atribuídos a uma grande proporção de agentes quimioterápicos. Essas drogas inibem a proliferação celular por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo o dano direto ou interferindo no metabolismo do DNA e na maquinaria mitótica (SZIKRISZT et al., 2016).

Os agentes mutagênicos possuem a capacidade de induzir alterações/danos no material genético, desencadeando instabilidade genômica, efeito desejável contra células que possuem mecanismos de reparo alterados e acúmulo de outras mutações, tais como as células tumorais. Além disso, a instabilidade genômica promove o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, contribuindo para a indução da morte celular por apoptose (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004). No entanto, a quimioterapia mutagênica pode também ter consequências muito significativas se as mutações induzidas contribuírem para a evolução da resistência ao tratamento nas células sobreviventes, ou até mesmo favorecendo o desenvolvimento de doenças secundárias (SZIKRISZT et al., 2016). Desse modo, a detecção da mutagenicidade e genotoxicidade de compostos que interferem na proliferação celular e induzem morte celular é uma ferramenta bastante utilizada (KUMARI et al., 2018).

Outro fator importante a ser considerado quando se estuda um novo candidato a medicamento à base de metais é que, alguns íons metálicos são facilmente utilizados em mecanismos fisiológicos, enquanto outros tendem a se acumular em órgãos-alvos, como por exemplo pulmões, fígado, rins e baço, podendo induzir danos, como citotoxicidade, reações inflamatórias e genotoxicidade, levando a uma ampla gama de doenças secundárias a longo prazo (GOMES et al., 2011; MONTANARO et al., 2006). Desta forma, estudar o comportamento da molécula quanto sua capacidade de permeação torna-se um ponto importante no estudo de complexos metálicos com ação terapêutica.

Com todo o exposto, evidencia-se a importância de uma investigação detalhada sobre o perfil mutagênico e genotóxico do complexo VO (oro), além dos ensaios complementares de citotoxicidade e permeabilidade intestinal *in vitro*, para compreender melhor a ação desse novo complexo metálico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica, mutagênica e genotóxica, e a permeabilidade intestinal *in vitro* do complexo de vanádio [VO(C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], denominado VO (oro).

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a viabilidade celular das linhagens HepG2 (tumoral) e GM 07492A (não tumoral), após o tratamento com VO (oro), por meio do ensaio por exclusão com azul de *trypan*;
- b) Avaliar a sobrevivência clonogênica das linhagens HepG2 e GM 07492A, após o tratamento com VO (oro), a fim de investigar o efeito citotóxico a longo prazo;
- c) Avaliar se o tratamento com diferentes concentrações do complexo VO (oro) causa alterações morfológicas nas linhagens HepG2 e GM 07492A;
- d) Avaliar o tipo de morte celular induzida por VO (oro) nas linhagens HepG2 e GM 07492A através do ensaio de determinação de morte por apoptose, com marcação de anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do iodeto de propídio (IP);
- e) Avaliar a atividade mutagênica, em nível gênico, por meio do ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella* Typhimurium (teste de Ames);
- f) Avaliar a atividade mutagênica, em nível cromossômico, por meio do ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese, utilizando a linhagem HepG2;
- g) Avaliar a atividade genotóxica, por meio do teste do cometa, utilizando a linhagem HepG2;
- h) Avaliar capacidade de permeação intestinal *in vitro*, utilizando a linhagem Caco-2.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS


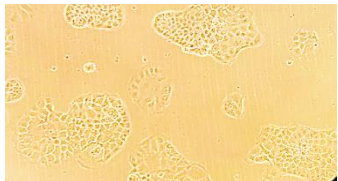

#### 3.1 Obtenção do complexo metálico

O complexo VO (oro) foi preparado misturando uma solução de sulfato de vanadil ( $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1 mmol) com uma solução de ácido orótico (2mmol), ambos em água. A mistura foi submetida a refluxo por 45 minutos e a água foi evaporada até a precipitação de um composto azul. O precipitado foi removido por filtração, lavado com etanol e seco a vácuo. A massa molar do complexo é de  $377 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Os procedimentos de síntese e caracterização realizados sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Carlos Massabni, coordenador do Laboratório de Química Inorgânica Medicinal da Universidade de Araraquara estão descritos na publicação de Payolla et al. (2020).

#### 3.2 Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram de carcinoma hepatocelular humano (HepG2 ATCC® HB-8065™), adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2, Banco de células do Rio de Janeiro nº 0059) e fibroblastos de pulmão humano (GM 07492A, CVCL\_7467 NIGMS) (Figura 5). As células foram mantidas em monocamada em frascos de cultura de 25 ou 75  $\text{cm}^2$  (Corning) a 37 °C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e 95% de ar sob umidade saturada. GM 07492A e HepG2 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen), enquanto que para Caco-2 foi utilizado meio DMEM com alta concentração de glicose e 20% de SFB. O meio de cultura suplementado com SFB foi nomeado de meio de cultura completo.

**Figura 5.** Fotomicrografia das linhagens de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) e de fibroblastos de pulmão humano (GM 07492A). Microscópio invertido em aumento de 10x, sem corantes

<p><b>HepG2</b> (ATCC® HB-8065™)</p>		<p><b>Carcinoma hepatocelular humano</b></p>
<p><b>Caco-2</b> (BCRJ nº 0059)</p>		<p><b>Adenocarcinoma colorretal humano</b></p>
<p><b>GM 07492A</b> (CVCL_7467 NIGMS)</p>		<p><b>Fibroblastos de pulmão humano</b></p>

**Fonte:** Própria autora.

### 3.2.1 Descongelamento e manutenção das linhagens celulares

Para o descongelamento das células, o tubo criogênico removido do freezer - 80°C permaneceu em temperatura ambiente até seu completo descongelamento. Logo após, as células foram transferidas para um tubo *falcon* estéril, contendo 2 mL de meio de cultura completo, e centrifugadas por 4 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de meio completo. As células foram transferidas para uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> já contendo 4 mL de meio de cultura completo, e assim mantidas em estufa com condições padronizadas de cultivo, sendo monitoradas com o auxílio de microscópio invertido.

Quando identificado aproximadamente 80% de confluência das linhagens, as mesmas foram removidas da garrafa de cultura, para realização do subcultivo, afim de manter o seu crescimento exponencial. Para isso, as células foram lavadas com PBS (Tampão Fosfato-Salino) e removidas com 2 mL de Tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen). Após o desprendimento das células, a Tripsina-EDTA foi inativada com meio de cultura completo, e uma pequena quantidade de células foi, então, colocada

em cultivo em novas garrafas de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura completo, e submetidas às condições padronizadas de cultivo até o próximo subcultivo.

Os experimentos foram realizados a partir da terceira passagem (subcultivo), dando prioridade para a realização dos testes em um intervalo de até 10 passagens. Apenas as culturas com viabilidade superior ou igual a 90%, avaliadas com azul de *trypan*, foram consideradas apropriadas para a utilização nos experimentos.

### 3.3 Citotoxicidade

#### 3.3.1 Ensaio de exclusão com azul de *trypan*

O protocolo foi realizado em placas de 6 poços. Em cada poço, foram semeadas  $1,0 \times 10^5$  células em 2 mL de meio de cultura completo e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, por 24 horas para permitir a aderência celular à placa, para a formação de uma monocamada de células semiconfluentes e para a progressão das células para a fase de crescimento exponencial.

Foram avaliadas 6 concentrações de VO (oro), que variaram de 3,12 a 50 µM, por 24 horas de tratamento. O sal metálico (VOSO<sub>4</sub>) e o ligante (ácido orótico) nas mesmas concentrações do complexo também foram incluídos no tratamento. Além disso, os controles experimentais foram constituídos por meio de cultura completo (controle negativo, sem qualquer tratamento), metilmetanosulfonato (MMS, 50 µM, Sigma-Aldrich) e cisplatina (complexo referência, 1,03 a 33,33 µM, Sigma-Aldrich).

Ao final do tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura. 10 µL da suspensão celular foi homogeneizada com o corante azul de *trypan* (0,2%), e então quantificadas em *TC20 Automated Cell Counter* (Bio-RAD). O controle negativo foi considerado como 100%, e então calculada a respectiva viabilidade celular (%) de cada grupo de tratamento. Foram realizados três ensaios independentes.

O índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), que representa a concentração requerida do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento, foi calculado pelo programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

### 3.3.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica

O protocolo foi realizado segundo Franken et al. (2006), com algumas modificações.

As células HepG2 e GM 07492A foram semeadas em uma concentração de  $1,0 \times 10^5$  células/poço em placas de 6 poços em 2 mL de meio de cultura completo e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, por 24 horas.

Os grupos de tratamento, incluindo todos os controles experimentais, foram conduzidos como descrito anteriormente para o ensaio com azul de *trypan* (item 3.3.1), também por 24 horas.

Ao final do tratamento, as células foram lavadas e tripsinizadas para contagem em câmara de Neubauer, afim de obter o volume que contivesse uma concentração de 200 células/poço, sendo novamente semeadas em placas de 6 poços, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo. Após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas, fixadas com metanol: ácido acético: água destilada (1:1:8) por 30 minutos, e coradas com 2 mL de corante Giemsa (Sigma-Aldrich) por 20 minutos. Depois de coradas, as colônias foram lavadas com água destilada, e então contadas. O número de colônias contadas no controle negativo foi considerado como 100%. A partir disso, foram realizados os cálculos das frações de sobrevivência (FS) para cada tratamento:

$$\% \text{ FS} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias observadas no controle negativo}} \times 100$$

O IC<sub>50</sub> também foi calculado traçando a sobrevivência das células em relação às respectivas concentrações do composto de teste. Foram realizados três ensaios independentes.

### 3.3.3 Índice de seletividade

O Índice de Seletividade (IS) dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC<sub>50</sub> encontrado para células não tumorais sobre o IC<sub>50</sub> das células tumorais. Quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais ativo contra a linhagem tumoral e menos citotóxico para a linhagem não tumoral. Considera-se como um promissor candidato antitumoral, a substância que apresentar um IS > 3 (CHELOPO et al., 2013).

### 3.3.4 Morfologia celular

Após as 24 horas de tratamento, os diferentes poços, tanto das células HepG2 quanto de GM 07492A, foram fotografados em microscópio óptico invertido (Nikon, TS100) com câmera acoplada, em aumento de 10x para analisar visualmente o crescimento e a estrutura celular. A eficiência do tratamento nesta análise foi comparada ao controle negativo.

### 3.4 Determinação de morte celular

A detecção do tipo de morte celular foi determinada utilizando o kit de anexina V – FITC/ IP (Gibco-Invitrogen). As amostras foram analisadas no Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Paula Aboud Barbugli.

As células HepG2 e GM 07492A foram cultivadas nas mesmas condições experimentais que os ensaios de citotoxicidade, ou seja,  $1,0 \times 10^5$  células/poço em placas de 6 poços e tratadas por 24 horas com  $12,5 \mu\text{M}$  de VO (oro). Também foram avaliados os controles experimentais: meio de cultura completo (controle negativo, sem qualquer tratamento), peróxido de hidrogênio  $50 \mu\text{M}$  (controle de morte celular por necrose) e mitomicina C  $1,5 \mu\text{M}$  (controle de morte celular por apoptose) e cisplatina na concentração de  $16,6 \mu\text{M}$  em HepG2 e  $2 \mu\text{M}$  em GM 07492A (complexo referência).

Após o período de tratamento, as células foram desprendidas dos poços utilizando Accutase (Gibco-Invitrogen) e centrifugadas durante 5 minutos. Em seguida, foram ressuspensas em  $100 \mu\text{L}$  de tampão de ligação e  $5 \mu\text{L}$  de anexina V - FITC, e incubadas em temperatura ambiente ( $37^\circ\text{C}$ ), por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se  $4 \mu\text{L}$  de IP e novamente incubadas por 3 minutos. Todo o ensaio foi realizado sob o abrigo de luz.

Para análise,  $35 \mu\text{L}$  da suspensão de células foi depositada no slide, afim de obter aproximadamente  $1 \times 10^6$  células analisadas, e realizada a leitura e quantificação automática. A intensidade de fluorescência (anexina V - FITC e IP) foi avaliada pelo equipamento Countess™ II FL Automated Cell Counter, da Life Technologies, em  $488 \text{ nm}$  para anexina V – FITC e  $610 \text{ nm}$  para IP. A população de células foi separada quanto a células totais e marcadas com anexina, IP ou com ambos. Foram realizados três ensaios independentes.



### 3.5 Mutagenicidade e Genotoxicidade

#### 3.5.1 Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames)

O teste de Ames foi realizado de acordo com o método de pré-incubação, desenvolvido por Maron e Ames (1983). Para tanto, foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium*, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica. As cepas foram inicialmente adquiridas por meio do Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA, e gentilmente cedidas ao nosso laboratório pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

As concentrações do complexo a serem testadas foram selecionadas com base em testes preliminares de toxicidade. A toxicidade foi evidenciada pela redução no número de revertentes His<sup>+</sup> ou como um crescimento de fundo (background) nas placas teste de ágar mínimo.

Sendo assim, preparou-se o inóculo, onde uma alíquota da cultura estoque congelada foi semeada com o auxílio de uma alça bacteriológica em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada por 14-16 horas, em shaker incubador (37°C – 100 rpm), de modo a obter uma densidade de  $1-2 \times 10^9$  bactérias/mL.

Terminado o período de incubação do inóculo, em tubos de ensaios, foram adicionados 0,1 mL de cultura de bactérias, a concentração adequada de VO (oro) (6,25 a 50 µM) e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 (experimentos sem ativação metabólica) ou da mistura S9 (experimentos com ativação metabólica). Os tubos assim compostos foram incubados a 37°C durante 20 minutos.

A fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato *Sprague Dawley* (fração pós-mitocondrial, suplementada com um co-fator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Aroclor 1254-500 mg/kg) foi comercialmente obtida pela Molecular Toxicology, Inc., USA e revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consistiu de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de

água destilada estéril (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. Todas as soluções foram preparadas sempre a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

Após o tempo de incubação, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (*top-agar*), suplementado uma solução de L-histidina e D-biotina (0,05 mM) na proporção de 10:100 mL. Os tubos foram levemente homogeneizados e vertidos em placas de Petri contendo ágar mínimo glicosado. Com a solidificação do *top agar*, as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido esse tempo, o número de colônias revertentes por placa foram contadas manualmente.

Para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa foram utilizados controles positivos, sendo em ensaios sem ativação metabólica, o 4-nitrofenilenodiamina (24 µM) para as cepas TA98 e TA97a, azida sódica (7 µM) para a cepa TA100 e mitomicina C (0,53 µM) para a cepa TA102. E para os ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-anthramine (2,3 µM) para cepas TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluorene (20 µM) para cepas TA102. Também foi realizado um controle onde apenas o inóculo bacteriano, sem qualquer tratamento, foi plaqueado, a fim de se determinar a taxa de reversão espontânea de cada cepa e compará-la com os padrões recomendados.

O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\text{número de revertentes por placa (composto-teste)}}{\text{número de revertentes por placa (controle negativo)}}$$

A amostra é considerada mutagênica quando o IM for maior ou igual a 2 em pelo menos uma das concentrações testadas e quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Foram realizados três ensaios independentes.

### **3.5.2 Ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese**

O ensaio do MN foi realizado de acordo com o protocolo de Fenech (2007), com algumas modificações.

Neste ensaio, as células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços em uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  células/poço e então tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de VO (oro) (1,56, 3,12, 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ ), além dos controles experimentais constituídos por meio de cultura completo (controle negativo), aflatoxina B1 (5  $\mu\text{M}$ , controle positivo) e cisplatina (2  $\mu\text{M}$ , complexo referência).

Após o período de tratamento, o meio de cultura contendo a amostra foi substituído por um novo meio de cultura (sem qualquer tratamento), e então adicionado a cada poço 20  $\mu\text{L}$  de citocalasina B (6,25  $\mu\text{M}$ ), afim de interromper a citocinese. As células foram incubadas por mais 28 horas nas mesmas condições.

Após esse período, as células foram colhidas por meio de Tripsina-EDTA, transferidas para um tubo *falcon* e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspendido com 3 mL de solução hipotônica gelada (KCl 0,075M). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada e ressuspendida em 5 mL de fixador metanol: ácido acético (3:1), por 2 vezes. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular gotejada em lâminas previamente limpas e mantidas em água destilada gelada até o momento do uso.

Quando secas, as lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido LB, lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico, em objetiva de 40x. Foram realizados três ensaios independentes, onde um total de 6000 células binucleadas viáveis foram analisadas por grupo de tratamento. Os critérios utilizados para identificação dos MNs foram baseados em Fenech (2007). Além disso, foram contadas um total de 3000 células viáveis entre mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas (quatro ou mais núcleos) para calcular o índice de divisão nuclear (IDN). O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989), utilizando a fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{[M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)]}{N}$$

Onde M1 - M4 representa o número de células com 1 a 4 núcleos, e N o número total de células viáveis pontuadas.

### 3.5.3 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo de Tice et al. (2000), com algumas modificações.

Neste ensaio, as células HepG2 também foram cultivadas em placas de 6 poços em uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  células/poço e então tratadas por 24 horas com diferentes concentrações não citotóxicas do complexo (1,56, 3,12 e 6,25  $\mu\text{M}$ ), além dos controles experimentais: meio de cultura completo (controle negativo), peróxido de hidrogênio (50  $\mu\text{M}$ , controle positivo) e cisplatina (2  $\mu\text{M}$ , complexo referência).

Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão por azul de *trypan*, e apenas os grupos que apresentaram viabilidade celular superior a 70% foram submetidas ao ensaio do cometa.

As células foram recolhidas dos poços e transferidas para eppendorfs de 2 mL, centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos e lavadas com PBS por duas vezes. O *pellet* de células foi homogeneizado com 200  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Cada 100  $\mu\text{L}$  dessa suspensão foi aplicada em uma lâmina pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 10 minutos.

Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO, pH 10), e mantidas por 18 horas (overnight), abrigada de luz em geladeira. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em banho de água destilada gelada por duas vezes, e logo em seguida, foram imersas em tampão de eletroforese alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH 13) em banho de gelo por 20 minutos para desnaturação do DNA.

A eletroforese foi conduzida nessa mesma solução a 4°C por 20 minutos sob uma corrente elétrica de 25V e 300mA. Posteriormente, as lâminas foram imersas em tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com GelRed™ (Biotium Inc., Fremont, CA, EUA) (GelRed/PBS; 1:10.000  $\mu\text{L}$  v/v) e as amostras foram analisadas usando um microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axiostar Plus; Jena, Alemanha) com filtro de excitação de 515–560 nm e filtro de barreira de 590 nm.

Para cada tratamento, a extensão e a distribuição do dano ao DNA indicado pelo ensaio do cometa foram avaliadas examinando um total de 300 células (em três ensaios independentes) selecionadas aleatoriamente e sem sobreposição nas lâminas. Para cada lâmina, as células foram visualmente pontuadas e alocadas em uma das cinco classes (0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com o tamanho da cauda, sendo: classe 0, sem danos visível; classe 1, pouco dano; classe 2, danos médios; classe 3, danos extensos; e classe 4, danos máximos. O score foi calculado multiplicando o número de células danificadas pelo valor da respectiva classe de cometa (0, 1, 2, 3 ou 4) e, em seguida, somou-se cada tratamento.

### **3.6 Permeabilidade *in vitro***

#### **3.6.1 Ensaio de permeabilidade *in vitro* em células Caco-2**

O protocolo experimental para a realização dos ensaios de permeabilidade foi conduzido de acordo com Hubatsch et al. (2007).

Para tanto, as células Caco-2 foram cultivadas em placas Transwell® (Corning) contendo 12 poços, com insertos de policarbonato de 0,4 µm de poro e área de 1,12 cm<sup>2</sup>, em uma densidade inicial de 2 x 10<sup>5</sup> células/inserto. As culturas foram mantidas em incubadora sob as mesmas condições de cultivo já descritas, durante 21 dias para atingir a confluência e a diferenciação espontânea das células. O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias durante o período de manutenção nos insertos.

Após o período de cultivo, as células foram lavadas com tampão HBSS (*Hanks' Balanced Salt solution*, Gibco-Invitrogen) pH 7,4 contendo 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazina-l-il] etanosulfônico (HEPES) e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos.

A formação e integridade da monocamada celular foi examinada quanto ao valor de resistividade elétrica transepitelial (TEER) utilizando o minivoltímetro Millicell ERS® (Millipore). Foram consideradas íntegras e apropriadas para o ensaio, os insertos que apresentaram valor de TEER maior ou igual a 200 Ω cm<sup>2</sup>.

Os experimentos foram iniciados com a adição dos diferentes tratamentos nos compartimentos apicais das placas Transwell®. VO (oro) foi solubilizado em tampão HBSS pH 6,5 contendo 10 mM de ácido 2- (N-morfolino) etanosulfônico (MES) e testado na concentração de 6,25 µM para garantir a viabilidade da monocamada, e como marcadores padrões de alta e baixa permeabilidade, foram utilizados cloridrato

de verapamil (100  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) e fluoresceína (60  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich), respectivamente. Já no compartimento basolateral (receptor) foram adicionados 1,2 mL de tampão HBSS 7,4.

Durante o experimento, as placas foram mantidas sob agitação orbital (130 – 170 rpm a 37°C).

Para a quantificação, 600  $\mu\text{L}$  do volume de HBSS do compartimento basolateral foram coletados nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 180 minutos e transferidos para microtubos. Após cada amostragem, procedeu-se a reposição com tampão HBSS pH 7,4, mantido a 37°C para manter o volume no compartimento.

Ao final do ensaio, coletou-se o volume restante do compartimento apical dos insertos. Foram realizados três ensaios independentes.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Toxicologia da FCF – UNESP, Araraquara, sob supervisão do pós-graduando Ms. Jonata Augusto de Oliveira. O sistema cromatográfico consistiu de um ACQUITY UPLC® (Waters) equipado com detector UV/Vis, operando em 280 nm. A coluna analítica empregada foi CSH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel foi constituída dos solventes metanol e água (10:90), operando em modo isocrático e sob vazão de 0,3 mL/min. As amostras foram mantidas a 10°C até a injeção, enquanto a coluna foi mantida a 35°C durante o processo de separação cromatográfica. O volume de injeção foi de 2  $\mu\text{L}$ .

### 3.6.2 Coeficiente de permeabilidade aparente

Os coeficientes  $P_{app}$  (cm/s) foram calculados utilizando a seguinte equação:

$$P_{app} = (\Delta Q/\Delta t) \times (1/ (A \times C_0))$$

Onde:

$(\Delta Q/\Delta t)$  = variação da concentração inicial no tempo em mol/s;

A = área do filtro em  $\text{cm}^2$ ;

$C_0$  = concentração inicial no compartimento apical em mol/mL.

Em seguida, a permeabilidade que é baseada na detecção das amostras no compartimento basolateral do sistema Transwel foi classificada de acordo com os valores de  $P_{app}$  obtidos, sendo mal absorvido (0-20%) quando seu valor é inferior a  $1 \times 10^{-6}$  cm/s, moderadamente absorvido (20-70%) quando seu valor está entre 1 a 10

x  $10^{-6}$  cm/s e bem absorvido (70 – 100%) quando seu valor é maior que  $10 \times 10^{-6}$  cm/s (YEE, 1997).

### 3.6.3 Coeficiente de partição (log P)

A obtenção de log P pelo método cromatográfico foi realizado com base no *Guideline 117* (2004) da OECD. A partir desse guia, foram selecionadas substâncias cuja curva de log *k* (log do fator de capacidade) versus o log P compreendesse valores entre 0,3 e 6,2 (Tabela 1).

Foi utilizado para esse ensaio um ACQUITY UPLC® (Waters) equipado com detector UV/Vis, sendo a separação por coluna analítica BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) com coluna de guarda com as mesmas características (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) e ambas mantidas a 30°C. A fase móvel foi constituída dos solventes metanol:ácido fórmico 0,1% (70:30), operando em modo isocrático e sob vazão de 0,4 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 2 µL.

**Tabela 1.** Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P

Substância	Log P
Butanona	0,3
Benzonidazol	0,77
Acetanilida	1
Nifedipino	2
Probenecida	2,3
Diazepam	2,7
Clorobenzeno	2,8
Timol	3,3
Fenantreno	4,5
Trifenilamina	5,7
DDT	6,2

### 3.7 Análise estatística

Os resultados do ensaio de mutação gênica reversa com *S. Typhimurium* foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta com o cálculo da análise de variância (ANOVA) entre as médias

do número de revertentes nas diferentes concentrações testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo escolhido para a análise dos dados foi o de Bernstein et al. (1982).

Todos os outros dados foram analisados estatisticamente pelo software Graph Pad Prism 7.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) utilizando análise de variância One way ANOVA para determinar as significâncias estatísticas, seguida pelo teste de Tukey considerando  $p < 0,05$ . Os ensaios foram feitos em triplicata e o critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em relação ao controle negativo.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Citotoxicidade

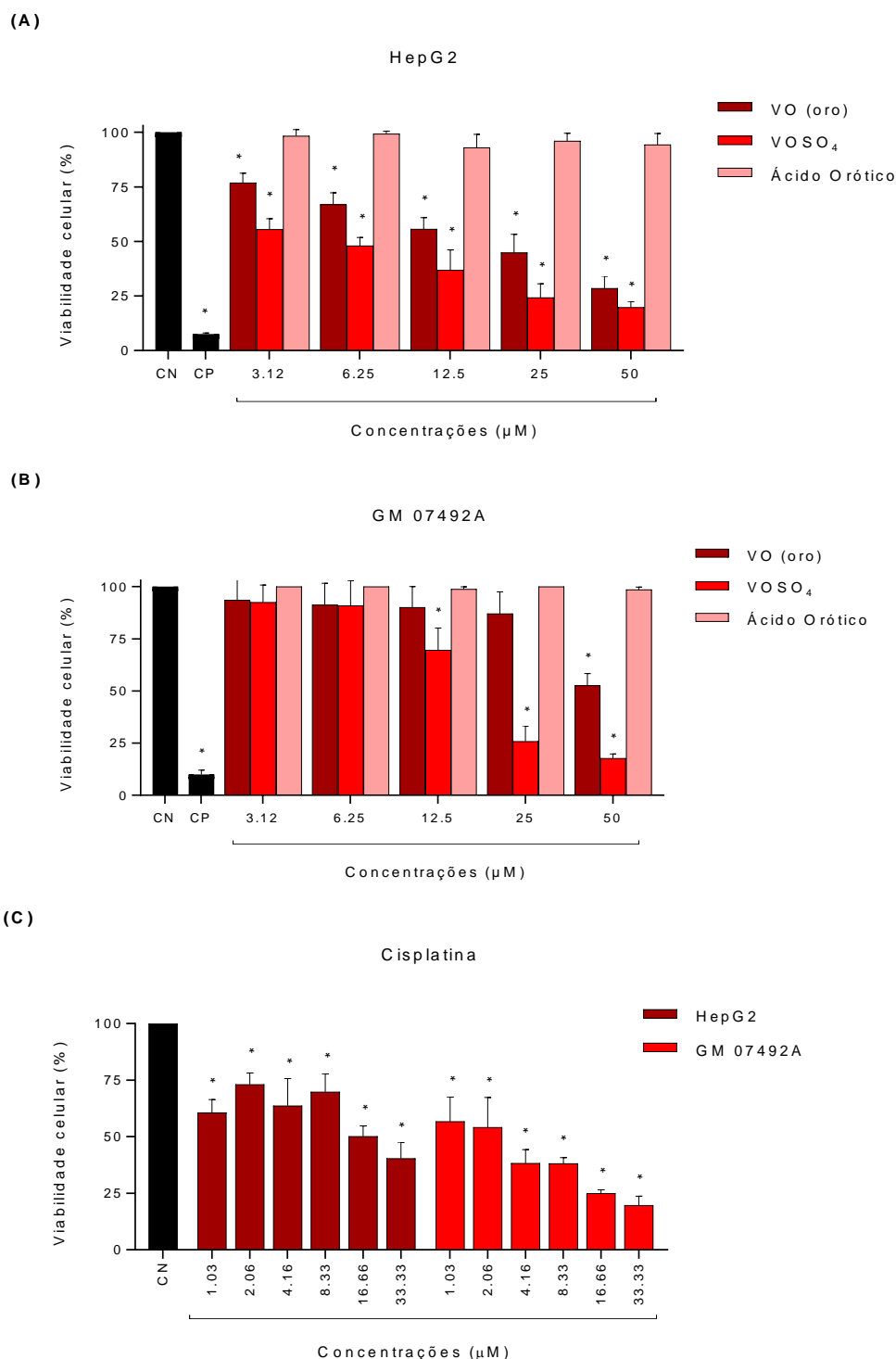
Os resultados obtidos pelo ensaio de exclusão com azul de *trypan* estão representados na Figura 6 e os valores de IC<sub>50</sub> e IS na Tabela 2.

Foi possível observar que o complexo VO (oro) induziu maior redução da viabilidade celular na linhagem HepG2 (Figura 6A), de maneira dose-dependente, com IC<sub>50</sub> de 12,91 ± 5,50 µM (Tabela 2) do que em GM 07492A (Figura 6B) que teve uma redução estatisticamente significativa da viabilidade apenas na maior concentração testada (50 µM, IC<sub>50</sub> de 54,20 ± 6,49 µM). O IS foi de 4,19 (Tabela 2).

O sal metálico (VOSO<sub>4</sub>) utilizado para preparar o complexo foi avaliado e demonstrou ser mais citotóxico do que quando complexado com o ácido orótico em ambas as linhagens, agindo de forma dose-dependente, com ação mais acentuada na linhagem tumoral. Os valores de IC<sub>50</sub> foram de 5,12 ± 1,55 µM em HepG2 e 15,75 ± 4,85 µM em GM 07492A com IS de 3,07 (Tabela 2). Já o ligante (ácido orótico) não apresentou atividade citotóxica, nas condições utilizadas neste estudo.

A cisplatina (Figura 6C) também avaliada neste estudo não apresentou seletividade comparando os resultados de citotoxicidade frente as células tumorais e não tumorais (IS: 0,15). GM 07492A foi mais sensível com IC<sub>50</sub> de 2,72 ± 1,04 µM, enquanto que para HepG2 foi de 18,11 ± 6,08 µM (Tabela 2).

**Figura 6.** Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral HepG2 e não tumoral GM 07492A após o tratamento de 24 horas com o complexo VO (oro), sal metálico (VOSO<sub>4</sub>), ligante (ácido orótico) e o complexo referência (cisplatina)



(A) Viabilidade na linhagem HepG2. (B) Viabilidade na linhagem GM 07492A. (C) Viabilidade em ambas as linhagens após tratamento com cisplatina. CN: controle negativo (meio de cultura), viabilidade celular de 100%; CP: controle positivo (MMS 50 µM), viabilidade celular de 7,5% em HepG2 e 10% em GM 04792A. Os valores são dados de acordo com a média e desvio padrão de três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  em relação ao CN.

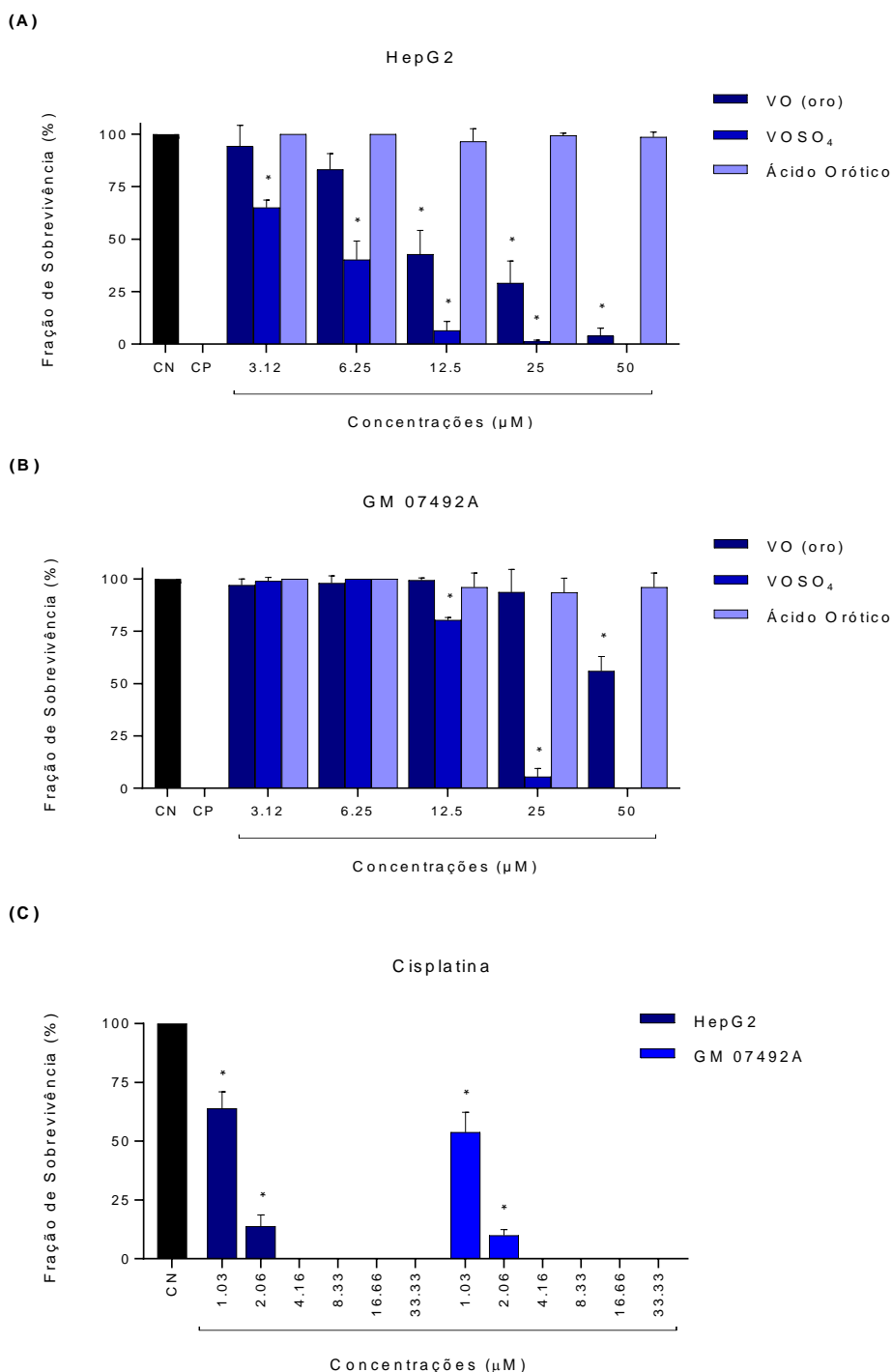
A Figura 7 mostra os resultados de frações de sobrevivência obtidos pela avaliação do efeito citotóxico a longo prazo dos diferentes tratamentos através do ensaio de sobrevivência clonogênica. As imagens representativas deste experimento estão na Figura 8 e os valores de  $IC_{50}$  e IS também estão na Tabela 2.

Os resultados revelaram que, após 7 dias, VO (oro) inibiu a formação de colônias das células HepG2 (Figuras 7A e 8), de maneira dose-dependente, ( $IC_{50}$  de  $9,13 \pm 0,14 \mu\text{M}$ , Tabela 2), enquanto que em GM 07492A (Figura 7B e 8) a inibição da formação de colônias foi observada somente na maior concentração ( $50 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  de  $52,83 \pm 4,00 \mu\text{M}$ ). O IS foi 5,78.

O  $VOSO_4$  também reduziu estatisticamente a FS das células HepG2 (Figura 7A); na concentração  $25 \mu\text{M}$ , a inibição foi de 98,8% e em  $50 \mu\text{M}$  foi completa, apresentando  $IC_{50}$  de  $4,56 \pm 0,26 \mu\text{M}$  (Tabela 2). De maneira semelhante, nas células não tumorais GM 07492A (Figura 7B), a inibição foi de 94,5% em  $25 \mu\text{M}$  e total em  $50 \mu\text{M}$ , mas nas menores concentrações não houve inibição, sendo o  $IC_{50}$   $15,65 \pm 0,57 \mu\text{M}$  (Tabela 2). O sal metálico também foi seletivo, com valor de IS de 3,43. Por outro lado, assim como no ensaio de azul de *trypan*, o ácido orótico não teve efeito citotóxico nas células analisadas.

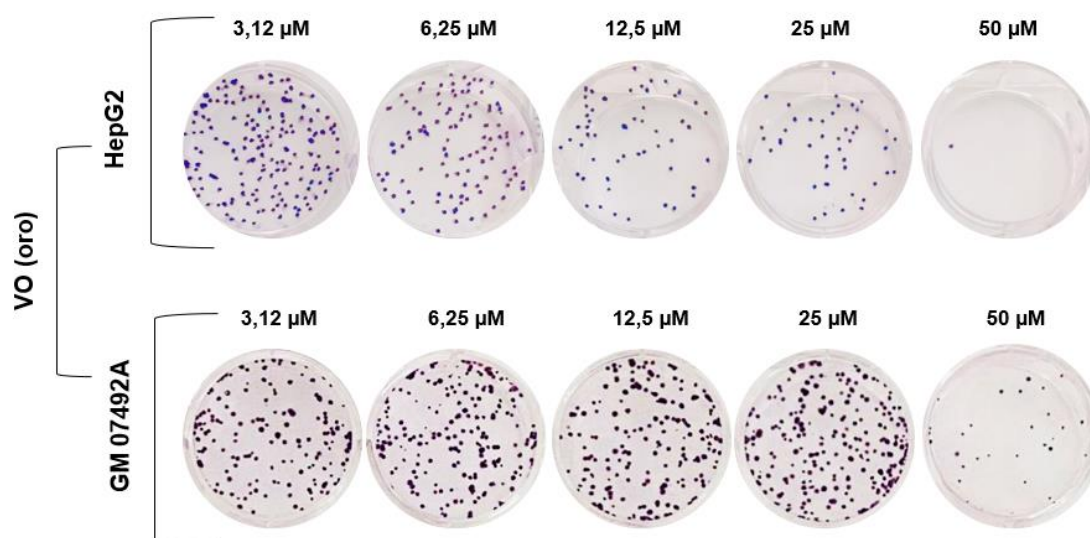
Quando avaliado o tratamento com cisplatina, a inibição da formação de colônias na maioria das concentrações testadas foi total, com ausência de colônias (Figura 7C). Houve formação de colônias apenas nas concentrações  $1,03$  e  $2,06 \mu\text{M}$ . O  $IC_{50}$  foi de  $1,21 \pm 0,11 \mu\text{M}$  para HepG2 e  $1,06 \pm 0,09 \mu\text{M}$  para GM 07492A, confirmando a ausência de seletividade (IS: 0,87, Tabela 2).

**Figura 7.** Fração de Sobrevivência (%) da linhagem tumoral HepG2 e não tumoral GM 07492A após o tratamento de 24 horas com o complexo VO (oro), sal metálico (VOSO<sub>4</sub>), ligante (ácido orótico) e o complexo referência (cisplatina)



(A) Fração de sobrevivência na linhagem HepG2. (B) Fração de sobrevivência na linhagem GM 07492A. (C) Fração de Sobrevivência em ambas as linhagens após tratamento com cisplatina. CN: controle negativo (meio de cultura), FS de 100%; CP: controle positivo (MMS 50 μM), ausência de FS em HepG2 e GM 07492A. Os valores são dados de acordo com a média e desvio padrão de três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  em relação ao CN.

**Figura 8.** Imagens representativas da formação de colônias de células HepG2 e GM 07492A coradas com cristal de violeta após o tratamento de 24 horas com o complexo VO (oro)



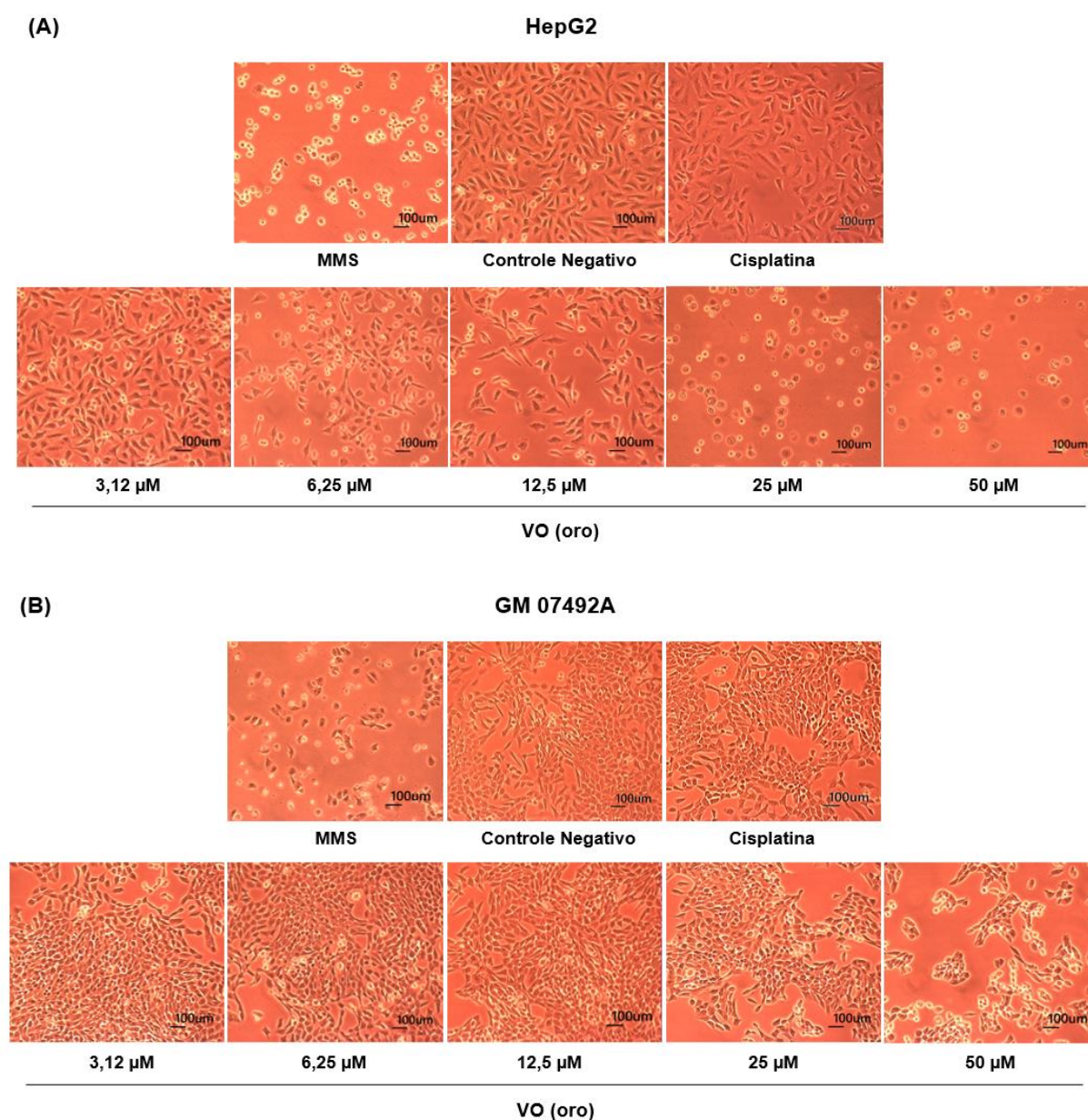
**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) e IS do complexo VO (oro), sal metálico (VOSO<sub>4</sub>) e ligante (ácido orótico), além do complexo referência (cisplatina), nas linhagens HepG2 e GM 07492A obtidos pelo ensaio de exclusão com azul de *trypan* e sobrevivência clonogênica

Tratamentos	IC <sub>50</sub> (μM ± DP)					
	Azul de <i>trypan</i>			Sobrevivência Clonogênica		
	HepG2	GM 07492A	IS	HepG2	GM 07492A	IS
<b>VO (oro)</b>	12,91 ± 5,50	54,20 ± 6,49	4,19	9,13 ± 0,14	52,83 ± 4,00	5,78
<b>VOSO<sub>4</sub></b>	5,12 ± 1,55	15,75 ± 4,85	3,07	4,56 ± 0,26	15,65 ± 0,57	3,43
<b>Ácido Orótico</b>	> 50	> 50	-	> 50	> 50	-
<b>Cisplatina<sup>a</sup></b>	18,11 ± 6,08	2,72 ± 1,04	0,15	1,21 ± 0,11	1,06 ± 0,09	0,87

IC<sub>50</sub>: índice de citotoxicidade; a concentração do composto capaz de inibir 50% das células. IS: índice de seletividade; IC<sub>50</sub> (linhagem não tumoral)/ IC<sub>50</sub> (linhagem tumoral). Valores obtidos pelo software GraphPad Prism 7.0 através da média de três ensaios independente. <sup>a</sup> Cisplatina: complexo referência.

O aspecto morfológico das células em cultura após o período de tratamento foi acompanhado por microscopia e pode ser observado na Figura 9. As imagens obtidas mostram claramente que o aspecto morfológico, característico da linhagem HepG2, foi alterado quando as células foram tratadas com 25 e 50  $\mu\text{M}$  de VO (oro). Quando utilizadas concentrações menores (3,12, 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ ), foi observado apenas redução na densidade dos aglomerados celulares em comparação ao controle negativo. Na linhagem GM 07492A, houve apenas redução da densidade de células na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ), sem alteração morfológica. Os dados, portanto, corroboram com os resultados de viabilidade celular obtidos.

**Figura 9.** Fotomicrografias das linhagens HepG2 e GM 07492A após tratamento com o complexo VO (oro), por 24 horas



(A) Fotomicrografias da linhagem HepG2. (B) Fotomicrografias da linhagem GM 07492A. Controle negativo: meio de cultura completo; MMS: controle positivo (50  $\mu\text{M}$ ); Cisplatina: complexo referência (16,6  $\mu\text{M}$  em HepG2 e 2  $\mu\text{M}$  em GM 07492A).

## 4.2 Determinação de morte celular

Sobre o ensaio de marcação com Anexina V – FITC, as células marcadas com anexina representam as células apoptóticas, as marcadas com IP representam as células em necrose, enquanto que as marcadas com anexina + IP representam células



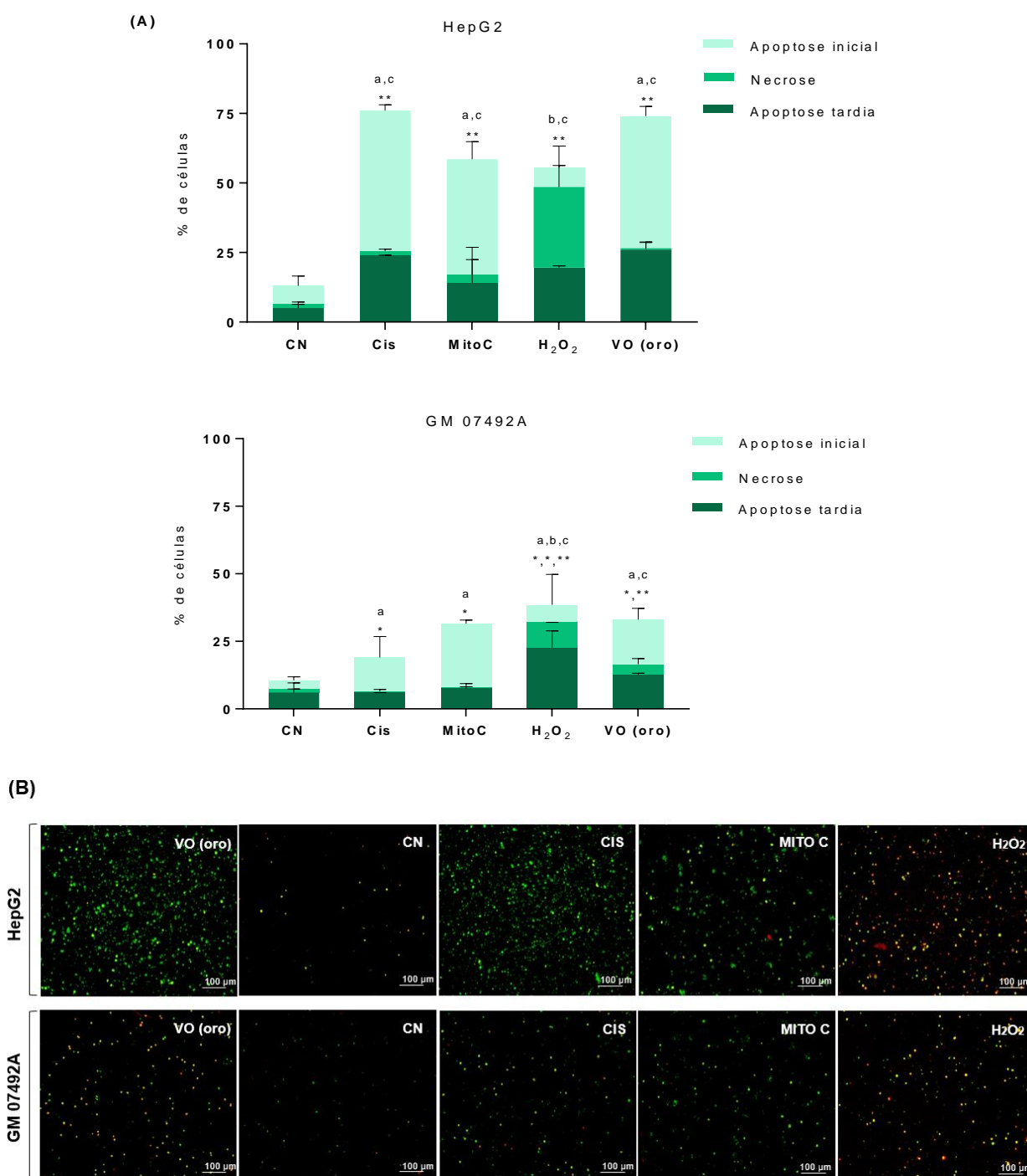
em apoptose tardia. As porcentagens de células de cada classificação (apoptose inicial, necrose e apoptose tardia) bem como a ilustração da marcação estão apresentadas na Figura 10.

Os resultados mostram que as células tumorais HepG2 quando tratadas com o complexo VO (oro) aumentou significativamente a porcentagem de células em apoptose inicial e tardia, quando comparado ao grupo não tratado (controle negativo). Neste grupo de tratamento, houveram 47,5% de células em apoptose inicial, 0,5% em necrose, e 26% em apoptose tardia, enquanto que o controle negativo, apresentou 6,5%, 1,5% e 5%, respectivamente, demonstrando dessa forma, que o complexo VO (oro) induziu morte por apoptose nas condições utilizadas neste ensaio. O mesmo ocorreu quando avaliado o tratamento nas células GM 07492A; onde houve 16,5% de células em apoptose inicial, 4% em necrose e 12,5% em apoptose tardia do grupo tratado, enquanto o grupo não tratado apresentou 3%, 1,5% e 6%, respectivamente, demonstrando que a morte celular nesta linhagem também estaria associada a apoptose. Nota-se, contudo, que o tratamento foi mais citotóxico na linhagem tumoral HepG2, apresentando maiores taxas de células marcadas e menores taxas de células viáveis (sem marcação), e então consequentemente maior diferença estatística quando comparado ao controle negativo.

Um perfil semelhante foi observado no tratamento com o complexo referência (cisplatina) nos ensaios realizados com as células HepG2, onde houveram 50,5% de células em apoptose inicial, 1,5% em necrose e 24% em apoptose tardia, apresentando diferença estatística dos grupos de apoptose inicial e tardia quando comparado ao controle negativo. Já nas células GM 07492A, nota-se aumento significativo apenas de células em apoptose inicial (12,5% para cisplatina e 3% para controle negativo). Desta forma, assim como VO (oro), a cisplatina também induziu morte por apoptose.

Dois controles positivos foram inclusos nos ensaios, afim de obter um controle para morte por apoptose (mitomicina C) e um para necrose (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A mitomicina C apresentou 41,5% de células em apoptose inicial, resultado semelhante ao complexo. Enquanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou maiores taxas de células em necrose (29% em HepG2 e 22,5% em GM 07492A).

**Figura 10.** Determinação do tipo de morte celular nas linhagens HepG2 e GM 07492A, após 24 horas de tratamento com o complexo VO (oro)



(A) Porcentagem de células em apoptose inicial, necrose e apoptose tardia. CN: controle negativo (meio de cultura completo); Cis: complexo referência (cisplatina 16,6  $\mu$ M para HepG2 e 2  $\mu$ M para GM 07492A); MitoC: controle positivo (Mitomicina C 1,5  $\mu$ M); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: controle positivo (peróxido de hidrogênio 50  $\mu$ M). Os dados estão expressos pela média e desvio padrão de três experimentos independentes. A diferença estatística da substância teste quando comparada ao controle negativo está expressa em (a) quando avaliado apoptose inicial, (b) necrose e (c) apoptose tardia. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,0001$ . (B) Imagens ilustrativas de células marcadas para: apoptose inicial em verde, necrose em vermelho, apoptose tardia em amarelo.

### 4.3 Mutagenicidade e Genotoxicidade

A Tabela 3 apresenta a média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após o tratamento com as diferentes concentrações dos complexos VO (oro), frente as cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium*, na presença (+S9) e na ausência (-S9) de ativação metabólica.

Os ensaios de mutagenicidade mostraram que, nas condições utilizadas neste estudo, VO (oro) não induziu um aumento de duas ou mais vezes no número médio de colônias revertentes em comparação ao grupo controle negativo, em nenhuma das concentrações e cepas de *S. Typhimurium*, com ou sem ativação metabólica, indicando ausência de atividade mutagênica neste ensaio.

**Tabela 3.** Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella Typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico VO (oro), com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
<b>CN</b>	36 ± 2	37 ± 8	149 ± 12	158 ± 15	393 ± 23	382 ± 21	176 ± 24	158 ± 11
<b>CP</b>	734 ± 43 <sup>a</sup>	1210 ± 57 <sup>d</sup>	1490 ± 92 <sup>b</sup>	1832 ± 178 <sup>d</sup>	1855 ± 188 <sup>c</sup>	1665 ± 181 <sup>e</sup>	1302 ± 91 <sup>a</sup>	1758 ± 123 <sup>d</sup>
<b>VO (oro) µM</b>								
<b>6,2</b>	39 ± 5 (1,07)	40 ± 11 (1,08)	167 ± 7 (1,12)	147 ± 11 (0,93)	408 ± 36 (1,04)	427 ± 28 (1,12)	177 ± 14 (1,01)	168 ± 12 (1,06)
<b>12,5</b>	41 ± 11 (1,14)	42 ± 8 (1,14)	173 ± 6 (1,16)	152 ± 18 (0,97)	399 ± 33 (1,02)	419 ± 25 (1,10)	185 ± 23 (1,05)	170 ± 9 (1,07)
<b>25</b>	43 ± 5 (1,18)	45 ± 1 (1,22)	177 ± 11 (1,19)	152 ± 4 (0,97)	381 ± 23 (0,97)	433 ± 32 (1,13)	187 ± 11 (1,07)	172 ± 10 (1,09)
<b>37,5</b>	39 ± 1 (1,08)	41 ± 15 (1,11)	162 ± 18 (1,09)	151 ± 17 (0,96)	346 ± 19 (0,88)	378 ± 18 (0,99)	173 ± 18 (0,98)	175 ± 19 (1,11)
<b>50</b>	35 ± 3 (0,97)	47 ± 7 (1,27)	155 ± 6 (1,04)	143 ± 4 (0,90)	342 ± 22 (0,87)	347 ± 27 (0,91)	177 ± 22 (1,01)	170 ± 14 (1,08)

M ± DP = média e desvio padrão (com base em três experimentos independentes); IM = índice de mutagenicidade; Controle Negativo (CN): sem tratamento, taxa de reversão espontânea das linhagens; Controle Positivo (CP): <sup>a</sup> 4-nitro-O-fenilenodiamino (24 µM – TA98, TA97a); <sup>b</sup> azida sódica (7 µM – TA100); <sup>c</sup> mitomicina (0,53 µM – TA102), em ausência de S9 e <sup>d</sup> 2-anthramine (2,3 µM – TA98, TA100 e TA97a); <sup>e</sup> 2-aminofluorene (20 µM – TA102), em presença de S9.

Quando avaliado pelo ensaio do MN, como pode ser observado na Tabela 4, o complexo VO (oro) induziu um aumento estatisticamente significativo na frequência de MNs apenas na maior concentração testada (12,5  $\mu\text{M}$ ) comparado ao controle negativo. Nas demais concentrações, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos tratados e o controle negativo.

Outro parâmetro avaliado neste ensaio foi o índice de divisão nuclear (IDN), onde nota-se uma redução dos valores de IDN dos grupos tratadas com o complexo, de maneira dose-dependente, sugerindo que VO (oro) possa interferir no estado proliferativo das células, resultado este que corrobora com os dados apresentados nos ensaios de citotoxicidade. O IDN do controle negativo foi  $1,93 \pm 0,05$  e dos grupos tratados com o complexo variaram de 1,35 a 1,94.

Sobre o complexo referência, a cisplatina foi mutagênica no ensaio do MN, provocando um aumento estatisticamente significativo na frequência de MNs ( $22,6 \pm 3,05$ ) nas células HepG2, mas não induziu diferença estatística quando comparado ao controle negativo com relação ao valor de IDN.

**Tabela 4.** Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2, após 24 horas de tratamento com o complexo VO (oro)

Tratamentos	MNs <sup>a</sup>	IDN <sup>b</sup>
<b>Controle negativo</b>	$4,3 \pm 0,57$	$1,93 \pm 0,05$
<b>Controle positivo</b>	$33 \pm 4,24^*$	$1,65 \pm 0,04^*$
<b>Cisplatina</b>	$22,6 \pm 3,05^*$	$1,84 \pm 0,02$
<b>VO (oro)</b>		
<b>1,56 <math>\mu\text{M}</math></b>	$3,3 \pm 0,57$	$1,94 \pm 0,01$
<b>3,12 <math>\mu\text{M}</math></b>	$3,0 \pm 1,00$	$1,85 \pm 0,01$
<b>6,25 <math>\mu\text{M}</math></b>	$4,6 \pm 1,52$	$1,68 \pm 0,05^*$
<b>12,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	$10,6 \pm 2,08^*$	$1,35 \pm 0,06^*$

Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP do número de micronúcleos (MNs) e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2. O controle negativo recebeu apenas meio de cultura completo, o controle positivo foi Aflatoxina B1 (5  $\mu\text{M}$ ), e a cisplatina (2  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como complexo referência. <sup>a</sup> Um total de 6.000 células binucleadas foram analisadas por grupo de tratamento. <sup>b</sup> Um total de 3.000 células foram analisadas por grupo de tratamento. \*  $p < 0,05$  estatisticamente diferente do controle negativo.

Na Tabela 5 estão detalhados os dados obtidos pelo ensaio do cometa, onde observa-se que VO (oro), nas concentrações testadas por um período de 24 horas em células HepG2, não apresenta potencial genotóxico, pois não induziu diferença estatisticamente significativa de dano ao DNA quando comparado ao controle negativo, nas condições utilizadas neste estudo.

Mesmo na maior concentração testada (6,25  $\mu\text{M}$ ), a maioria das células analisadas encontram-se nas classes 0 e 1. Os valores calculados de score variaram de 42,3 a 63,0 para os grupos tratados com VO (oro) e  $48,3 \pm 9,4$  para o controle negativo, enquanto no controle positivo este valor foi de  $185 \pm 4,2$ .

A cisplatina (2  $\mu\text{M}$ ) também apresentou o valor de score maior ( $83,3 \pm 10,0$ ) e diferente estatisticamente do controle negativo, demonstrando assim potencial genotóxico.

**Tabela 5.** Migração de DNA no ensaio do cometa observado para culturas de HepG2 tratadas com diferentes concentrações dos complexos VO (oro), por 24 horas

Tratamentos	Classes					Score
	0	1	2	3	4	
<b>Controle negativo</b>	63,0 $\pm$ 8,7	28,0 $\pm$ 9,8	6,7 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,5	0	48,3 $\pm$ 9,4
<b>Controle positivo</b>	21,5 $\pm$ 2,1*	20,5 $\pm$ 2,1	27,5 $\pm$ 3,5*	12,5 $\pm$ 0,7*	18 $\pm$ 2,8*	185 $\pm$ 4,2*
<b>Cisplatina</b>	49,3 $\pm$ 10,0	27,3 $\pm$ 11,2	15,3 $\pm$ 8,3	6,7 $\pm$ 4,0	1,3 $\pm$ 1,5	83,3 $\pm$ 10,0*
<b>VO (oro)</b>						
<b>1,56 <math>\mu\text{M}</math></b>	72,3 $\pm$ 6,0	15,7 $\pm$ 3,0	7,3 $\pm$ 2,0	4,0 $\pm$ 2,6	0	42,3 $\pm$ 11,6
<b>3,12 <math>\mu\text{M}</math></b>	64,7 $\pm$ 9,2	21,7 $\pm$ 10,0	10,3 $\pm$ 4,0	2,3 $\pm$ 2,0	0,3 $\pm$ 0,5	50,7 $\pm$ 12,4
<b>6,25 <math>\mu\text{M}</math></b>	56,0 $\pm$ 2,0	29,0 $\pm$ 1,7	11,0 $\pm$ 3,6	4,0 $\pm$ 3	0	63,0 $\pm$ 4,3

Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP, com base em três experimentos independentes. Um total de 300 células foram examinadas por grupo de tratamento e a pontuação total foi calculada multiplicando o número de células pontuadas pelo valor da respectiva classe de cometa (0, 1, 2, 3 ou 4) e, em seguida, calculando a soma de cada tratamentos. O controle negativo recebeu apenas meio de cultura completo, o controle positivo foi peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 50  $\mu\text{M}$ ) e a cisplatina (2  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como complexo referência. \*  $p < 0,05$  estatisticamente diferente do controle negativo.

#### 4.4 Permeabilidade *in vitro*

Os valores de  $P_{app}$  do complexo VO (oro), fluoresceína e verapamil foram determinados a partir da fração permeada no sentido apical – basolateral empregando membranas de células Caco-2.

A partir dos dados da fração permeada de VO (oro), foi calculada sua permeabilidade aparente, que por sua vez apresentou  $P_{app}$  de  $45,79 \pm 11,9 \times 10^{-6}$  cm/s, demonstrando, dessa maneira, boa permeabilidade pela membrana celular.

O mesmo cálculo foi realizado para verapamil e fluoresceína, onde foram obtidos os seguintes valores de  $P_{app}$ :  $67,06 \pm 7,51 \times 10^{-6}$  cm/s e  $0,73 \pm 0,06 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente, o que indica que as membranas das células Caco-2 após 21 dias estavam íntegras e adequadas para o experimento, pois os padrões de alta (verapamil) e baixa (fluoresceína) permeabilidade responderam como o esperado.

Previamente ao ensaio de permeabilidade *in vitro*, foi determinado o log P. A curva de linearidade curva de log k versus log P dos padrões utilizados permitiu o cálculo da equação  $y=0,304x - 0,3339$  e coeficiente de correlação,  $r = 0,981$ . O log P alcançado foi de -0,57, com tempo de corrida de 0,314 min, o que indica baixa lipofilicidade.

## 5. DISCUSSÃO

Desde a introdução da cisplatina na quimioterapia, muitos complexos metálicos foram sintetizados com o objetivo de exercer maior toxicidade contra as células tumorais, com efeitos colaterais mínimos. Com este objetivo, a conjugação de vários metais, incluindo platina, com diferentes ligantes foram avaliadas atuando contra modelos de câncer *in vivo* e *in vitro* (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; HADJIADAMOU et al., 2020).

O uso do vanádio como composto de coordenação tem demonstrado inúmeras atividades biológicas, incluindo propriedades anticâncer, que se faz uma alternativa eficaz e com baixa toxicidade em comparação a outros metais. Estudos baseados em complexos de vanádio foram desenvolvidos durante anos, possibilitando a descoberta de uma série de complexos com atividade antitumoral. Estudos apontam que, os complexos de vanádio exercem potentes efeitos antitumorais por meio da ativação de vias apoptóticas, parada do ciclo celular e geração de EROs, induzindo menor toxicidade em comparação com os complexos à base de platina (HADJIADAMOU et al., 2020; KOWALSKI et al., 2017).

Assim, na intenção de investigar novas moléculas, além da busca de potenciais agentes antitumorais, a síntese, caracterização e atividade citotóxica de complexos de vanádio foi avaliada e os resultados descritos por Payolla et al. (2020). A fim de complementar os dados já obtidos, no presente estudo, o complexo VO (oro) foi selecionado e investigado por meio de outras análises toxicogenéticas buscando um possível mecanismo de ação, bem como fornecer dados confiáveis que subsidiem futuras pesquisas clínicas.

De acordo com os nossos resultados, o ligante ácido orótico não foi citotóxico nas condições de avaliação deste estudo, demonstrando que o perfil de citotoxicidade de VO (oro) está relacionado com o sal metálico,  $\text{VOSO}_4$ . No entanto,  $\text{VOSO}_4$  foi mais citotóxico que o complexo em ambas linhagens celulares e com menor IS, independente do sistema-teste usado. Esses resultados mostram que o vanádio, quando complexado com um ligante biologicamente relevante, apesar de reduzir sua capacidade citotóxica, torna-se mais seletivo para as células tumorais, causando menores danos em células não tumorais, efeito este desejável para que os efeitos adversos sejam reduzidos quando pensamos em sua possível aplicação terapêutica.



Os ligantes são importantes na modificação dos efeitos biológicos de drogas baseadas em metais, podendo garantir a proteção de alguns tecidos contra íons metálicos tóxicos e, em uma estratégia de contraste, aumentar a absorção de íons metálicos farmacologicamente ativos em outros (THOMPSON; ORVIG, 2006).

Sobre os sistemas-teste, o ensaio de exclusão com azul de *trypan* é uma técnica simples e rápida para medir a viabilidade celular a partir da integridade da membrana celular. Entretanto, é possível que a viabilidade de uma célula possa ter sido comprometida mesmo com a integridade de membrana mantida, pelo menos temporariamente (STROBER, 2015). Por isso, a necessidade de complementar a avaliação com outros ensaios. O ensaio de eficiência clonogênica é um método considerado padrão-ouro para estudar o efeito citotóxico a longo prazo na proliferação celular (FRANKEN et al., 2006).

A combinação dos ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro* fornecem informações que colaboram no entendimento dos mecanismos pelos quais um xenobiótico atua a nível celular, podendo assim relacioná-los com os processos fisiológicos *in vivo* (MENYHÁRT et al., 2016).

Payolla et al. (2020) já haviam demonstrado que VO (oro) causa citotoxicidade por interferência no perfil metabólico celular evidenciado pelo método da resazurina.

Os resultados do presente estudo complementam sugerindo então que VO (oro) altera a integridade da membrana e interfere na capacidade de clonogenicidade, de maneira dependente da célula usada, o que pode ser acompanhado visualmente pelas imagens de microscopia (Figura 8), que demonstraram a alteração morfológica das células em cultura com crescimento em monocamada.

As alterações morfológicas foram notadas nas células HepG2 após tratamentos por 24 horas com 25 e 50  $\mu\text{M}$  de VO (oro), enquanto que em GM 07492A, as diferentes doses testadas não induziram essa alteração. Owusu-Yaw et al. (1990) também mostraram de forma semelhante os efeitos dos compostos metavanadato de amônio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), óxido de vanádio(III) ( $\text{V}_2\text{O}_3$ ) e  $\text{VOSO}_4$  (sal metálico também avaliado neste estudo), que desencadearam alterações de morfologia, com o arredondamento das células e perda da definição nucleolar, que por sua vez foram atribuídas às alterações na topologia e função dos microtúbulos e microfilamentos.

Wang et al. (2010) descreveram a atividade biológica de três compostos de vanádio, denominados metavanadato de sódio ( $\text{NaVO}_3$ ), bis(maltolato)oxovanádio(IV) ( $\text{VO}(\text{ma})_2$ ) e bis(acetilacetato)-oxovanádio(IV) ( $\text{VO}(\text{acac})_2$ ). Dentre os resultados

obtidos, os autores mostraram que os compostos inibem significativamente a proliferação de células HepG2 e exibem apenas um discreto efeito nas células L02 hepáticas imortalizadas, indicando também possuírem seletividade para células tumorais.

Lu et al. (2019) avaliaram a relação estrutura-atividade de diferentes complexos de vanádio, tendo como centro metálico o cloreto de vanádio ( $VCl_3$ ) e diferentes ligantes frente ao potencial antitumoral. Os complexos revelaram valores de  $IC_{50}$  que variaram de 5 a 17,96  $\mu M$  contra várias linhagens tumorais, inclusive em HepG2. Além disso, os autores evidenciaram a capacidade dos complexos de vanádio em inibir notavelmente a clonogenicidade celular e relataram alterações morfológicas características do processo apoptótico em células MGC803 (linhagem celular de câncer gástrico humano), de maneira dose-dependente, após 24 horas de tratamento, quando avaliado pelo ensaio com Anexina V-FITC/ IP.

Narla et al. (2000) descreveram a síntese e a caracterização de 15 novos complexos de oxovanádio(IV), e examinaram a atividade citotóxica contra 14 diferentes linhagens de células tumorais humanas. Os resultados mostraram que os compostos de oxovanádio induzem apoptose em células tumorais e que principalmente o composto nomeado  $[VO(Me_2-fen)_2]$  (bis-quelutado-fen) pode ser útil no tratamento do câncer.

VO (oro) também mostrou ser um efetivo indutor de apoptose em células HepG2 após a análise da marcação com anexina V conjugada com o fluorocromo FITC e com IP. O complexo levou a 47,5% de morte celular por apoptose inicial e 26% por apoptose tardia. Nas células GM 07492A, a morte provocadas por VO (oro) também foi pela via apoptótica, porém em taxas menores, com 16,5% por apoptose inicial e 12,5% por apoptose tardia, resultado este já esperado, visto que na intenção de comparar os efeitos sobre as duas linhagens com a mesma concentração, a escolha da dose partiu da citotoxicidade em HepG2. Desta forma, a concentração testada em GM 07492A seria menos citotóxica, o que já teria sido evidenciado nos ensaios de citotoxicidade, e que explica a menor quantidade de células marcadas.

Em um contexto geral, a citotoxicidade dos quimioterápicos está relacionada principalmente com a indução de apoptose (AUBRECHT et al., 1999). A apoptose é uma forma de morte celular e um mecanismo fisiológico altamente organizado para destruir células danificadas. Este processo é caracterizado por alterações bioquímicas e morfológicas que incluem encolhimento celular e nuclear, condensação da

cromatina, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (EVANGELOU, 2002).

Como a morte celular desregulada é uma característica comum de muitas doenças, incluindo o câncer (ARIAS-GONZÁLEZ et al., 2018), a apoptose é o tipo de morte celular mais desejada pelos tratamentos anticâncer, pois seus processos não envolvem extravasamento de conteúdos celulares, o que evita uma resposta inflamatória local e, portanto, danos teciduais (SU et al., 2015). À vista disso, o uso de fármacos que induzem apoptose em células tumorais é uma estratégia bastante explorada.

A indução da morte celular apoptótica por compostos à base de vanádio está bem estabelecida, e muitos registros com diferentes complexos já foram efetivados (KOWALSKI; WYRZYKOWSKI; INKIELEWICZ-STĘPNIAK, 2020). Tanto o vanádio inorgânico quanto alguns dos complexos levam à apoptose celular por meio de eventos intracelulares clássicos, como parada do ciclo celular, dissipação do potencial da membrana mitocondrial, indução do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, liberação do citocromo c, ativação da proteína pró-apoptótica, ativação das caspases, fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos, o que leva à morte celular. Tudo isso é mediado pela ativação de várias moléculas de sinalização, como MAPK, NF- $\kappa$ B e EROs (DEL CARPIO et al., 2018; EVANGELOU, 2002).

Recentemente, Bakhshi Aliabad et al. (2019) demonstraram a indução de apoptose em células HepG2 pelo complexo de vanádio(IV) com 4-bromo-2-(((5-cloro-2-hidroxifenil) imino) metil) fenol, denominado [IV(L)], dependente da via p53-p21.

Lu et al. (2019) observaram que após o tratamento com o complexo [C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>SVC<sub>l</sub>]<sub>2</sub>, identificado como 19, a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 diminuiu de maneira dose-dependente, enquanto a expressão da proteína pró-apoptótica BAX elevou. Além disso, o acúmulo de BAX estava envolvido na ativação das caspases, posteriormente promovendo a liberação de citocromo e outros fatores pró-apoptóticos da mitocôndria, concluindo ao final que a apoptose ocorria através da via mediada por caspase.

Em contraposição aos resultados do nosso estudo e aos demais citados acima, Kowalski et al. (2017) demonstraram que o composto de vanádio ligado covalentemente com ligante orgânico fenantrolina ([VO(oda)(fen)](H<sub>2</sub>O)<sub>1,5</sub>) e o conectado como contra-íons também com fenantrolina ([fenH][VO(ota)(H<sub>2</sub>O)](H<sub>2</sub>O)<sub>0,5</sub>), desencadeiam morte por necrose, o que ressalta a importância dessa avaliação.

O potencial citotóxico, antiproliferativo e indutor de apoptose em linhagens tumorais pode estar relacionado direta ou indiretamente ao DNA. Na quimioterapia clássica, os compostos anticâncer têm como alvo direto o DNA, causando lesões e, por fim, desencadeando a morte celular. Isso está de acordo com o paradigma da cisplatina, no qual uma das principais vias terapêuticas é baseada na interação com o DNA para gerar reticulações inter e intra-fitas (KOWALSKI; WYRZYKOWSKI; INKIELEWICZ-STĘPNIAK, 2020).

No entanto, sabe-se que a morte celular pode resultar, em parte, da interação da droga com componentes celulares diferentes do DNA, e essas interações não necessariamente contribui para a indução de mutações. Outra possibilidade é que a morte celular e a indução de mutação possam resultar de aductos de DNA quimicamente distintos. Alternativamente, lesões de DNA quimicamente idênticas podem resultar em morte celular ou mutação, dependendo do resultado da tentativa de reparo do DNA (SANDERSON; JOHNSON; HENNER, 1991).

VO (oro) não induziu um aumento na extensão de danos ao DNA detectáveis pelo ensaio do cometa, nem efeitos mutagênicos nas cepas bacterianas de *S. Typhimurium* no teste de Ames, porém, na maior concentração avaliada, foi capaz de provocar um aumento estatisticamente significativo da frequência de MNs comparado ao controle negativo. Esses resultados sugerem que VO (oro) não causa quebras de fita de DNA e não afeta diretamente a estrutura do DNA induzindo mutações gênicas, mas sim, altera a distribuição cromossômica durante a divisão celular. Além disso, ainda dentro dos parâmetros avaliados no ensaio do MN, é necessário ressaltar a diminuição do valor de IDN comparando com o controle negativo (IDN:  $1,93 \pm 0,05$ ) na concentração próxima ao valor de  $IC_{50}$  ( $12,5 \mu M$ , IDN:  $1,35 \pm 0,06$ ), confirmando que VO (oro) interfere no estado proliferativo das células.

O ensaio do Cometa detecta lesões no DNA antes do mecanismo de reparo. O princípio básico deste teste é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migram em direção ao pólo positivo (LU; LIU; YANG, 2017; SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). O teste de Ames avalia a indução de mutações gênicas, por meio de linhagens de *Salmonella Typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), com genótipos que as tornaram sensíveis a diferentes eventos mutacionais, sendo então considerado um teste padrão ouro no

estudo de mutagenicidade (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000) e o teste do MN, mutações cromossômicas, sendo hoje um dos testes citogenéticos mais bem estabelecidos no campo da genética toxicológica, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (FENECH, 2007; KIRSCH-VOLDERS et al., 2014).

Os compostos de vanádio já são conhecidos por afetar o processo normal de síntese de DNA, bem como influenciar em seu mecanismo de reparo (MIGLIORE et al., 1993).

Há relatos de que, em geral, os compostos de vanádio não são mutagênicos para as bactérias, mas produzem danos clastogênicos e aneugênicos (quebras de DNA e má segregação cromossômica, respectivamente) em algumas células (ASSEM; LEVY, 2009).

No presente estudo, a escolha da linhagem tumoral HepG2 para os ensaios de citotoxicidade, MN e Cometa, não se deu somente pela maior sensibilidade ao vanádio, mas também por apresentarem perfil de metabolização (KNASMÜLLER et al., 1998), pois muitas vezes a toxicidade não está relacionada ao complexo por si só, mas sim aos seus metabólitos. As células HepG2 possuem a capacidade de manter a atividade de enzimas da fase I e II, além de muitas funções especializadas normalmente perdidas pelos hepatócitos primários em cultura, como por exemplo a secreção de proteínas do plasma (GARCIA-CANTON et al., 2013; HEWITT; HEWITT, 2004).

Galli et al. (1991) confirmaram que os compostos de vanádio avaliados, dentre eles  $\text{VOSO}_4$ , sal metálico usado neste estudo, são potencialmente agentes antitubulínicos em células eucarióticas e embora sejam muito tóxicos nas células V79, nenhum efeito mutagênico foi observado na presença ou na ausência da fração S9.

Migliore et al. (1993) confirmaram o potencial aneuploidogênico de quatro compostos de vanádio, sendo eles  $\text{NaVO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) e  $\text{VOSO}_4$ . Uma considerável indução de MNs foi encontrada em todas as concentrações testadas dos diferentes compostos.

Rodríguez-Mercado et al. (2011) demonstraram o potencial genotóxico do vanádio em seus estudos, testando o metal em três estados de oxidação (III, IV e V). Os resultados mostraram que tratamentos com tetraóxido de vanádio (IV) aumentou significativamente os danos ao DNA em todas as concentrações por 4 ou 6 horas de tratamento. Mas com relação as células expostas ao vanádio III e V por 4 h, a cinética

de reparo do DNA indicou que a maioria delas se recuperaram dentro do tempo de incubação de reparo de 90 min.

A mutagenicidade de VO (oro) evidenciada somente na máxima concentração possível de testagem pelo ensaio do MN sugere que a citotoxicidade do complexo está relacionada a instabilidade gênômica, porém não exclusivamente, podendo agir também por outros mecanismos de ação.

A ausência ou baixa mutagenicidade e genotoxicidade de complexos candidatos a fármacos quimioterápicos é um aspecto importante, pois alguns tratamentos, como os utilizando a cisplatina, podem ter consequências negativas de longo prazo por meio da indução de alterações genômicas. Em células somáticas normais, as mutações induzidas pela quimioterapia podem acelerar os processos tumorigênicos. Além disso, as mutações induzidas pelo tratamento em células cancerosas sobreviventes aumentam a heterogeneidade genética do tumor e podem contribuir para o desenvolvimento de resistência ao tratamento posterior (NATH; VATS; ROY, 2013).

Sobre a capacidade de permeação na membrana celular, seguindo a classificação de Yee (1997), VO (oro) pode ser classificado como fármaco de alta absorção, mesmo demonstrando baixa lipofilicidade, ou seja, com baixo valor de Log P.

Alguns estudos em monocamadas de Caco-2 mostram que a permeabilidade de alguns fármacos tende ser proporcional ao aumento de sua lipofilicidade (NATH; VATS; ROY, 2013). De acordo com as regras propostas por Nath et al. (2013), aproximadamente 90% dos fármacos seguem que o aumento da absorção através de membranas celulares está relacionado com o aumento da lipofilia, com log P dentro da faixa  $\leq 5$  e  $\geq 0$ .

No entanto, de acordo com a literatura, os compostos de vanádio podem atravessar a membrana celular através dos canais de fosfato ou sulfato, transportadores de citrato de membrana, transportadores de lactato (transportador de monocarboxilato, MCT1) e transportador de ânion orgânico (OCT), o que pode justificar, em parte, os resultados obtidos neste trabalho (YANG et al., 2003; TREVIÑO et al., 2019).

Segundo Artursson et al. (2012), drogas hidrofílicas são transportadas parcialmente através dos poros de água da via paracelular através do epitélio

intestinal, ou também pela via transcelular através do transporte mediado por proteínas carreadoras e canais, o que corrobora com nossa hipótese.

Outro aspecto importante é que, apesar da lipofilicidade auxiliar na permeação da molécula, altos valores de log P, ou seja, compostos muito lipofílicos, tendem a se acumular no interior das células (FOSSATI et al., 2008; KRISHNA et al., 2001), logo, a baixa lipofilicidade de VO (oro) é um ponto positivo, pois impede ou ao menos reduz a quantidade de complexo retido nas células, podendo conseqüentemente gerar menor toxicidade.

Vale ressaltar que a escolha da linhagem Caco-2 para a realização do ensaio de permeabilidade *in vitro* se dá por sua capacidade de diferenciação espontânea, expressando características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano, como as microvilosidades na posição apical, além de junções estreitas entre as células adjacentes, expressão de proteínas de transporte, conjugação de proteínas de efluxo e enzimas de fase II (FERNANDES et al., 2015).

Zhang et al. (2006) avaliaram a permeabilidade de três complexos de vanádio (III, IV, V)-dipicolinato em monocamada de células Caco-2. Todos os complexos exibiram a permeabilidade de membrana intermediária (*P<sub>app</sub>* variando de 1,4 a 3,0 x 10<sup>-6</sup> cm/s), com baixo nível de acumulação celular (<1%) em 60 minutos de incubação.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas no presente estudo, os dados obtidos permitem concluir que:

- ✓ O complexo VO (oro) é citotóxico interferindo na integridade da membrana celular e na capacidade de clonogenicidade, além de apresentar seletividade para as células HepG2 comparando com a linhagem não tumoral GM 07492A, tanto pelo ensaio de exclusão com azul de *trypan* quanto pelo ensaio de sobrevivência clonogênica;
- ✓ Nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$ , o complexo altera a morfologia celular das células HepG2, enquanto nenhum efeito é observado para a linhagem GM 07492A, a não ser a redução de densidade dos aglomerados de células;
- ✓ A morte celular induzida por via apoptótica em ambas as linhagens, é de forma mais acentuada nas células HepG2;
- ✓ O complexo não apresenta potencial genotóxico pelo ensaio do cometa, nem potencial mutagênico quando avaliado pelo teste de Ames, mostrando que não induz mutação gênica. No entanto, demonstra efeito em nível cromossômico, dependente da concentração quando avaliado pelo ensaio do MN;
- ✓ O complexo VO (oro) apresenta baixa lipofilicidade, mas uma alta capacidade de permeabilidade celular quando avaliado na linhagem tumoral Caco-2;

De uma maneira geral, VO (oro) possui capacidade de permear a membrana celular, é citotóxico, danifica o DNA, podendo levar ao bloqueio do ciclo de divisão celular e a indução de morte pela via apoptótica.

Em suma, este trabalho permitiu explorar variados aspectos biológicos do complexo de oxovanádio VO (oro), sendo que os resultados aqui presentes poderão dar subsídio para a continuidade da pesquisa com o complexo como um possível fármaco antitumoral.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 27–36, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **How Chemotherapy Drugs Work**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>>. Acesso em: 28 dez. 2020.

ARIAS-GONZÁLEZ, I. et al. Cytotoxic effect of Kalanchoe flammula and induction of intrinsic mitochondrial apoptotic signaling in prostate cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 133–147, 2018.

ASSEM, F. L.; LEVY, L. S. A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: Gaps in knowledge and directions for future research. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 4, p. 289–306, 2009.

AUBRECHT, J. et al. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 228–235, 1999.

BAKHSI ALIABAD, H. et al. Vanadium Complex Induced Apoptosis in Hepg2 Cells By the Up-Regulation of P53, P21, and Caspase-8. **World Cancer Research Journal**, n. L, p. 1–7, 2019.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour complexes and DNA interactions and their tools of analysis: An approach to metalointercalators. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: Towards new targets. **Chemical Communications**, v. 49, n. 45, p. 5106–5131, 2013.

BELLI, C. et al. Targeting the microenvironment in solid tumors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 65, p. 22–32, 2018.

BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 197–206, 2008.

CADET, J.; RICHARD WAGNER, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, 2013.

CARVALHO, M. A. et al. A silver complex with tryptophan: Synthesis, structural characterization, DFT studies and antibacterial and antitumor assays in vitro. **Journal of Molecular Structure**, v. 1031, p. 125–131, 2013.

CASTAN, P. et al. Platinum and palladium complexes of 3-methyl orotic acid: A route toward palladium complexes with good antitumor activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 225–239, 1990.

CHELOPO, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 407–414, 12 ago. 2013.

CHEN, D. et al. Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 7, p. 777–791, 2009.

COOPER, G. M. **The Development and Causes of Cancer - The Cell - NCBI Bookshelf**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>>. Acesso em: 28 dez. 2020.

COSTA PESSOA, J.; TOMAZ, I. Transport of Therapeutic Vanadium and Ruthenium Complexes by Blood Plasma Components. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3701–3738, 2010.

CRANS, D. C. et al. Hydrophobicity may enhance membrane affinity and anti-cancer effects of Schiff base vanadium(v) catecholate complexes. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 19, p. 6383–6395, 2019.

CRUZ, O. J. D.; UCKUN, F. M. Metvan: A novel oxovanadium (IV) complex with broad spectrum anticancer activity. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 11, n. 12, p. 1829–1836, 2002.

DEL CARPIO, E. et al. Vanadium: History, chemistry, interactions with  $\alpha$ -amino acids and potential therapeutic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 372, p. 117–140, 2018.

ESPINOSA, E. et al. Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 6, p. 515–523, 2003.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 3, p. 249–265, 2002.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2022–2036, 2015.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, 2007.

FERNANDES, M. B. et al. Caco-2 cells permeability evaluation of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 7, p. 1066–1072, 2015.

FOSSATI, L. et al. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, n. 1–2, p. 148–155, 2008.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FREIRE, R. L. M. et al. Synthesis and evaluation of platinum complexes with potential antitumor activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1–7, 2017.

FRÍAS GONZÁLEZ, S. E. et al. Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer. **Toxicology**, v. 314, n. 1, p. 155–165, 2013.

GAÁL, A. et al. Metal transport capabilities of anticancer copper chelators. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 47, p. 79–88, 2018.

GALLI, A. et al. Genotoxicity of vanadium compounds in yeast and cultured mammalian cells. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 11, n. 4, p. 175–183, 1991.

GAMBINO, D. Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agentes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 19-20, p. 2193-2203, 2011.

GAO, L. et al. The improved antitumor efficacy of continuous intratumoral chemotherapy with cisplatin-loaded implants for the treatment of sarcoma 180 tumor-bearing mice. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 208–215, 2019.

GARCIA-CANTON, C. et al. Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1719–1727, 2013.

GOMES, C. C. et al. Assessment of the genetic risks of a metallic alloy used in medical implants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 116–121, 2011.

GRAU, J. et al. Evaluation of the metal-dependent cytotoxic behaviour of coordination compounds. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 14, p. 4902–4908, 2018.

HADJIADAMOU, I. et al. Synthesis of vitamin E and aliphatic lipid vanadium(IV) and (V) complexes, and their cytotoxic properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 208, p. 111074, 2020.

HAJDU, S. I. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, p. 1097–1102, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEWITT, N. J.; HEWITT, P. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. **Xenobiotica**, v. 34, n. 3, p. 243–256, 2004.

HEYLIGER, C. E.; TAHILIANI, A. G.; MCNEILL, J. H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1474–1477, 1985.

HITCHINGS, G. H.; ELION, G. B.; VANDERWERFF, H. The Limitations of Inhibition Analysis. **J Biol Chem**, v. 174, n. 3, p. 1037, 1948.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111–2119, 2007.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil (Estimativa 2020)**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2020.

IRVING, E.; STOKER, A. W. Vanadium compounds as PTP inhibitors. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2269, 2017.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-A HUMN project perspective. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 759, n. 1, p. 49–58, 2014.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1–2, p. 185–202, 1998.

KORBECKI, J. et al. Sodium Orthovanadate Changes Fatty Acid Composition and Increased Expression of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase in THP-1 Macrophages. **Biological Trace Element Research**, v. 193, n. 1, p. 152–161, 2020.

KOWALSKI, S. et al. Selective cytotoxicity of vanadium complexes on human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line by inducing necroptosis, apoptosis and mitotic catastrophe process. **Oncotarget**, v. 8, n. 36, p. 60324–60341, 2017.

KOWALSKI, S.; WYRZYKOWSKI, D.; INKIELEWICZ-STĘPNIAK, I. Molecular and cellular mechanisms of cytotoxic activity of vanadium compounds against cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1757, 2020.

KRISHNA, G. et al. Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n. 1, p. 77–89, 2001.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v. 13, 2018.

LEÓN, I. E. et al. Vanadium and cancer treatment: Antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 106–117, 2014.

LI, Z. et al. Electrochemical methods for probing DNA damage mechanisms and designing cisplatin-based combination chemotherapy. **BioTechniques**, v. 66, n. 3, p. 135–142, 2019.

LÖFFLER, M.; CARREY, E. A.; ZAMEITAT, E. Orotic Acid, More Than Just an Intermediate of Pyrimidine de novo Synthesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, n. 5, p. 207–219, 2015.

LÖFFLER, M.; CARREY, E. A.; ZAMEITAT, E. Orotate (orotic acid): An essential and versatile molecule. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 35, n. 10–12, p. 566–577, 2016.

LU, L. et al. Inhibition protein tyrosine phosphatases by an oxovanadium glutamate complex,  $\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Glu})_2(\text{CH}_3\text{OH})]$  (Glu = glutamate). **BioMetals**, v. 23, n. 6, p. 1139–1147, 9 dez. 2010.

LU, L. P. et al. Synthesis and biological evaluation of vanadium complexes as novel anti-tumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 1–10, 2019.

LU, Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 128, p. 2–7, 2017.

LUNDQVIST, E. Å.; FUJIWARA, K.; SEOUD, M. Principles of chemotherapy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, p. S146–S149, 2015.

MAHVI, D. A. et al. Local Cancer Recurrence: The Realities, Challenges, and Opportunities for New Therapies. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 488–505, 2018.

MANOHAR, S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **Journal of Nephrology**, v. 31, n. 1, p. 15–25, 2018.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, 1983.

MENYHÁRT, O. et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1866, n. 2, p. 300–319, 2016.

MIGLIORE, L. et al. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 319, n. 3, p. 205–213, 1993.

MONTANARO, L. et al. Promising in vitro performances of a new nickel-free stainless steel. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 3, p. 267–275, 2006.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 20 nov. 2000.

NAGLAH, A. M. et al. A novel oxidovanadium (IV)-Orotate complex as an alternative antidiabetic agent: Synthesis, characterization, and biological assessments. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

NARLA, R. K. et al. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1546–1556, 2000.

NATH, M.; VATS, M.; ROY, P. Tri- and diorganotin(IV) complexes of biologically important orotic acid: Synthesis, spectroscopic studies, in vitro anti-cancer, DNA fragmentation, enzyme assays and in vivo anti-inflammatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. Iv, p. 310–321, 2013.

NI, L. et al. Synthesis, in vitro cytotoxicity, and structure-actIvity relationships (SAR) of multidentate oxidovanadium(IV) complexes as anticancer agents. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 30, p. 10035–10045, 2018.

OWUSU-YAW, J. et al. An assessment of the genotoxicity of vanadium. **Toxicology Letters**, v. 50, n. 2–3, p. 327–336, 1990.

PAYOLLA, F. B. et al. In vitro Studies of Antitumor Activity of Vanadium Complexes with Orotic and Glutamic Acids. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2020.

PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301–302, p. 24–48, 2015.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2–3, p. 83–94, 2004.

REHDER, D. Perspectives for vanadium in health issues. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 325–338, 2016.

RODRÍGUEZ-MERCADO, J. J.; MATEOS-NAVA, R. A.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. A. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 1996–2002, 2011.

ROWE, L. A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P. W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 8, p. 1167–1177, 2008.

ROZZO, C. et al. Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 174, p. 14–24, 2017.

RUBBIANI, R.; WAHRIG, B.; OTT, I. Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 961–965, 2014.

SANDERSON, B. J. S.; JOHNSON, K. J.; HENNER, W. D. Dose-dependent cytotoxic and mutagenic effects of antineoplastic alkylating agents on human lymphoblastoid cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 243, n. 17 (4), p. 238–243, 1991.

SANNA, D.; MICERA, G.; GARRIBBA, E. On the transport of vanadium in blood serum. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 13, p. 5747–5757, 2009.



SHAHID, F.; FAROOQUI, Z.; KHAN, F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. **European Journal of Pharmacology**, v. 827, p. 49-57, 2018.

SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 20–31, 2015.

SILVEIRA-DORTA, G.; MARTÍN, V. S.; PADRÓN, J. M. Synthesis and antiproliferative activity of glutamic acid-based dipeptides. **Amino Acids**, v. 47, n. 8, p. 1527–1532, 23 ago. 2015.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015.

SZIKRISZT, B. et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2016.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: New vistas and challenges in drug design. **Dalton Transactions**, n. 6, p. 761–764, 2006.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 35, p. 112–122, 2000.

TREVIÑO, S. et al. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. **Biological Trace Element Research**, v. 188, n. 1, p. 68–98, 2019.

WANG, Q. et al. Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 1087–1097, 2010.

WANG, X.; WANG, X.; GUO, Z. Functionalization of Platinum Complexes for Biomedical Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 9, p. 2622–2631, 2015.

XIAO, F. et al. Cleavage enhancement of specific chemical bonds in DNA by cisplatin radiosensitization. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 17, p. 4893–4900, 2013.

XU, J.; MAO, W. Overview of Research and Development for Anticancer Drugs. **Journal of Cancer Therapy**, v. 07, n. 10, p. 762–772, 2016.

YANG, X. et al. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 237, n. 1–2, p. 103–111, 2003.

YEE, S. In vitro permeability across caco 2 cells can predict in vivo absorption in man. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.

YEH, C. C. et al. Vanadium derivative exposure promotes functional alterations of VSMCs and consequent atherosclerosis via ROS/p38/NF- $\kappa$ B-mediated IL-6 production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 1–18, 2019.

ZHANG, Y. et al. The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium (III, IV, V)-dipicolinate complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 1, p. 80–87, 2006.

ZWOLAK, I. Protective Effects of Dietary Antioxidants against Vanadium-Induced Toxicity: A Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1-14 2020.