



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE ENFERMAGEM
CURSO DE BACHARELADO EM ENFERMAGEM

KELVYN KENNEDY DE FIGUEIREDO SILVA

**COMPLEXOS DE Pd(II)-TIPO MELOFEN COM DUPLO EFEITO:
ANTICANCERÍGENO E ANTIANGIOGÊNICO**

CUITÉ-PB

2023

KELVYN KENNEDY DE FIGUEIREDO SILVA

**COMPLEXOS DE Pd(II)-TIPO MELOFEN COM DUPLO EFEITO:
ANTICANCERÍGENO E ANTIANGIOGÊNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Enfermagem, do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna Braga Dantas

CUITÉ-PB

2023

S586c Silva, Kelvyn Kennedy de Figueiredo.

Complexos de Pd (II) - tipo Melofen com duplo efeito: anticancerígeno e antiangiogênico. / Kelvyn Kennedy de Figueiredo Silva. - Cuité, 2023.

54 f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enfermagem).
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2023.
"Orientação: Profa. Dra. Bruna Braga Dantas".

Referências.

1. Câncer. 2. Câncer - tratamento - quimioterapia. 3. Agentes quimioterápicos. 4. Anticancerígeno. 5. Antiangiogênico. 6. Bases de Schiff. 7. *Artemia salina*. I. Dantas, Bruna Braga. II. Título.

CDU 616-006.4(043)

KELVYN KENNEDY DE FIGUEIREDO SILVA

**COMPLEXOS DE Pd(II)-TIPO MELOFEN COM DUPLO EFEITO:
ANTICANCERÍGENO E ANTIANGIOGÊNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Enfermagem, do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Bruna Braga Dantas
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
Orientadora

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
Membro Titular

Profa. Dra. Vanessa Santos de Arruda Barbosa
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
Membro Titular

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos, me ajudar a percorrê-los com sabedoria e por ser fonte de encorajamento nos momentos de desânimo.

À minha mãe, Raimunda Bárbara Daliane da Silva, que sempre acreditou que a educação pode transformar vidas e por sempre me estimular a ser cada vez melhor. És a minha maior razão para crescer e me tornar um grande homem. Muito obrigado por todas as renúncias, esforços e abdições que fez em prol dos meus sonhos. Estou certo e tenho a plena convicção de que sem o apoio e incentivo da senhora minha formação acadêmica não seria possível.

Ao meu pai, José Clodoaldo de Figueiredo, que mesmo diante da distância geográfica existente nunca deixou de estar perto. Obrigado por me aconselhar, me ensinar que o céu é o limite e, principalmente, por ser um exemplo de força, coragem e perseverança.

Ao meu irmão, José Brayan Gabriel da Silva Santos, pelo seu amor tão puro e genuíno, por ser minha motivação para prosseguir e enfrentar os obstáculos cotidianos. Esses anos longe de casa mostraram-me, ainda mais, o quanto és importante e o quanto te amo.

Aos meus avós, Raimunda Francisca da Silva e José Alexandre da Silva, Rita Figueiredo de Souza e Clodomiro Fernando de Lima (*in memoriam*), exemplos de fé, princípios e valores, pelo imensurável amor, carinho e cuidado. Obrigado por todo o auxílio durante os últimos anos e pelas inúmeras orações, as quais foram imprescindíveis para o meu fortalecimento diário.

Aos demais membros da minha família que de alguma forma me incentivaram, torceram e vibraram pelas minhas conquistas. Em especial à minha tia, Santana Francisca de Figueiredo Lima, por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha trajetória.

À minha grande amiga, Beatriz de Medeiros Dantas, pelo companheirismo constante e pelos bons momentos que passamos juntos. Você foi essencial durante esses anos. Agradeço pela oportunidade de tê-la em minha vida. Nossos caminhos se uniram em Cuité para nunca se separar. Espero que o nosso elo de amizade se consolide ainda mais com o decorrer dos anos.

Aos amigos e companheiros do curso de Bacharelado em Enfermagem, por tornarem essa caminhada mais tranquila. Em especial, à Bárbara, Maria Aparecida, Maria Eduarda, Maria Raquel, Maria Janaína, Maria Letícia, Rayssa, Lílian e Gerlane pela amizade, cumplicidade e torcida durante todos esses anos de graduação.

Aos meus colegas do Observatório de Câncer do Curimataú (OCC), por todos os conhecimentos partilhados e pelas inúmeras discussões enriquecedoras ao longo deste período acadêmico. Foi um prazer conviver e aprender com vocês.

À minha estimada orientadora, Profa. Dra. Bruna Braga Dantas, por ter confiado e acreditado na minha capacidade e por me permitir vislumbrar os percursos da pesquisa científica. Deus foi muito generoso comigo por ter colocado a senhora no meu caminho e creio que só Ele sabe o quão importante sua presença se faz na minha vida. Agradeço-lhe profundamente por toda a orientação e, principalmente, pelos valorosos ensinamentos transmitidos, que foram além deste trabalho. Sua inteligência, competência, responsabilidade e dedicação fazem de ti a minha maior referência no âmbito acadêmico, pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira e Profa. Dra. Vanessa Santos de Arruda Barbosa, que gentilmente aceitaram o convite para participar da avaliação deste estudo. Tenho certeza que as sugestões aqui inseridas serão de grande valia para o refinamento e aperfeiçoamento do produto final.

À toda a equipe da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Ezequias Venâncio da Fonseca, com quem tive o prazer de conviver e estabelecer um vínculo consistente durante todo o Estágio Supervisionado em Enfermagem I. Em especial, à Adriana de Lima Tavares e Wilma Maravilha de Macêdo e Silva, pela acolhida e receptividade no serviço.

À minha preceptora de Estágio Supervisionado, Renata Inácio de Andrade Silva, por me receber de braços abertos em seu ambiente de trabalho e por desempenhar a Enfermagem com ética, afinco e excelência. Você fez a diferença na minha formação e em muito contribuiu para o meu crescimento profissional. Receba minha eterna gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Jailton de Souza Ferrari, pela sua inestimável colaboração para que este trabalho se tornasse exequível, mediante a síntese e fornecimento dos complexos metálicos de paládio estruturalmente relacionados a bases de Schiff.

Ao Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo, pela gentileza em disponibilizar a estrutura do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal da Paraíba, para realização do cultivo celular e ensaio do MTT.

Aos meus nobres professores, pilares da minha formação acadêmica, pelos preciosos ensinamentos técnico-científicos e por exercerem a profissão com tanta maestria.

À Universidade Federal de Campina Grande, instituição maior, pela oportunidade de desenvolvimento da minha carreira profissional e pelo suporte físico e administrativo.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPESQ, pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que não foram citadas, mas contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

O câncer é considerado uma das causas mais comuns de mortalidade no mundo e designa um conjunto de doenças caracterizadas pela presença de células em crescimento descontrolado, capazes de se dividirem rapidamente e migrarem, provocando metástase. Dentre as abordagens terapêuticas utilizadas em seu tratamento, a quimioterapia é o método de maior acessibilidade e uso clínico. Todavia, efeitos secundários adversos e resistência à múltiplas drogas continuam sendo um enorme desafio face aos agentes quimioterápicos. Uma estratégia promissora para abordar essa questão tem sido relacionada à prospecção de novos agentes farmacológicos com especificidade para as células cancerígenas. Assim, um ramo favorável para o qual novas terapias têm se voltado diz respeito aos compostos com duplo efeito, ou seja, que apresentem a capacidade de comprometer a angiogênese tumoral e induzir a morte de células cancerígenas de forma específica e seletiva. Tais características podem ser encontradas em complexos metálicos, especialmente naqueles estruturalmente relacionados a bases de Schiff. Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo investigar a toxicidade e o potencial efeito anticancerígeno e antiangiogênico de quatro complexos metálicos de paládio estruturalmente relacionados a bases de Schiff. Para isso, foram realizados protocolos experimentais de toxicidade em modelos cancerígenos e não cancerígenos, além de protocolo para investigação da angiogênese. Inicialmente, para determinar a segurança no uso das moléculas, foi efetuado o bioensaio de toxicidade aguda com larvas de *Artemia salina* e o teste hemolítico em eritrócitos humanos. O tratamento com o precursor estrutural **pd1** induziu um elevado percentual de hemólise ($103,1 \pm 10,2\%$) e proporcionou toxicidade aos microcrustáceos com CL_{50} de $58,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Entretanto, os complexos **pd2-5** não induziram danos na membrana eritrocitária ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$), como também não foram tóxicos para os microcrustáceos ($CL_{50} > 200 \mu\text{M}$), frente às concentrações testadas, sendo selecionados para elucidação de suas respectivas propriedades biológicas. Subsequentemente, foi realizado o ensaio de avaliação da viabilidade celular (MTT) em linhagens de células tumorais humanas de câncer de mama isolada de tumor metastático triplo negativo (MDA-MB-231) e de glioma (U-373MG). Os quatro distintos complexos **pd2-5** demonstraram efeito citotóxico, com destaque para o **pd5** com CI_{50} de $162,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$ e $56,6 \pm 1,1 \mu\text{M}$, respectivamente, para a linhagem MDA-MB-231 e U-373MG. Adicionalmente, foram investigadas as propriedades antiangiogênicas das moléculas através do teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM). Todos os complexos metálicos **pd2-5** promoveram redução dos parâmetros vasculares avaliados, incluindo diâmetro, comprimento e número de ramificações dos vasos sanguíneos. Em conclusão, os resultados por ora obtidos demonstram que todos os complexos metálicos **pd2-5** avaliados apresentaram atividade anticâncer e foram capazes de comprometer a formação de novos vasos sanguíneos, sendo tais efeitos observados em concentrações subtóxicas, tornando-os, portanto, promissores para a prospecção de novos fármacos para o fortalecimento de uma linha alternativa para o tratamento do câncer, principalmente pelo fato de atuarem em dois alvos terapêuticos distintos do microambiente tumoral.

Palavras-chave: Agente anticâncer. Agente antiangiogênico. Toxicidade. Paládio. Bases de Schiff.

ABSTRACT

Cancer is considered one of the most common causes of mortality in the world and designates a set of diseases characterized by the presence of cells in uncontrolled growth, capable of dividing rapidly and migrating, causing metastasis. Among the therapeutic approaches used in its treatment, chemotherapy is the method of greatest accessibility and clinical use. However, adverse side effects and multidrug resistance remain a huge challenge with chemotherapeutic agents. A promising strategy to address this issue has been related to the prospecting of new pharmacological agents with specificity for cancer cells. Thus, a favorable branch towards which new therapies have been turned to concerns compounds with dual effect, i.e., that present the ability to compromise tumor angiogenesis and induce cancer cell death in a specific and selective way. Such characteristics can be found in metal complexes, especially those structurally related to Schiff's bases. Thus, the present study aimed to investigate the toxicity and the potential anticancer and antiangiogenic effect of four palladium metal complexes structurally related to Schiff's bases. To this end, experimental protocols for toxicity in cancer and non-cancer models were performed, in addition to a protocol for investigating angiogenesis. Initially, to determine the safety in the use of the molecules, the acute toxicity bioassay with *Artemia salina* larvae and the hemolytic test in human erythrocytes were performed. Treatment with the structural precursor **pd1** induced a high percentage of hemolysis ($103.1 \pm 10.2\%$) and provided toxicity to the microcrustaceans with CL_{50} of $58.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$. However, the **pd2-5** complexes did not induce damage to the erythrocyte membrane ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$), as well as were not toxic to microcrustaceans ($CL_{50} > 200 \mu\text{M}$) at the tested concentrations, and were selected for elucidation of their respective biological properties. Subsequently, cell viability (MTT) assessment assay was performed on human breast cancer tumor cell lines isolated from triple negative metastatic tumor (MDA-MB-231) and glioma (U-373MG). The four distinct **pd2-5** complexes demonstrated cytotoxic effect, most prominently **pd5** with CI_{50} of $162.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$ and $56.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$, respectively, for MDA-MB-231 and U-373MG lineage. Additionally, the antiangiogenic properties of the molecules were investigated using the chicken embryonated egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) assay. All **pd2-5** metal complexes promoted reduction of the evaluated vascular parameters, including diameter, length and number of branching of blood vessels. In conclusion, the results obtained so far demonstrate that all **pd2-5** metal complexes evaluated showed anticancer activity and were able to impair the formation of new blood vessels, with such effects observed in sub-toxic concentrations, making them, therefore, promising for the prospecting of new drugs to strengthen an alternative line for the treatment of cancer, mainly because they act in two distinct therapeutic targets of the tumor microenvironment.

Keywords: Anticancer agent. Antiangiogenic agent. Toxicity. Palladium. Schiff bases.

LISTA DE FIGURAS

Figura S1. Representação das estruturas químicas do acetato de paládio (pd1) e dos complexos metálicos de paládio (pd2-5) utilizados no presente estudo.....	34
Figura S2. Representação esquemática do ensaio de hemólise em eritrócitos humanos.	35
Figura S3. Representação esquemática do bioensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	36
Figura S4. Representação esquemática das etapas do cultivo celular.....	37
Figura S5. Representação esquemática do ensaio de redução do MTT.	38
Figura S6. Representação esquemática do teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM).	39
Figura S7. Análise da toxicidade de diferentes concentrações do DMSO (0,5%, 1,0%, 2,0%, 4,0% e 12,0%) em dois modelos distintos. (A) atividade hemolítica e (B) toxicidade aguda em larvas de <i>Artemia salina</i>	40
Figura S8. Efeito citotóxico das diferentes concentrações do DMSO (0,5% e 5,0%) sobre a viabilidade da linhagem U-373MG (A) e MDA-MB-231 (B), após um período de 24 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de redução do MTT.....	41
Figura S9. Efeito antiangiogênico do complexo metálico pd2 (10 µM) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico pd2, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.	42
Figura S10. Efeito antiangiogênico do complexo metálico pd3 (10 µM) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico pd3, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.	43
Figura S11. Efeito antiangiogênico do complexo metálico pd4 (10 µM) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico pd4, após um	

período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 44

Figura S12. Efeito antiangiogênico do complexo metálico **pd5** (10 μ M) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico pd5, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 45

Figura S13. Efeito angiogênico da solução salina avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com a solução salina, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 46

Figura S14. Efeito antiangiogênico da dexametasona avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com dexametasona, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 47

Figura S15. Efeito angiogênico do DMSO (0,02%) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com DMSO (0,02%), após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 48

Figura S16. Efeito antiangiogênico do DMSO (0,2%) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com DMSO (0,2%), após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 49

Figura S17. Efeito antiangiogênico do DMSO (2,0%) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com DMSO (2,0%), após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares. 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise da toxicidade dos distintos complexos metálicos de paládio (**pd1-5**) (≤ 200 μM) em eritrócitos humanos e em larvas de *Artemia salina*. 22
- Tabela 2.** Efeito citotóxico dos distintos complexos metálicos (**pd2-5**) e da substância controle (DMSO) sobre a viabilidade da linhagem MDA-MB-231 e U-373MG, após um período de 24 horas de tratamento, avaliado pelo método de redução do MTT. 23
- Tabela 3.** Análise dos distintos parâmetros vasculares, obtidos pelo ensaio do HET-CAM, após exposição da membrana corioalantóide com os diferentes complexos metálicos (**pd2-5**), com a substância controle (solução salina) e com a dexametasona, por 6 e 24 horas. 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP7A	<i>ATPase copper transporting alpha</i>
ATP7B	<i>ATPase copper transporting beta</i>
CES	Centro de Educação e Saúde
CI₅₀	Concentração inibitória média capaz de causar 50% do efeito máximo
CL₅₀	Concentração média capaz de induzir a morte de 50% dos organismos-teste
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTR1	Canais transportadores de cobre 1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GSH	Glutathiona
HCl	Ácido clorídrico
HET-CAM	Teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha
HR	Via de reparo por recombinação homóloga
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
MCA	Membrana corioalantóica
MDA-MB-231	Linhagem celular humana de câncer de mama isolada de tumor metastático triplo negativo
MMR	Via de reparo de incompatibilidade
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
MTs	Metalotioneínas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NA	Não se aplica
NaCl	Cloreto de sódio
NER	Via de reparo por excisão de nucleotídeos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pd1	Acetado de paládio

pd2	Complexo metálico de paládio 2
pd3	Complexo metálico de paládio 3
pd4	Complexo metálico de paládio 4
pd5	Complexo metálico de paládio 5
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TKIs	Inibidores da tirosina quinase
U-373MG	Linhagem celular de glioma humano
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 Tipo de estudo	16
2.2 Produtos químicos e reagentes	16
2.3 Moléculas estudadas	16
2.4 Testes de toxicidade.....	17
2.4.1 Ensaio de hemólise	17
2.4.2 Bioensaio de <i>Artemia salina</i>	17
2.5 <i>In vitro</i> – Atividade antitumoral	18
2.5.1 Cultura de células	18
2.5.2 Ensaio de redução do MTT	18
2.6 <i>Ex vivo</i> – Atividade antiangiogênica	19
2.6.1 Teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM)	19
2.7 Análise estatística	20
2.8 Aspectos éticos	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Avaliação da toxicidade	21
3.2 Efeitos biológicos	22
4 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27
DADOS SUPLEMENTARES.....	34
ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer é usado para denominar um conjunto com mais de 277 tipos diferentes de doenças, as quais são caracterizadas pela presença de células em crescimento descontrolado, que podem acumular uma série de adaptações para garantir a progressão da doença, como propriedades de proliferação sustentada, resistência a morte celular, instabilidade genômica, modulação inflamatória, indução de angiogênese, evasão ao sistema imunológico, invasão de tecidos adjacentes e metástase. Tais adaptações surgem como um conjunto de mutações e/ou alterações epigenéticas isoladas ou combinadas em oncogenes, genes supressores de tumor e/ou em genes reparadores do ácido desoxirribonucleico (DNA) [1-5].

Essa enfermidade é considerada uma das causas mais comuns de mortalidade no mundo. De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan, da *International Agency Research on Cancer* (IARC), no ano de 2020, houve 19,3 milhões de novos casos e aproximadamente 10 milhões de mortes por câncer em todo o globo. A mais recente estimativa, ano 2022, realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), aponta que ocorrerão no Brasil cerca de 704 mil novos casos de câncer em cada ano do triênio 2023-2025, configurando-o como um problema de saúde pública que abrange esferas epidemiológicas, sociais e econômicas [6, 7].

Nos últimos anos, avanços científicos e tecnológicos imprimiram novas perspectivas na terapêutica do câncer. Entretanto, uma série de limitações ainda permanecem vigentes, como (I) abordagens de tratamentos localizados e com alta eficiência apenas para cânceres em estágios iniciais de desenvolvimento – a exemplo da cirurgia e da radioterapia; e (II) abordagens terapêuticas sistêmicas – a exemplo da imunoterapia e da quimioterapia, sendo esta última a primeira a ser desenvolvida, possuindo maior uso clínico e acessibilidade econômica, a qual apresenta elevada toxicidade, efeitos colaterais indesejáveis, além de estar associada com a indução de resistência tumoral a múltiplas drogas. Por conseguinte, novos candidatos a agentes anticancerígenos têm sido investigados, a fim de superar os presentes obstáculos [8-11].

Dentro das possibilidades de novos compostos com potencial antitumoral, encontram-se os complexos metálicos, em especial aqueles estruturalmente relacionados a bases de Schiff, que têm ganhado destaque em pesquisas internacionais por expressarem efeito antiproliferativo tumoral tanto por induzir a morte de células cancerígenas como também por modular o processo angiogênico com a utilização de concentrações subtóxicas. Essas habilidades podem atuar de modo sinérgico e cooperativo, tornando as supramencionadas moléculas, promissoras para a prospecção de fármacos mais eficazes e seguros para o tratamento oncológico [12-22].

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a toxicidade e o potencial efeito anticancerígeno e antiangiogênico de quatro novos complexos metálicos de paládio estruturalmente relacionados a bases de Schiff.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental, de caráter analítico, com abordagem quantitativa, em que foram realizados testes de toxicidade para avaliação da segurança no uso de um grupo de moléculas inéditas, além de ensaios para a elucidação das suas respectivas propriedades biológicas, mediante a determinação dos seus efeitos anticancerígenos e antiangiogênicos.

2.2 Produtos químicos e reagentes

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido clorídrico (HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), penicilina, estreptomicina, azul de tripan, L-glutamina e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O soro bovino fetal (SBF) foi obtido na Cripion (Andradina, SP, Brasil). A solução fisiológica (0,9% NaCl) foi adquirida junto ao Laboratório Tayuyna (Nova Odesa, SP, Brasil).

2.3 Moléculas estudadas

Foi utilizada uma molécula de acetado de paládio, nomeada **pd1**, e uma coleção inédita com quatro complexos metálicos de paládio estruturalmente relacionados a bases de Schiff, denominados **pd2**, **pd3**, **pd4** e **pd5** (Figura S1). As amostras foram gentilmente cedidas por um grupo-colaborador de síntese química sediado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Para realização e efetivação dos ensaios idealizados, as moléculas foram dissolvidas em DMSO puro e estéril para o preparo das soluções estoques a uma concentração de 50 mM. Posteriormente, foram diluídas seriadamente em meios nutrientes e/ou em solução fisiológica para obtenção das concentrações finais utilizadas nos tratamentos propostos. Importa salientar que a concentração final de DMSO não excedeu o limite de 0,02% para o teste da membrana

corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM) e 0,5% para os demais métodos - concentrações sem atividade para os ensaios propostos.

2.4 Testes de toxicidade

2.4.1 Ensaio de hemólise

O potencial hemolítico foi avaliado de acordo com o método descrito por Dinesh e colaboradores [23] com algumas modificações. A priori, foram obtidas pequenas amostras de sangue periférico de colaboradores voluntários – declarados saudáveis e sem uso de medicamentos nas últimas 72 horas – sendo imediatamente estabilizadas em EDTA. Prontamente, o sangue total foi centrifugado (1.449 g, 5 min a 4°C) e, concomitantemente, foi realizada a lavagem dos eritrócitos, três vezes em solução fisiológica estéril. Após a finalização desta etapa, o último sedimento foi ressuspensão em 3 mL de solução fisiológica (Figura S2).

Em seguida, a suspensão dos eritrócitos (2%) foi adicionada à solução contendo o acetado de paládio (**pd1**) e os distintos complexos metálicos de paládio (**pd2-5**), em diferentes concentrações (25-200 µM). Logo após, todos os grupos foram incubados por 1 hora a 37°C. Perpassado o referido intervalo temporal, as células sanguíneas foram centrifugadas (1.449 g, 5 min a 4°C), o sobrenadante foi coletado por aspiração suave e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA, a 540 nm (Biotek, Winooski, VT, EUA). Para o branco, necessário à leitura inicial, utilizou-se uma solução de NaCl 0,9%. Um controle positivo (H₂O) e um controle negativo (NaCl 0,9%) foram empregados.

2.4.2 Bioensaio de *Artemia salina*

O teste de toxicidade aguda com *Artemia salina* seguiu o método descrito por Maia e colaboradores [24] com algumas adaptações. Inicialmente, os cistos foram obtidos em uma loja especializada de suprimentos para aquários (João Pessoa, PB, Brasil). Seguidamente, a cultura foi incubada em solução salina (0,04 g/mL de NaCl), sendo mantida sob temperatura ambiente por 24 horas para a eclosão. Após a finalização deste processo, 30 larvas foram transferidas para poços, em placas de 96 poços, com diferentes concentrações do acetado de paládio (**pd1**) e dos complexos metálicos de paládio (**pd2-5**) (25-200 µM).

Transcorrido 24 horas de incubação, decorreu-se para a contagem dos organismos vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentaram qualquer tipo de

movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa e ponderados mortos aqueles que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos. Um controle positivo (DMSO 4,0%) e um controle negativo (NaCl 0,9%) foram utilizados (Figura S3).

2.5 *In vitro* – Atividade antitumoral

2.5.1 Cultura de células

Foram utilizadas as linhagens de células tumorais aderentes MDA-MB-231 (câncer de mama humano isolada de tumor metastático triplo negativo) e U-373MG (linhagem celular de glioma humano), obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil) ou de colaboradores. Para o cultivo destas respectivas células, foi utilizada a estrutura, gentilmente cedida, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFPB.

As células foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂, a 37°C, e cultivadas em frascos de cultivo celular estéreis (25 cm²), contendo meio DMEM suplementado com 10% de SBF e acrescido de L-glutamina (300 mg/L) e dos antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). O meio de cultura foi trocado após o período de 48 horas.

O crescimento celular foi acompanhado em microscópio óptico invertido e, a manutenção da cultura e ensaios posteriores foram realizados em capela de fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações. A viabilidade celular foi estimada da seguinte forma: após a centrifugação das culturas celulares, o precipitado resultante foi ressuspensionado em aproximadamente 2 mL de meio de cultura completo. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 90 µL deste volume e adicionado 10 µL do reagente azul de tripan, o qual possui a capacidade de penetrar nas células cujas membranas encontram-se danificadas, corando de azul as células inviáveis [25]. Do volume final, 10 µL foi retirado e adicionado à câmara de Neubauer para contagem celular. Os experimentos só foram realizados quando as células em análise atingiram uma viabilidade maior ou igual a 90% (Figura S4).

2.5.2 Ensaio de redução do MTT

A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com o método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), descrito por Mosmann [26] e adaptado por Souza-Ferrari e colaboradores [27].

Primariamente, as linhagens MDA-MB-231 e U-373MG foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, em densidades específicas de 1×10^5 células/mL e 3×10^4 células/mL, respectivamente. Perpassado um período “*overnight*”, as células foram expostas a diferentes concentrações dos complexos metálicos de paládio (**pd2-5**) (25-200 μ M), as quais foram dissolvidas no meio, e incubadas por um período de 24 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. Um controle positivo (DMSO 5,0%) e um controle negativo (meio de cultura) foram utilizados.

Respeitado o referido tempo de incubação, as placas foram centrifugadas (500 g, 5 min), o sobrenadante foi parcialmente removido, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado o MTT (5 mg/mL em PBS) (m/v). Transcorrido um período de 3 horas, adicionou-se uma solução de 10% de SDS e 0,01% de HCl para solubilização dos cristais de formazan e, seguidamente, as placas foram lidas em um espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA, a 570 nm (Biotek, Winooski, VT, EUA) (Figura S5).

2.6 *Ex vivo* – Atividade antiangiogênica

2.6.1 Teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM)

Os ensaios para avaliação da atividade antiangiogênica pelo método HET-CAM foram realizados de acordo com o método descrito por Ambika e colaboradores [13] com algumas adaptações. Preliminarmente, ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram adquiridos, higienizados (álcool 70%) e acondicionados em uma incubadora automática sob temperatura controlada de 37°C e com umidade relativa do ar de aproximadamente 33%.

No 3° dia do desenvolvimento embrionário, foi realizada uma abertura circular na região da câmara de ar da casca dos ovos com auxílio de uma pinça anatômica e tesoura sem ponta. Em seguida, foi retirada a membrana interna da casca e aspirado 5 mL de albumina para melhor visualização da membrana corioalantóica (MCA). Subsequentemente, as aberturas foram vedadas com material apropriado para manutenção da umidade, sem perda da visibilidade do embrião, e os ovos foram novamente inseridos na incubadora. No 4° dia de desenvolvimento embrionário, discos de papel filtro estéril (6 mm de diâmetro) adsorvidos com 10 μ L de solução dos complexos metálicos de paládio (**pd2-5**) (10 μ M) foram implantados no terço externo da MCA. Para as experiências de controle positivo e negativo foram utilizados discos embebidos com 10 μ L de dexametasona (4 mg/mL) e solução salina (0,9% NaCl), respectivamente.

Em um período de 0h, 6h e 24h de incubação, foram registradas imagens com o auxílio de um aparato fotográfico acoplado a um estereomicroscópio sob lente objetiva de 10x (Leica

ES2). As fotografias obtidas foram analisadas com o auxílio do *software ImageJ*, versão 1.53, o que permitiu realizar a quantificação dos seguintes parâmetros angiogênicos, como diâmetro, comprimento e ramificações dos vasos sanguíneos (Figura S6).

2.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de 3 ou 4 experimentos independentes, efetuados em duplicata ou triplicata. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou t-Student independente, por intermédio do programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 7.0. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para determinação da CL_{50} (concentração média capaz de induzir a morte de 50% dos organismos-teste) e da CI_{50} (concentração inibitória média capaz de causar 50% do efeito máximo), foi realizada a regressão não-linear.

2.8 Aspectos éticos

A utilização de culturas *in vitro* de células, o bioensaio com *Artemia salina* e o teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* (HET-CAM) representam ensaios alternativos ao uso de animais, e não requerem aprovação por Comissão de Ética no Uso de Animais, conforme dispõe a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e normas internacionais [28, 29].

É imperativo pontuar, porém, que de acordo com Resolução nº 466/12 e a Resolução nº 510/16, “toda pesquisa envolvendo seres humanos deve ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa”. Nesse sentido, para realização do método hemolítico com eritrócitos humanos, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), sob número 085608/2021 em concordância com os regimentos éticos e legais vigentes (Anexo A).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da toxicidade

A concentração de um fármaco na circulação sistêmica, e possivelmente no local do tumor, é significativamente influenciada pela via de administração. Na prática clínica atual, a maioria dos fármacos anticancerígenos são administrados pela via endovenosa pelo fato de garantir uma biodisponibilidade imediata e completa. Entretanto, embora apresente benefícios que garantem uma dosagem precisa, tal via também apresenta uma série de limitações, pois devido à sua rápida absorção na corrente sanguínea, células deste tecido histológico podem ser comprometidas, a exemplo dos eritrócitos [30, 31, 32].

Por essa razão, a avaliação do efeito de novos compostos bioativos com potencial anticâncer na viabilidade destas células sanguíneas pode sugerir um perfil de segurança e de hemocompatibilidade, tornando-se útil para a formulação de fármacos antineoplásicos com a menor probabilidade de apresentarem efeitos adversos nos pacientes, como a hemólise – termo usado para indicar a lise da membrana eritrocitária com liberação da hemoglobina no plasma – a qual resulta em quadros de anemia hemolítica, sendo uma das principais complicações clínicas atribuíveis aos agentes quimioterápicos convencionais [31].

Na Tabela 1, pode-se observar que o precursor **pd1** induziu um elevado percentual de hemólise de $103,1 \pm 10,2\%$, equivalente ao controle positivo ($p > 0,05$). No entanto, os complexos **pd2-5** (200 μM), demonstraram baixa capacidade de induzir danos na membrana eritrocitária, com percentuais de hemólise equivalentes a um percentual residual de $2,7 \pm 0,4\%$ demonstrado pelo controle negativo ($p > 0,05$).

A cisplatina, complexo metálico de amplo uso clínico para o tratamento do câncer, também apresentou um efeito mínimo na indução de hemólise [33, 34]. Tal situação pode estar relacionada ao fato de as hemácias serem células anucleadas, e os mecanismos citotóxicos dos complexos metálicos estarem muitas vezes associados com danos ao DNA, os quais interferem na transcrição e replicação [16, 35, 36].

Por isso, também foi usado o modelo de *Artemia salina* para investigação da toxicidade aguda dos complexos metálicos de paládio, expressos como estimativa da CL_{50} . Foi possível constatar, após 24 horas de incubação, que nenhum dos complexos metálicos **pd2-5** investigados apresentaram efeito tóxico nas concentrações estudadas ($\leq 200 \mu\text{M}$). Porém, o precursor estrutural **pd1** demonstrou toxicidade, com CL_{50} de $58,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (Tabela 1).

Assim, pode-se sugerir que a associação de **pd1** aos ligantes simétricos derivados do ácido de Meldrum e estruturalmente relacionados a bases de Schiff resulta em uma série de complexos metálicos seguros para aplicação e investigação de propriedades farmacológicas.

Tabela 1. Análise da toxicidade dos distintos complexos metálicos de paládio (**pd1-5**) (≤ 200 μM) em eritrócitos humanos e em larvas de *Artemia salina*.

	FÓRMULA QUÍMICA	TOXICIDADE	
		Hemólise	<i>Artemia salina</i>
CP	H ₂ O	99,9 ± 12,9	NA
CN	NaCl	2,7 ± 0,4 ^a	-
pd1	C ₄ H ₆ O ₄ Pd	103,1 ± 10,2	58,1 ± 1,1
pd2	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₈ Pd	2,0 ± 0,4 ^a	>200
pd3	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₈ Pd	1,9 ± 0,6 ^a	>200
pd4	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈ Pd	2,4 ± 0,5 ^a	>200
pd5	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₈ Pd	2,3 ± 0,5 ^a	>200
DMSO	C ₂ H ₆ OS	3,8 ± 0,2	2,4 ± 1,8

(I) Atividade hemolítica - os dados são expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão de três experimentos efetuados em duplicata, analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ^a $p < 0,05$ em comparação com o CP. (II) Toxicidade aguda - os dados são expressos como média da CL₅₀ (μM) \pm desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata e a análise foi realizada por regressão não-linear

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

Legenda: CP (controle positivo), CN (controle negativo) e NA (não se aplica).

3.2 Efeitos biológicos

O efeito citotóxico e/ou antiproliferativo dos complexos metálicos foi avaliado por meio do ensaio de redução do MTT, em uma linhagem celular humana de câncer de mama isolada de tumor metastático triplo negativo (MDA-MB-231) e em uma linhagem tumoral humana de células da glia – glioma (U-373 MG).

O precursor **pd1** não foi investigado, em virtude da elevada toxicidade demonstrada em modelos não cancerígenos. Contudo, foi possível constatar que os complexos **pd2-5** demonstraram efeito anticâncer, com maior efeito observado para o complexo **pd2** que apresentou CI₅₀ de $43,2 \pm 1,5$ μM , para a linhagem celular U-373MG, e para o complexo **pd5**, que apresentou citotoxicidade para os dois tipos de câncer, com CI₅₀ de $162,5 \pm 1,2$ e $56,6 \pm 1,1$ μM , respectivamente, para MDA-MB-231 e U-373MG (Tabela 2).

Sob o prisma da relação estrutura-atividade dos compostos, repara-se que os complexos **pd2** e **pd5** expressam semelhanças estruturais relacionadas ao grupo metil, fato que lhes

conferem uma alta lipofilicidade, o que favorece a passagem das moléculas pela membrana plasmática das células, sendo um dos possíveis fatores envolvidos com seus efeitos citotóxicos.

Tabela 2. Efeito citotóxico dos distintos complexos metálicos (**pd2-5**) e da substância controle (DMSO) sobre a viabilidade da linhagem MDA-MB-231 e U-373MG, após um período de 24 horas de tratamento, avaliado pelo método de redução do MTT.

TRATAMENTO	LINHAGENS TUMORAIS	
	MDA-MB-231	U-373MG
pd2	>200	43,2 ± 1,5
pd3	>200	180,5 ± 1,8
pd4	>200	182,2 ± 1,2
pd5	162,5 ± 1,2	56,6 ± 1,1
DMSO	>5	4,7 ± 3,5

Os dados são expressos como média dos valores da CI_{50} (μM) \pm desvio padrão de três experimentos efetuados em triplicata e a análise foi realizada por regressão não-linear.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

É oportuno destacar que as supracitadas linhagens tumorais são resistentes à cisplatina, que demonstrou $CI_{50} > 250$ e $\sim 150 \mu\text{M}$, respectivamente, para MDA-MB-231 [37] e U-373MG [38]. A resistência à cisplatina por parte das células cancerígenas pode estar relacionada aos seguintes mecanismos moleculares: (I) diminuição da captação e absorção da droga pela célula - por exemplo, pela redução da expressão dos canais transportadores de cobre 1 (CTR1), (II) aumento do efluxo da droga para fora da célula - por exemplo, pela indução da superexpressão das proteínas ATP7A (*ATPase copper transporting alpha*), ATP7B (*ATPase copper transporting beta*) e MRP2 (*Multidrug resistance-associated protein 2*), (III) aumento do processo de detoxificação - por exemplo, pelo aumento das concentrações da glutathiona (GSH), metalotioneínas (MTs) e/ou de outras proteínas ricas em cisteína, e (IV) aumento da capacidade de reparo do DNA danificado - por exemplo, pela maior expressão de genes da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), via de reparo por recombinação homóloga (HR) e via de reparo de incompatibilidade (MMR) [39-42].

Face ao exposto, percebe-se a urgência no desenvolvimento de novas moléculas que apresentem atividade antitumoral e que possam ser utilizadas como agentes antineoplásicos, sobretudo em células tumorais que apresentem resistência celular aos tratamentos disponíveis. Verifica-se que o complexo **pd5** apresentou efeito citotóxico e/ou antiproliferativo para as duas referidas linhagens analisadas, sendo tais resultados verificados em concentrações subtóxicas, indicando um perfil de segurança específico para possíveis utilizações por ter demonstrado hemocompatibilidade e ausência de toxicidade aguda.

Para além do clássico efeito citotóxico relatado como mecanismo de ação anticâncer das metalodrogas, estudos recentes têm demonstrado a capacidade dos complexos metálicos – em especial aqueles estruturalmente relacionados a bases de Schiff – de interferirem no processo de formação de novos vasos sanguíneos [43-46].

A angiogênese – um clássico marcador tumoral – tornou-se um alvo terapêutico promissor para inibir e/ou controlar a progressão, invasão e metástase tumoral. Isso porque os tumores necessitam do rápido desenvolvimento de uma rede vascular para fornecer suporte à alta taxa proliferativa das células malignas, para manter o suprimento adequado de nutrientes e oxigênio ao microambiente tumoral e para garantir a remoção dos produtos metabólicos dos tumores em expansão. Diante disso, a supressão dos vasos sanguíneos tumorais representa um dos mais importantes métodos para a terapia do câncer [47-53].

Desde o estabelecimento da angiogênese tumoral como um alvo terapêutico, novos e eficazes agentes antiangiogênicos foram desenvolvidos. Hodiernamente, as principais classes farmacológicas dos compostos antiangiogênicos em uso clínico estão direcionadas à via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), as quais incluem: (I) os anticorpos monoclonais dirigidos ao VEGF (por exemplo, bevacizumab), (II) os inibidores da tirosina quinase (TKIs) (por exemplo, sunitinib), (III) receptor chamariz ou armadilha de VEGF (por exemplo, aflibercept), e (IV) os inibidores do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2) (por exemplo, ramucirumab) [54-57].

Embora diversas pesquisas e avanços científicos tenham acontecido nos últimos anos, as supracitadas categorias farmacológicas ainda dispõem de certas limitações, principalmente associadas aos seus elevados custos financeiros - sendo inacessíveis para uma grande parcela populacional, resistência tumoral e elevada toxicidade, particularmente toxicidade vascular - corroborando para casos de hipertensão e tromboembolismo, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Esses efeitos secundários comprometem a saúde dos pacientes e requerem a redução da dosagem dos medicamentos, até mesmo suspendendo a administração, comprometendo o efeito terapêutico [58-64].

À vista disso, evidencia-se a importância e a necessidade de estudos farmacológicos e toxicológicos de novas substâncias, na perspectiva de encontrar moléculas bioativas que atuem com maior seletividade em alvos moleculares da angiogênese tumoral e que propiciem, simultaneamente, baixa toxicidade sistêmica, menos custos financeiros e mais qualidade de vida aos indivíduos durante o tratamento oncológico.

Assim, investigou-se o efeito antiangiogênico dos complexos **pd2-5**, em concentrações subtóxicas, através do método HET-CAM, o qual permite a análise de parâmetros vasculares, como diâmetro, comprimento e ramificação de vasos sanguíneos (Figura S9-17).

Na Tabela 3, pode-se observar que todos os quatro distintos complexos estudados, quando comparados aos parâmetros registrados em tempo inicial (0 horas) – normalizados para 100%, promoveram redução do diâmetro, do comprimento e do número de ramificação de vasos sanguíneos ($p < 0,05$), a partir do menor tempo de incubação (6 horas).

Tabela 3. Análise dos distintos parâmetros vasculares, obtidos pelo ensaio do HET-CAM, após exposição da membrana corioalantóide com os diferentes complexos metálicos (**pd2-5**), com a substância controle (solução salina) e com a dexametasona, por 6 e 24 horas.

TRATAMENTO	TEMPO	DIÂMETRO	COMPRIMENTO	RAMIFICAÇÕES	pValor
CONTROLE	6h	121,60 ± 2,6	119,20 ± 2,7	115,10 ± 2,5	$p < 0,05$
	24h	139,80 ± 4,4	143,70 ± 4,7	145,60 ± 4,5	
pd2	6h	71,31 ± 2,0	86,17 ± 1,7	78,16 ± 2,1	$p < 0,05$
	24h	53,95 ± 2,6	81,17 ± 2,6	69,92 ± 2,0	
pd3	6h	74,77 ± 2,0	89,21 ± 2,2	78,31 ± 2,5	$p < 0,05$
	24h	55,18 ± 2,7	86,05 ± 3,3	71,99 ± 2,7	
pd4	6h	68,83 ± 2,2	83,69 ± 2,2	71,06 ± 2,6	$p < 0,05$
	24h	42,24 ± 4,1	66,40 ± 6,1	62,32 ± 4,1	
pd5	6h	67,89 ± 2,3	87,18 ± 1,3	70,56 ± 2,1	$p < 0,05$
	24h	51,90 ± 4,4	77,72 ± 2,3	61,45 ± 4,2	
DEXAMETASONA	6h	54,46 ± 8,2	89,90 ± 2,2	73,32 ± 8,1	$p < 0,05$
	24h	33,64 ± 5,8	78,10 ± 1,6	58,32 ± 5,3	

Os dados são expressos em porcentagem como as médias ± desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student.

pValor - quando comparado ao tempo de 0 horas de incubação, normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

Os compostos com efeito antiangiogênico podem ser direcionados ao tratamento do câncer por favorecer: (I) a citorredução do tumor primário, contribuindo para melhorar as margens cirúrgicas dos tecidos e/ou órgãos sobressalentes; (II) a conversão de uma lesão não ressecável em uma que é potencialmente ressecável, garantindo a operabilidade e reduzindo a mortalidade operatória; e (III) a prevenção de lesões metastáticas ocultas não detectáveis no momento da cirurgia [65-69].

Finalmente, deve-se ressaltar que em virtude do potencial antiangiogênico demonstrado pelos complexos **pd2-5**, pode-se ainda tê-los com uma alternativa para estudos direcionados a um conjunto de doenças denominadas “*angiogenesis-dependent diseases*”, incluindo a artrite

reumatoide, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética, aterosclerose, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, endometriose, dentre outras [70-72].

4 CONCLUSÃO

À guisa de conclusão, este estudo demonstrou que todos os complexos metálicos de paládio investigados apresentaram atividade citotóxica em células cancerígenas resistentes à cisplatina, bem como, foram capazes de comprometer a formação de novos vasos sanguíneos, sendo tais efeitos observados em concentrações subtóxicas, não demonstrando toxicidade em modelos saudáveis, superando, portanto, uma das principais limitações existentes na atualidade frente aos fármacos antineoplásicos que é a ausência de seletividade e elevada toxicidade em células saudáveis.

Sendo assim, as moléculas estudadas tornam-se promissoras para a prospecção de novos fármacos para o fortalecimento de uma linha alternativa para o tratamento do câncer, principalmente pelo fato de atuarem em duas vias distintas para o controle de tumores cancerígenos, tendo em vista que induziram a morte de células tumorais ao passo que inibiram o processo angiogênico. Essas habilidades podem certamente reduzir a chance da resistência cancerígena e a necessidade da utilização de múltiplas drogas, aumentando as perspectivas de êxito terapêutico, sobrevida e qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento oncológico.

Destaca-se, por fim, que os resultados apresentados neste trabalho integram um relatório de pedido de depósito de patentes já efetuado pela UFCG junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), registrado sob número BR1020220235856.

REFERÊNCIAS

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [2] S.H. Hassanpour, M. Dehghani, Review of cancer from perspective of molecular, *J. Cancer Res. Pract.* 4 (2017) 127-129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.
- [3] J.W. Park, J.W. Han, Targeting epigenetics for cancer therapy, *Arch. Pharm. Res.* 42 (2019) 159-170. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01126-z>.
- [4] E.N. Kontomanolis, A. Koutras, A. Syllaios, D. Schizas, A. Mastoraki, N. Garmpis, M. Diakosavvas, K. Angelou, G. Tsatsaris, A. Pagkalos, T. Ntounis, Z. Fasoulakis, Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review, *Anticancer Res.* 40 (2020) 6009-6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>.
- [5] D. Hanahan, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer Discov.* 12 (2022) 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.
- [6] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [7] Brasil, Ministério da Saúde, Estimativa 2023 – Incidência de Câncer no Brasil. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>, 2022 (accessed 18 december 2022).
- [8] B. Bahrami, M. Hojjat-Farsangi, H. Mohammadi, E. Anvari, G. Ghalamfarsa, M. Yousefi, F. Jadidi-Niaragh, Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy, *Immunol. Lett.* 190 (2017) 64-83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>.
- [9] K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek, Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>.
- [10] T.A. Greenhalgh, R.P. Symonds, Principles of chemotherapy and radiotherapy, *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 24 (2014) 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2014.06.004>.
- [11] K. Nurgali, R. T. Jagoe, R. Abalo, Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?, *Front. Pharmacol.* 22 (2018) 245. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00245>.
- [12] S. Ambika, Y. Manojkumar, S. Arunachalam, B. Gowdhami, K.K.M. Sundaram, R.V. Solomon, P. Venuvanalingam, M.A. Akbarsha, M. Sundararaman, Biomolecular Interaction, Anti-Cancer and Anti-Angiogenic Properties of Cobalt(III) Schiff Base Complexes, *Sci. Rep.* 9 (2019) 2721. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39179-1>.

- [13] F. Schmitt, J. Kasparikova, V. Brabec, G. Begemann, R. Schobert, B. Biersack, New (arene)ruthenium(II) complexes of 4-aryl-4H-naphthopyrans with anticancer and anti-vascular activities, *J. Inorg. Biochem.* 184 (2018) 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.013>.
- [14] C.M. Clavel, E. Păunescu, P. Nowak-Sliwinska, A.W. Griffioen, R. Scopelliti, P.J. Dyson, Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium(II)-Arene Complexes, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 3356-3365. <https://doi.org/10.1021/jm501655t>.
- [15] B.L. Fei, S. Tu, Z. Wei, P. Wang, C. Qiao, Z.F. Chen, Optically pure chiral copper(II) complexes of rosin derivative as attractive anticancer agents with potential anti-metastatic and anti-angiogenic activities, *Eur. J. Med. Chem.* 176 (2019) 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.030>.
- [16] Y. Manojkumar, S. Ambika, R. Arulkumar, B. Gowdhami, P. Balaji, G. Vignesh, S. Arunachalam, P. Venuvanalingam, R. Thirumuruganb, M. A. Akbarsha, Synthesis, DNA and BSA binding, *in vitro* anti-proliferative and *in vivo* anti-angiogenic properties of some cobalt(III) Schiff base complexes, *New J. Chem.* 43 (2019) 11391-11407. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01269A>.
- [17] D.M. Heuberger, S. Harankhedkar, T. Morgan, P. Wolint, M. Calcagni, B. Lai, C.J. Fahrni, J. Buschmann, High-affinity Cu(I) chelator PSP-2 as potential anti-angiogenic agent, *Sci. Rep.* 9 (2019) 14055. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50494-5>.
- [18] V.S. Bollu, T. Bathini, A.K. Barui, A. Roy, N.C. Ragi, S. Maloth, P. Sripadi, B. Sreedhar, P. Nagababu, C.R. Patra, Design of DNA-intercalators based copper(II) complexes, investigation of their potential anti-cancer activity and sub-chronic toxicity, *Mater. Sci. Eng. C.* 105 (2019) 110079. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110079>.
- [19] J. Delasoie, A. Pavic, N. Voutier, S. Vojnovic, A. Crochet, J. Nikodinovic-Runic, F. Zobi, Identification of novel potent and non-toxic anticancer, anti-angiogenic and antimetastatic rhenium complexes against colorectal carcinoma, *Eur. J. Med. Chem.* 2014 (2020) 112583. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112583>.
- [20] P.L. Zhang, X.X. Hou, M.R. Liu, F.P. Huang, X.Y. Qin, Two novel chiral tetranucleate copper-based complexes: crystal structures, nanoparticles, and inhibiting angiogenesis and the growth of human breast cancer by regulating the VEGF/VEGFR2 signal pathway *in vitro*, *Dalton Trans.* 49 (2020) 6043-6055. <https://doi.org/10.1039/d0dt00380h>.
- [21] S. Das, A. Roy, A.K. Barui, M.M.A. Alabbasi, M. Kuncha, R. Sistla, B. Sreedharbc, C.R. Patra, Anti-angiogenic vanadium pentoxide nanoparticles for the treatment of melanoma and their *in vivo* toxicity study, *Nanoscale* 12 (2020) 7604-7621. <https://doi.org/10.1039/D0NR00631A>.
- [22] K. Choroba, B. Machura, A. Szlapa-Kula, J.G. Malecki, L. Raposo, C. Roma-Rodrigues, S. Cordeiro, P.V. Baptista, A.R. Fernandes, Square planar Au(III), Pt(II) and Cu(II) complexes with quinoline-substituted 2,2':6',2"-terpyridine ligands: From *in vitro* to *in vivo* biological properties, *Eur. J. Med. Chem.* 218 (2021) 113404. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113404>.

- [23] M. Dinesh, S. Deepika, R. HarishKumar, C. I. Selvaraj, S. M. Roopan, Evaluation of Octyl- β -D-Glucopyranoside (OGP) for Cytotoxic, Hemolytic, Thrombolytic, and Antibacterial Activity, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185 (2018) 450-463.
<https://doi.org/10.1007/s12010-017-2661-7>.
- [24] D.O. Maia, V.F. Santos, C.R.S. Barbosa, Y.N. Fróes, D.F. Muniz, A.L.E. Santos, M.H.C. Santos, R.R.S. Silva, C.G.L. Silva, R.O.S. Souza, J.C.S. Sousa, H.D.M. Coutinho, C. S. Teixeira, Nickel (II) chloride schiff base complex: Synthesis, characterization, toxicity, antibacterial and leishmanicidal activity, *Chem. Biol. Interact.* 351 (2022) 109714.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109714>.
- [25] W. Strober, Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, *Curr. Protoc. Immunol.* 111 (2019) A3. B.1-A3. B.3. <https://doi.org/10.1002/2F0471142735.ima03bs111>.
- [26] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [27] J. Souza-Ferrari, E.A. Silva-Júnior, J.A. Vale, L.A.A. Simões, M.O. Moraes-Júnior, B.B. Dantas, D.A.M. Araújo, A late-stage diversification via Heck-Matsuda arylation: Straightforward synthesis and cytotoxic/antiproliferative profiling of novel aryl-labdane-type derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 52 (2021) 128393.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128393>.
- [28] S.K. Doke, S.C. Dhawale, Alternatives to animal testing: A review, *Saudi Pharm. J.* 23 (2015) 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.
- [29] D. Ribatti, The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model, *Mech. Dev.* 141 (2016) 70-77.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.003>.
- [30] S. Mazzaferro, K. Bouchemal, G. Ponchel, Oral delivery of anticancer drugs I: general considerations, *Drug Discov. Today* 18 (2013) 25-34.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.08.004>.
- [31] G. Jeswani, A. Alexander, S. Saraf, S. Saraf, A. Qureshi, Ajazuddin, Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents, *J. Control. Release* 211 (2015) 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.001>.
- [32] P. Tran, Y.C. Pyo, D.H. Kim, S.E. Lee, J.K. Kim, J.S. Park, Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs, *Pharmaceutics* 11 (2019) 132. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030132>.
- [33] Y. Gou, X. Jia, L.X Hou, J.G. Deng, G.J. Huang, H.W. Jiang, F. Yang, Dithiocarbamate-FeIII, -CoIII, -NiII, and -ZnII Complexes: Design, Synthesis, Structure, and Anticancer Evaluation, *J. Med. Chem.* 65 (2022) 6677-6689.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02186>.

- [34] S. Dasari, P.B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [35] T. Makovec, Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy, *Radiol. Oncol.* 53 (2019) 148-158. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>.
- [36] P.S. Bangde, D.S. Prajapati, P.P. Dandekar, A.R. Kapdi, New Water-Soluble N-Heterocyclic Carbene-Palladium Complexes as Promising Anti-Tumor Agents: Investigating DNA and Protein Interactions, *ChemistrySelect* 3 (2018) 5709-5716. <https://doi.org/10.1002/slct.201800535>.
- [37] M.G. Paunović, M.M. Matic, A.D. Obradović, V.V. Jevtić, D.L. Stojković, B.I. Ognjanović, Antiproliferative, antimigratory, and prooxidative potential of novel platinum(IV) complexes and resveratrol on breast cancer (MDA-MB-231) and choriocarcinoma (JEG-3) cell lines, *Drug Dev. Res.* 83 (2022) 688-698. <https://doi.org/10.1002/ddr.21900>.
- [38] M. Diz, M.L. Durán-Carril, J. Castro, S. Alvo, L. Bada, D. Viña, J.A. García-Vázquez, Antitumor activity of copper(II) complexes with Schiff bases derived from N'-tosylbenzene-1,2-diamine, *J. Inorg. Biochem.* 236 (2022) 111975. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111975>.
- [39] L. Amable, Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine, *Pharmacol. Res.* 106 (2016) 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>.
- [40] P.B. Tchounwou, S. Dasari, F.K. Noubissi, P. Ray, S. Kumar, Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy, *J. Exp. Pharmacol.* 13 (2021) 303-328. <https://doi.org/10.2147/jep.s267383>.
- [41] S.H. Chen, J.Y. Chang, New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4136. <https://doi.org/10.3390/ijms20174136>.
- [42] S.A. Aldossary, Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomed. Pharmacol. J.* 12 (2019) 7-15. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1608>.
- [43] L. Fouani, S.V. Menezes, M. Paulson, D.R. Richardson, Z. Kovacevic, Metals and metastasis: Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-metastatic agents, *Pharmacol. Res.* 115 (2017) 275-287. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.001>.
- [44] J.X. Liang, H.J. Zhong, G. Yang, K. Vellaisamy, D.L. Ma, C.H. Leung, Recent development of transition metal complexes with *in vivo* antitumor activity, *J. Inorg. Biochem.* 177 (2017) 276-286. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.002>.
- [45] N.K. Chaudhary, B. Guragain, S.K. Chaudhary, P. Mishra, Schiff base metal complexes as a potential therapeutic drug in medical science: A critical review, *Bibechana* 18 (2021) 214-230. <https://doi.org/10.3126/bibechana.v18i1.29841>.

- [46] Y. Sun, Y. Lu, M. Bian, Z. Yang, X. Ma, W. Liu, Pt(II) and Au(III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment, *Eur. J. Med. Chem.* 211 (2021) 113098. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113098>.
- [47] C. Viillard, B. Larrivé, Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets, *Angiogenesis* 20 (2017) 409-426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>.
- [48] K.C. Aalders, K. Tryfonidis, E. Senkus, F. Cardoso, Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives, *Cancer Treat. Rev.* 53 (2017) 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.12.009>.
- [49] A.M.E. Abdalla, L. Xiao, M.W. Ullah, M. Yu, C. Ouyang, G. Yang, Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics, *Theranostics* 8 (2018) 533-548. <https://doi.org/10.7150/thno.21674>.
- [50] S. Munir, A.A. Shah, M. Shahid, M.S. Ahmed, A. Shahid, M.S.R. Rajoka, M.S.H. Akash, M. Akram, M. Khurshid, Anti-angiogenesis Potential of Phytochemicals for the Therapeutic Management of Tumors, *Curr. Pharm. Des.* 26 (2020) 265-278. <https://doi.org/10.2174/1381612826666191230142638>.
- [51] R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg, Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities, *Cell. Mol. Life Sci.* 77 (2020) 1745-1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.
- [52] F.H. Al-Ostoot, S. Salah, H.A. Khamees, S.A. Khanum, Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities, *Cancer Treat. Res. Commun.* 28 (2021) 100422. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100422>.
- [53] J. Folkman, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N. Engl. J. Med.* 285 (1971) 1182-1186. <https://doi.org/10.1056/nejm197111182852108>.
- [54] A.S. Oguntade, F. Al-Amodi, A. Alrumayh, M. Alobaida, M. Bwalya, Anti-angiogenesis in cancer therapeutics: the magic bullet, *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* 33 (2021) 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43046-021-00072-6>.
- [55] V. Tarallo, S. Falco, The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 64 (2015) 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.008>.
- [56] J. Jászai, M.H.H. Schmidt, Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies, *Cells* 8 (2019) 1102. <https://doi.org/10.3390/cells8091102>.
- [57] R.I. Teleanu, C. Chircov, A.M. Grumezescu, D.M. Teleanu, Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment, *J. Clin. Med.* 9 (2019) 84. <https://doi.org/10.3390/jcm9010084>.
- [58] S. Riondino, G.D. Monte, F. Fratangeli, F. Guadagni, M. Roselli, P. Ferroni, Anti-Angiogenic Drugs, Vascular Toxicity and Thromboembolism in Solid Cancer, *Cardiovasc.*

Hematol. Agents Med. Chem. 15 (2017) 3-16.
<https://doi.org/10.2174/1871525715666170127101605>.

[59] K.B. Neves, A.C. Montezano, N.N. Lang, R.M. Touyz, Vascular toxicity associated with anti-angiogenic drugs, *Clin. Sci. (Lond)*. 134 (2020) 2503-2520.
<https://doi.org/10.1042/cs20200308>.

[60] G. Bergers, D. Hanahan, Modes of resistance to anti-angiogenic therapy, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 592-603. <https://doi.org/10.1038/nrc2442>.

[61] A. Pavic, B.Đ. Glišić, S. Vojnovic, B. Warzajtis, N.D. Savić, M. Antić, S. Radenković, G.V. Janjić, J. Nikodinovic-Runic, U. Rychlewska, M.I. Djuran, Mononuclear gold(III) complexes with phenanthroline ligands as efficient inhibitors of angiogenesis: A comparative study with auranofin and sunitinib, *J. Inorg. Biochem.* 174 (2017) 156-168.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.009>.

[62] M.V. Wynsberghe, J. Flejeo, H. Sakhi, M. Ollero, D. Sahali, H. Izzedine, C. Henique, Nephrotoxicity of Anti-Angiogenic Therapies, *Diagnostics (Basel)*. 11 (2021) 640.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11040640>.

[63] K.S. Grechukhina, N.V. Chebotareva, T.N. Krasnova, Nephrotoxicity of anti-angiogenesis drugs, *Ter. Arkh.* 92 (2020) 93-98.
<https://doi.org/10.26442/00403660.2020.06.000672>.

[64] S. Shantakumar, B.L. Nordstrom, L. Djousse, S.A. Hall, D.R. Gagnon, K.H. Fraeman, M. Herk-Sukel, K. Chagin, J. Nelson, Occurrence of hepatotoxicity with pazopanib and other anti-VEGF treatments for renal cell carcinoma: an observational study utilizing a distributed database network, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78 (2016) 559-566.
<https://doi.org/10.1007/s00280-016-3112-9>.

[65] J.M.L. Ebos, M. Mastri, C.R. Lee, A. Tracz, J.M. Hudson, K. Attwood, W.R. Cruz-Munoz, C. Jedszko, P. Burns, R.S. Kerbel, Neoadjuvant antiangiogenic therapy reveals contrasts in primary and metastatic tumor efficacy, *EMBO Mol. Med.* 6 (2014) 1561-1576.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201403989>.

[66] P. García-Alfonso, A. Ferrer, S. Gil, R. Dueñas, M.T. Pérez, R. Molina, J. Capdevila, M.J. Safont, C. Castañón, J.M. Cano, R. Lara, Neoadjuvant and conversion treatment of patients with colorectal liver metastasis: the potential role of bevacizumab and other antiangiogenic agents, *Target. Oncol.* 10 (2015) 453-465. <https://doi.org/10.1007/s11523-015-0362-0>.

[67] P. Junker, J. Puppe, F. Thangarajah, C. Domröse, A. Cepic, B. Morgenstern, D. Ratiu, M. Hellmich, P. Mallmann, M. Wirtz, Neoadjuvant Therapy of Cervical Carcinoma with the Angiogenesis Inhibitor Bevacizumab: a Single-Centre Analysis, *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 78 (2018) 768-774. <https://doi.org/10.1055/a-0641-5588>.

[68] A. Palazzo, S. Dellapasqua, E. Munzone, V. Bagnardi, M. Mazza, G. Canello, R. Ghisini, M. Iorfida, E. Montagna, A. Goldhirsch, M. Colleoni, Phase II Trial of Bevacizumab Plus Weekly Paclitaxel, Carboplatin, and Metronomic Cyclophosphamide With or Without

Trastuzumab and Endocrine Therapy as Preoperative Treatment of Inflammatory Breast Cancer, *Clin. Breast. Cancer* 18 (2018) 328-335. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.01.010>.

[69] C.G. Wood, J.E. Ferguson 3rd, J.S. Parker, D.T. Moore, J.G. Whisenant, S.J. Maygarden, E.M. Wallen, W.Y. Kim, M.I. Milowsky, K.E. Beckermann, N.B. Davis, S.M. Haake, J.A. Karam, D.S. Bortone, B.G. Vincent, T. Powles, W.K. Rathmell, Neoadjuvant pazopanib and molecular analysis of tissue response in renal cell carcinoma, *JCI Insight* 5 (2020) e132852. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132852>.

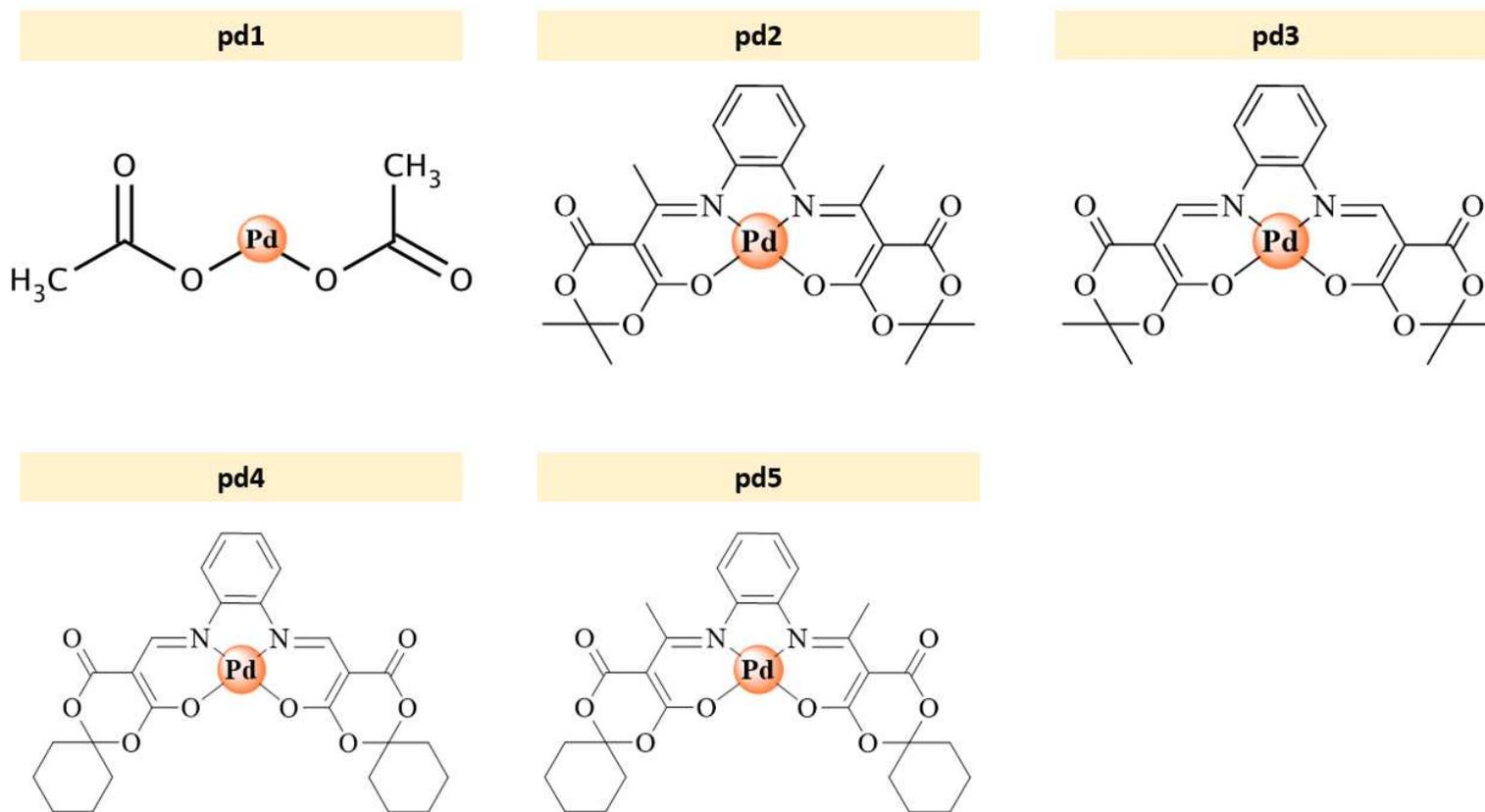
[70] P. Carmeliet, Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases, *Nat. Rev. Genet.* 4 (2003) 710-720. <https://doi.org/10.1038/nrg1158>.

[71] J. Folkman, Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6 (2007) 273-286. <https://doi.org/10.1038/nrd2115>.

[72] A. Fallah, A. Sadeghinia, H. Kahroba, A. Samadi, H.R. Heidari, B. Bradaran, S. Zeinali, O. Molavi, Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases, *Biomed. Pharmacother.* 110 (2019) 775-785. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022>.

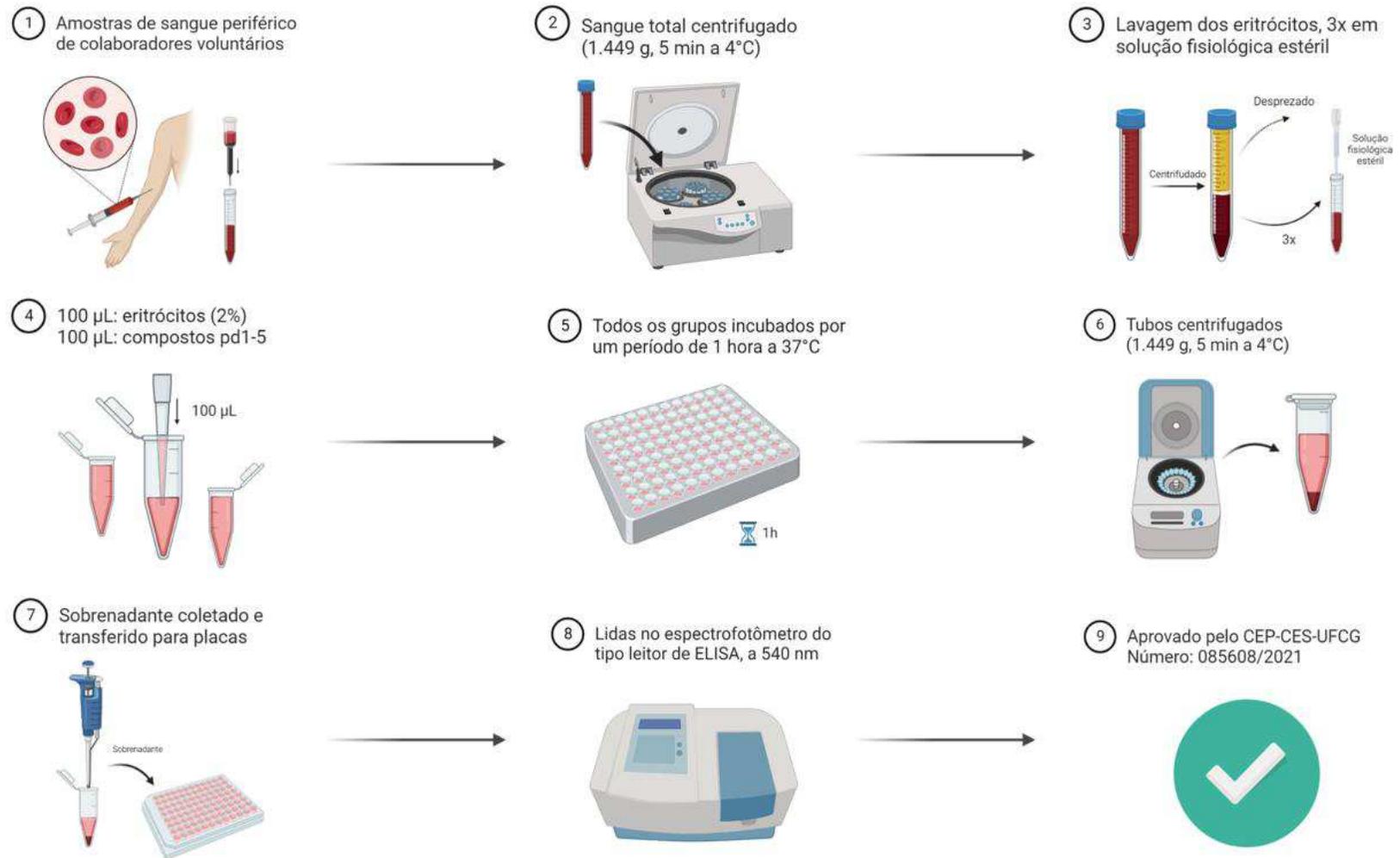
DADOS SUPLEMENTARES

Figura S1. Representação das estruturas químicas do acetato de paládio (**pd1**) e dos complexos metálicos de paládio (**pd2-5**) utilizados no presente estudo.



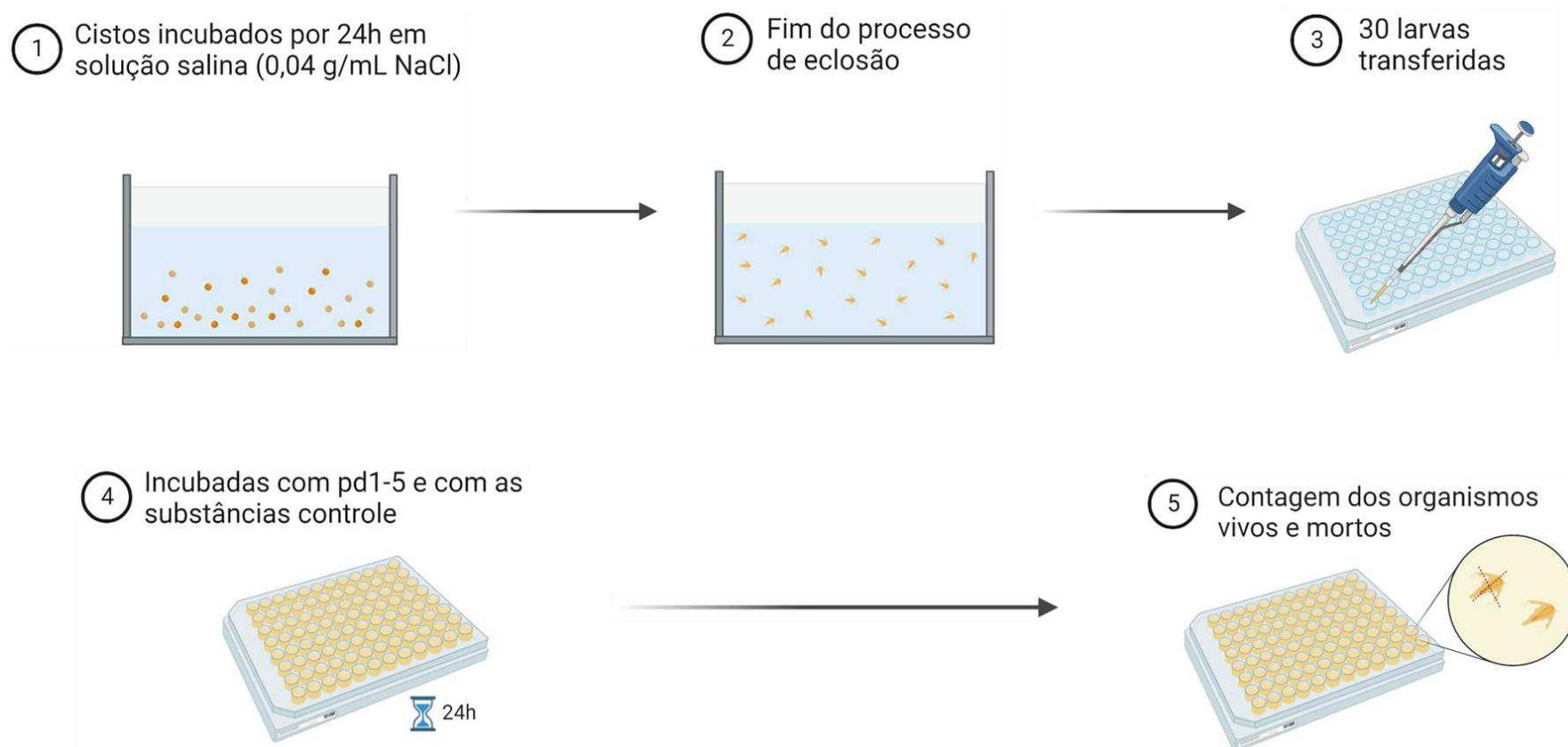
Fonte: pd1 (adaptado de Discovery Fine Chemicals, 2022); pd2-5 (criado pelo próprio autor, 2022).

Figura S2. Representação esquemática do ensaio de hemólise em eritrócitos humanos.



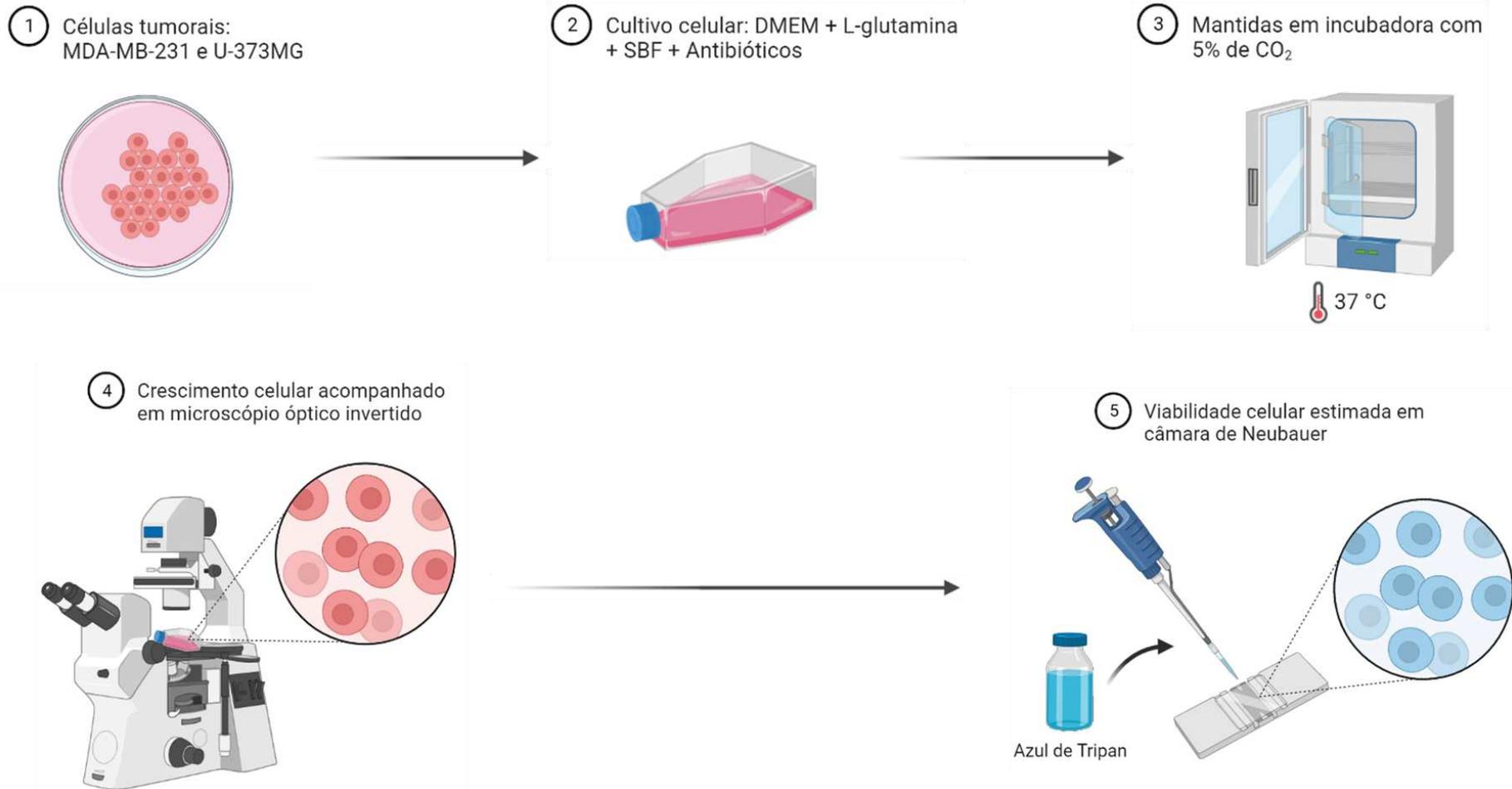
Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do *software* BioRender (2022).

Figura S3. Representação esquemática do bioensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina*.



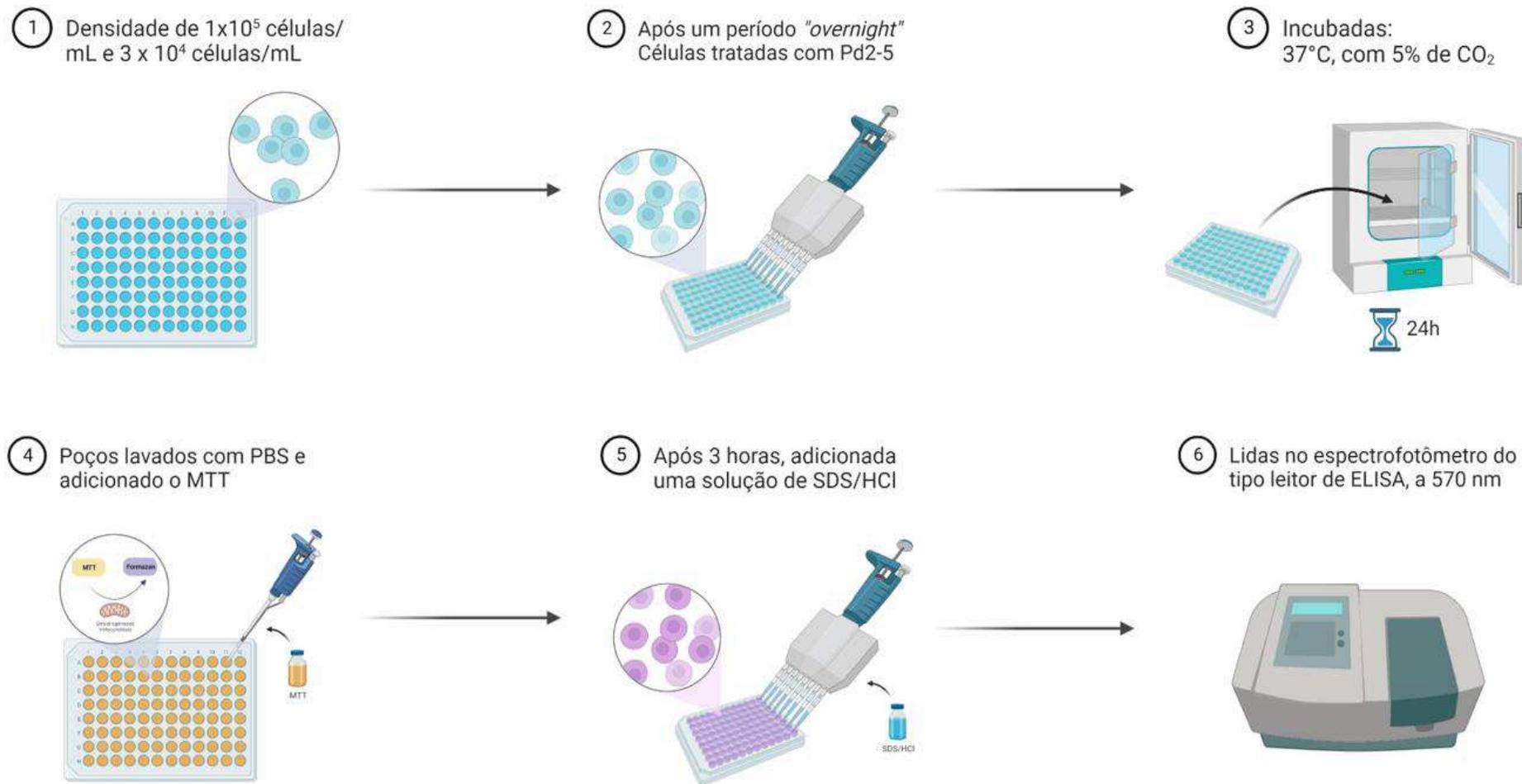
Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do *software* BioRender (2022).

Figura S4. Representação esquemática das etapas do cultivo celular.



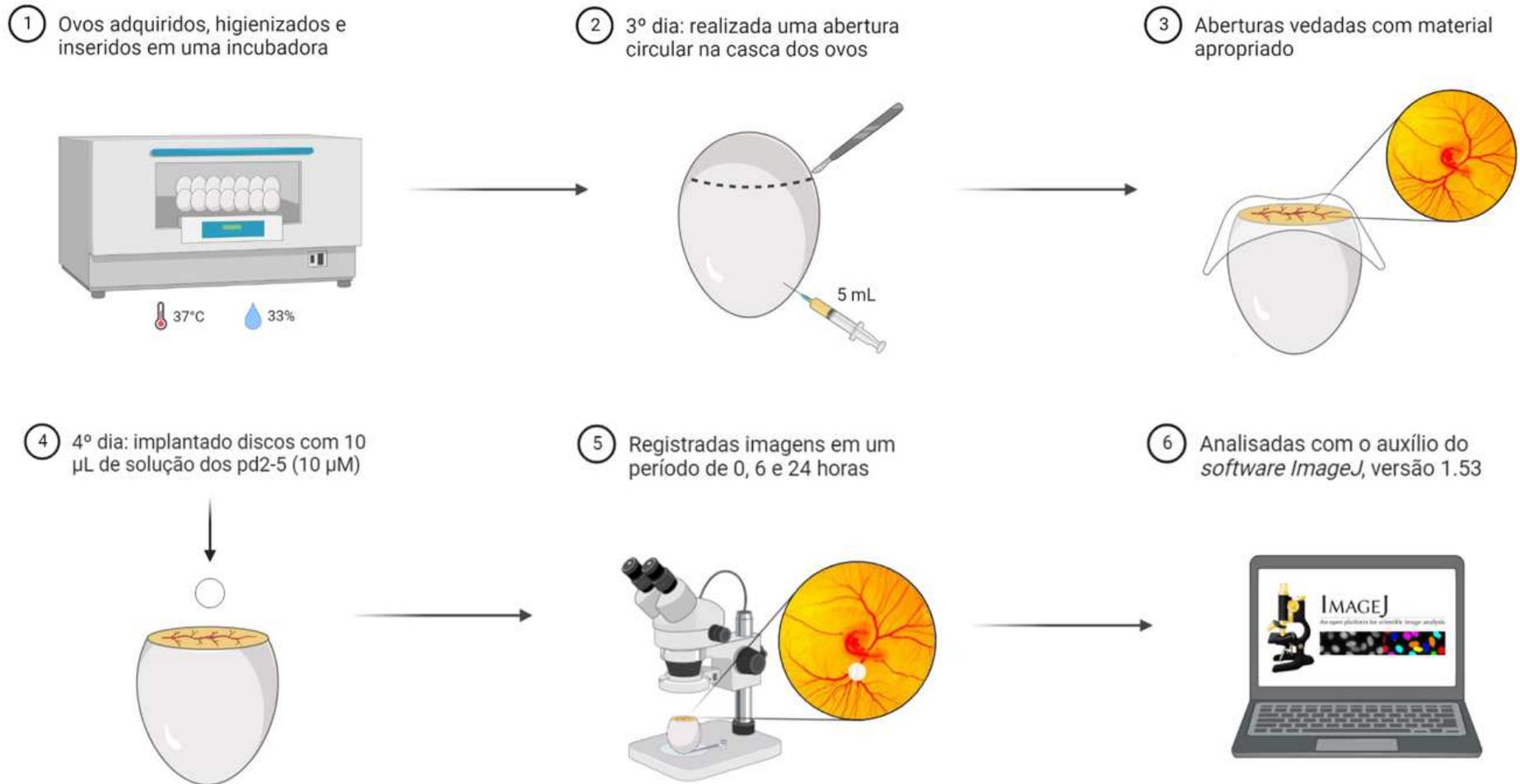
Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do *software* BioRender (2022).

Figura S5. Representação esquemática do ensaio de redução do MTT.



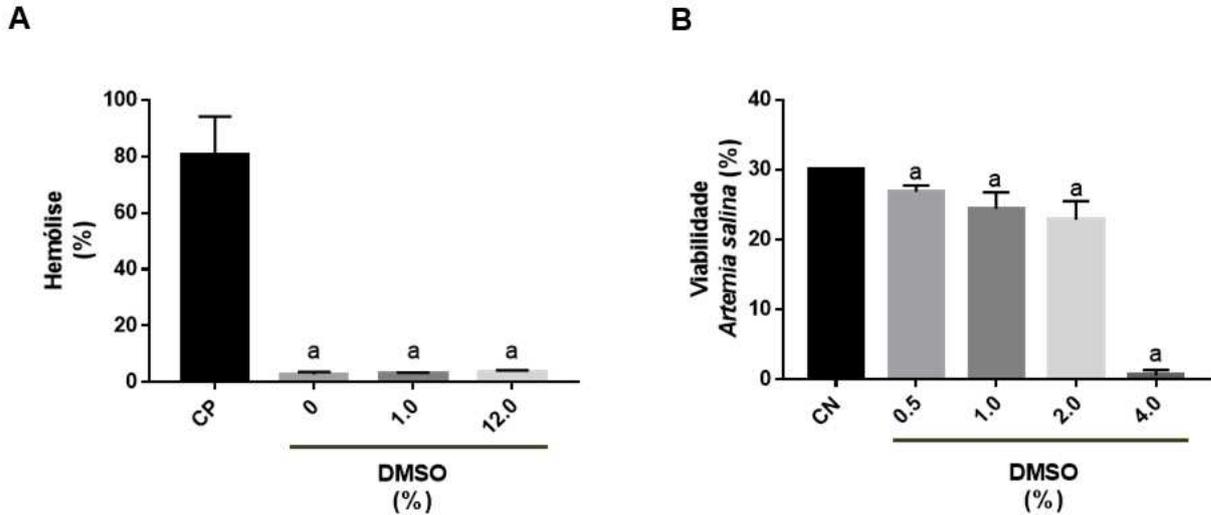
Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do *software* BioRender (2022).

Figura S6. Representação esquemática do teste da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM).



Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do *software* BioRender (2022).

Figura S7. Análise da toxicidade de diferentes concentrações do DMSO (0,5%, 1,0%, 2,0%, 4,0% e 12,0%) em dois modelos distintos. (A) atividade hemolítica e (B) toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina*.

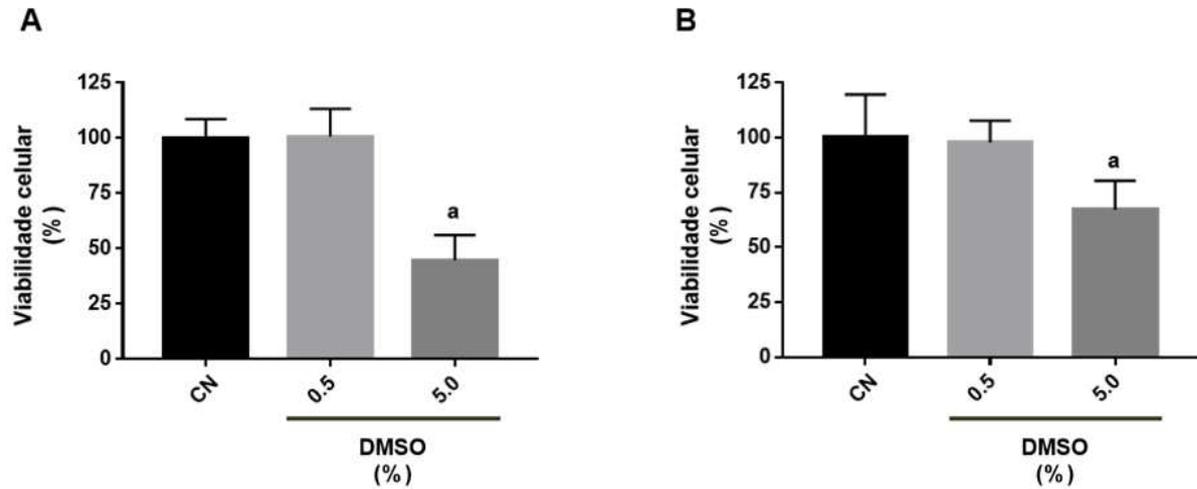


Os dados são expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes, efetuados em duplicata, analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-Keuls. (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao CP (H_2O) ou ao CN (solução salina).

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

Legenda: CP (controle positivo) e CN (controle negativo).

Figura S8. Efeito citotóxico das diferentes concentrações do DMSO (0,5% e 5,0%) sobre a viabilidade da linhagem U-373MG (A) e MDA-MB-231 (B), após um período de 24 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de redução do MTT.

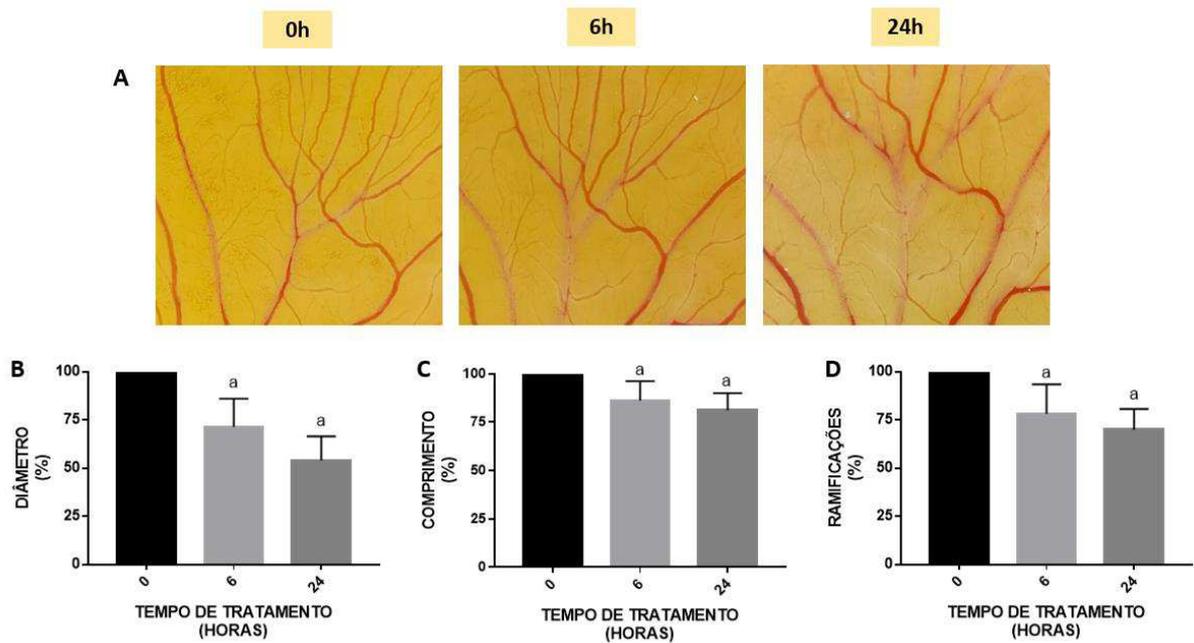


Os dados são expressos em porcentagem das médias dos valores da CI_{50} (μM) \pm desvio padrão de três experimentos independentes, efetuados em duplicata, analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-Keuls. (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao CN (meio de cultura).

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

Legenda: CN (controle negativo).

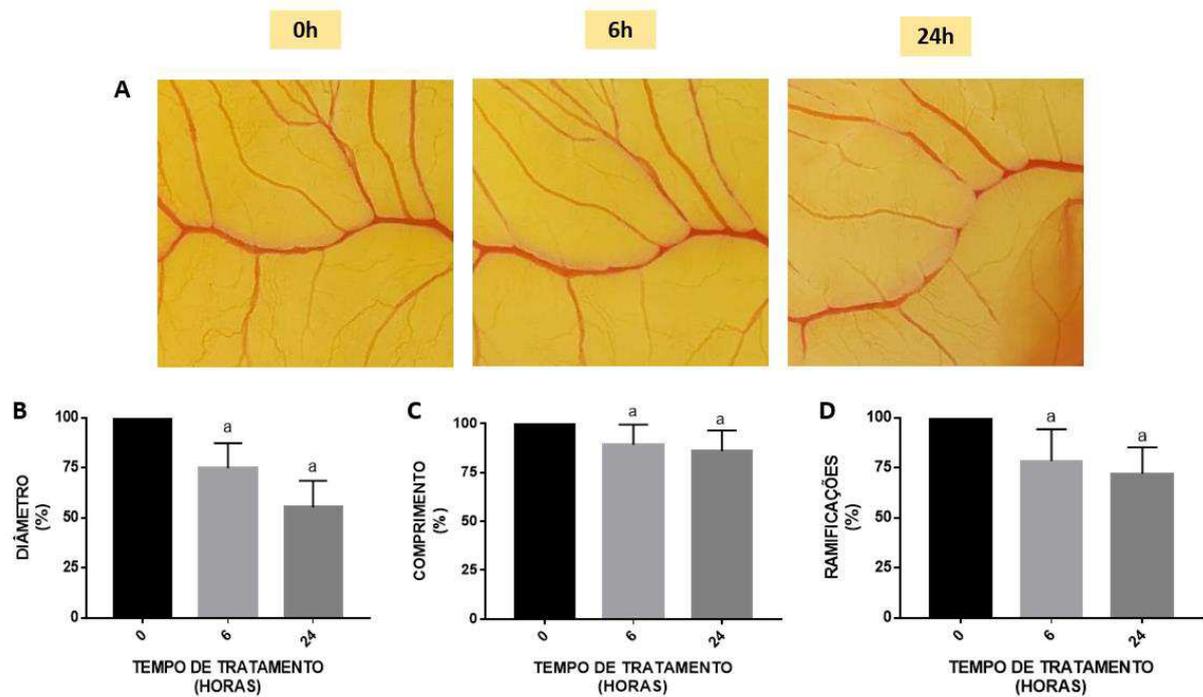
Figura S9. Efeito antiangiogênico do complexo metálico **pd2** (10 μ M) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico **pd2**, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

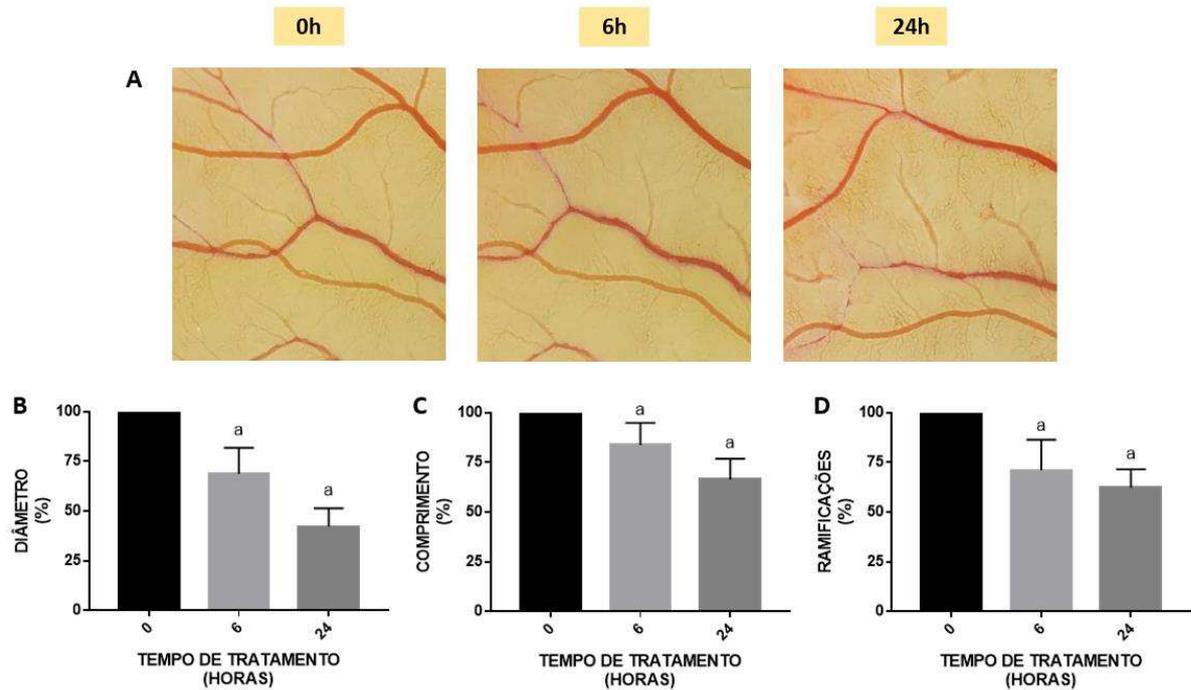
Figura S10. Efeito antiangiogênico do complexo metálico **pd3** (10 μ M) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico **pd3**, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

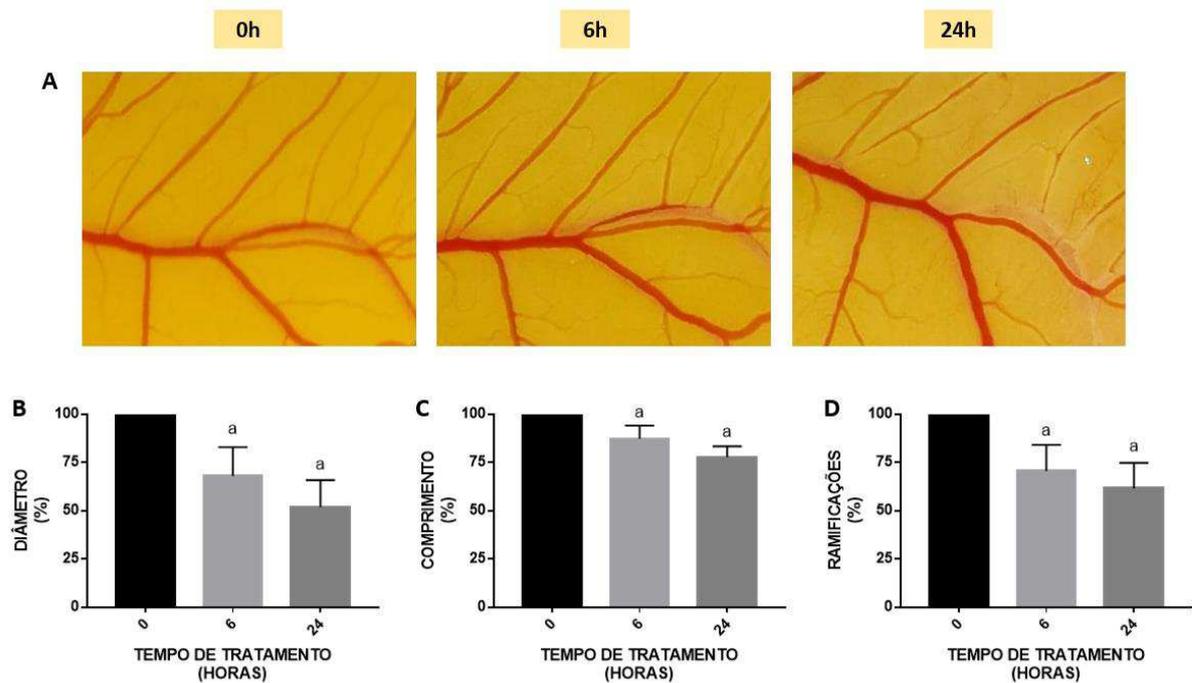
Figura S11. Efeito antiangiogênico do complexo metálico **pd4** ($10 \mu\text{M}$) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico **pd4**, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

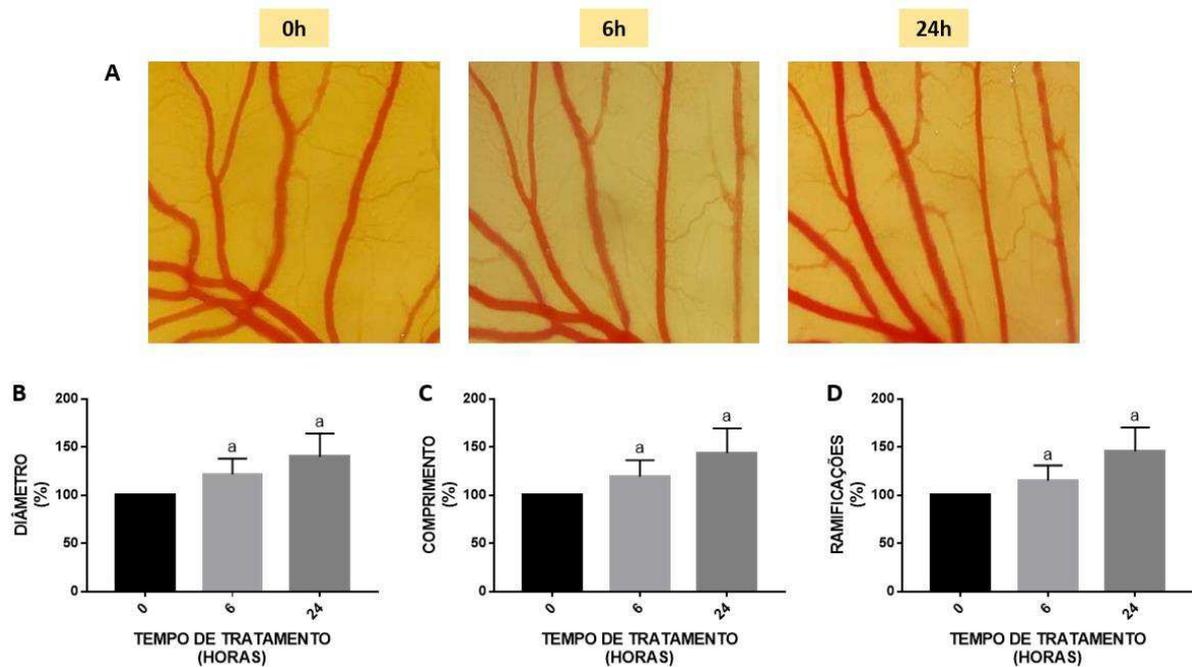
Figura S12. Efeito antiangiogênico do complexo metálico **pd5** (10 μ M) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com o complexo metálico **pd5**, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

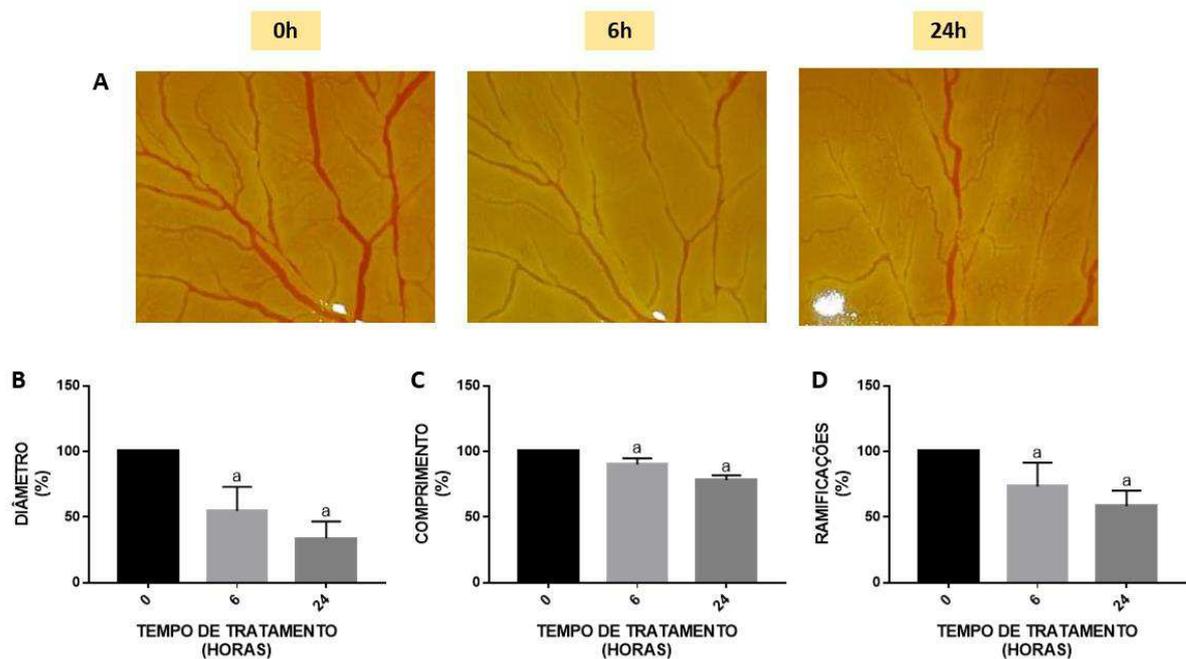
Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

Figura S13. Efeito angiogênico da solução salina avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com a solução salina, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

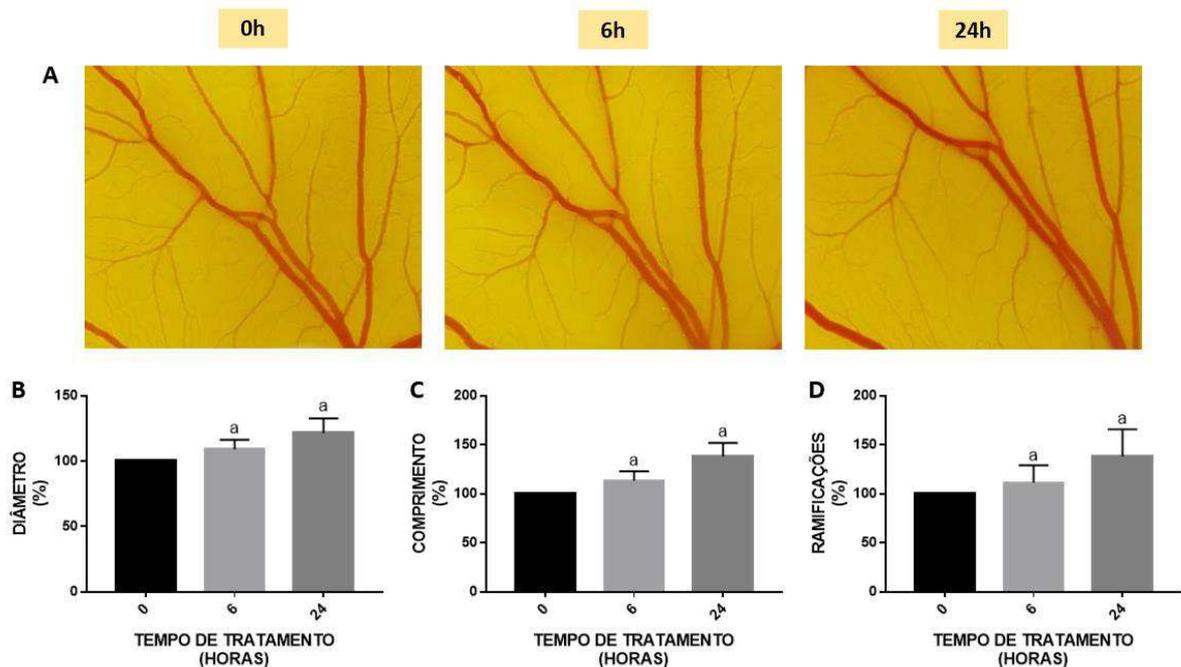
Figura S14. Efeito antiangiogênico da dexametasona avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com dexametasona, após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

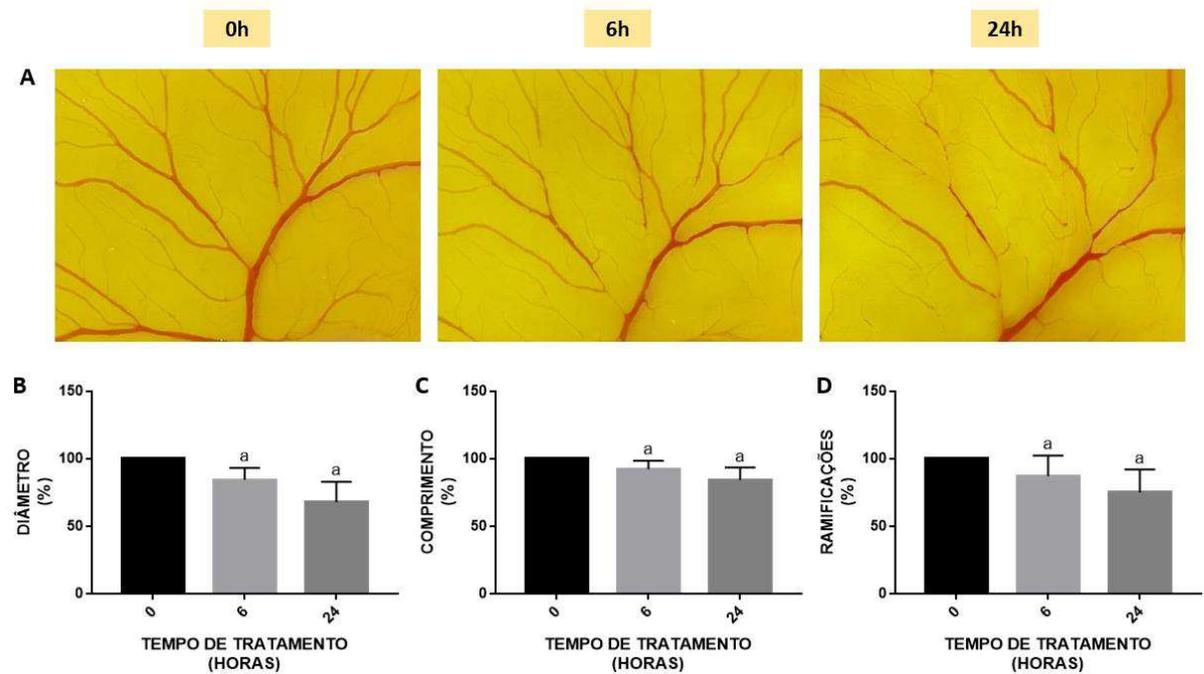
Figura S15. Efeito angiogênico do DMSO (0,02%) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com DMSO (0,02%), após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

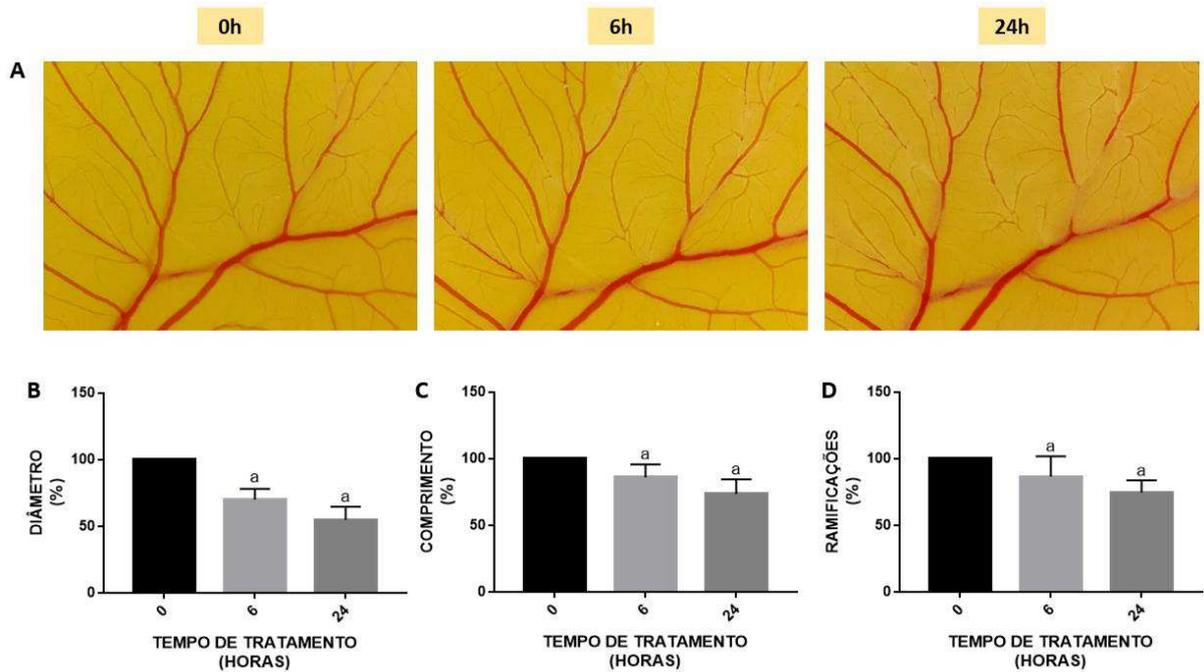
Figura S16. Efeito antiangiogênico do DMSO (0,2%) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com DMSO (0,2%), após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.



Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

Figura S17. Efeito antiangiogênico do DMSO (2,0%) avaliado pelo método HET-CAM. (A) Análise qualitativa da fotomicrografia representativa do sistema vascular em desenvolvimento da membrana corioalantóide tratado com DMSO (2,0%), após um período de tratamento de 0h, 6h e 24h. Análise quantitativa dos parâmetros vasculares (B) diâmetro, (C) comprimento e (D) número de ramificações vasculares.

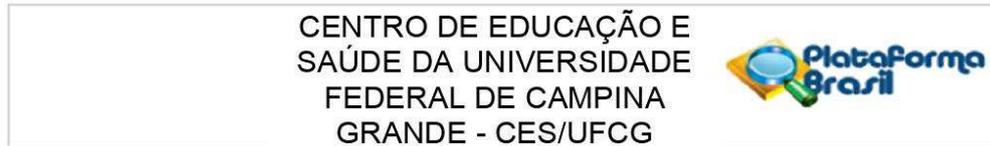


Os dados foram expressos em porcentagem como as médias \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados em triplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste t-Student, (a) representa $p < 0,05$ em comparação ao tempo 0h de incubação - normalizado de forma padrão para 100%.

Fonte: Banco de dados do estudo (2022).

ANEXOS

Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antiangiogênica em uma série de novos complexos de metais de transição estruturalmente relacionados a bases de Schiff

Pesquisador: Bruna Braga Dantas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50349221.3.0000.0154

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.994.062

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora aponta a importância da angiogênese para a sobrevivência e o desenvolvimento dos tumores malignos e que terapias direcionadas e novos fármacos antiangiogênicos têm aumentado a sobrevida de pacientes oncológicos. Diante disso, propõe: avaliar a atividade antiangiogênica de complexos metálicos relacionados a bases de Schiff; e estimar a segurança do uso destes compostos. Como metodologia, pretende: selecionar complexos metálicos com atividade antiangiogênica por meio do teste da membrana corioalantóide de ovo embrionado da espécie *Gallus domesticus*; e determinar a toxicidade dos compostos selecionados, utilizando o bioensaio de toxicidade aguda com larvas de *Artemia salina* Leach e o teste hemolítico em eritrócitos humanos.

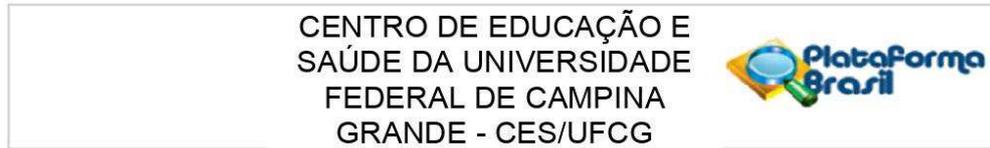
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: A pesquisadora descreve, como objetivo geral, avaliar a atividade antiangiogênica de uma série de novos complexos metálicos, estruturalmente relacionados a bases de Schiff.

Objetivo secundário: E, aponta como objetivos específicos: realizar uma triagem de uma coleção de complexos de metais de transição, estruturalmente relacionados a bases de Schiff, com ação antiangiogênica, por meio do método alternativo da membrana corioalantóide de ovo da espécie *Gallus domesticus*; determinar a dose letal dos complexos metálicos, de bases de Schiff

Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de
Bairro: DISTRITO DE MELO CEP: 58.175-000
UF: PB Município: CUITE
Telefone: (83)3372-1835 E-mail: cep.ces.ufcg@gmail.com

Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).



Continuação do Parecer: 4.994.062

previamente selecionados, para 50% da população, por meio do ensaio de toxicidade aguda com larvas de *Artemia salina* Leach; e, analisar a atividade hemolítica e citotóxica dos complexos metálicos, de bases de Schiff selecionados, em eritrócitos humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012, do Conselho Nacional de Saúde, toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados.

A pesquisadora expõe que, no decorrer do estudo, será avaliado o perfil citotóxico de compostos com ação antiangiogênica, por análise de efeito hemolítico *in vitro*. Para tanto, será coletada uma pequena amostra de sangue periférico de colaboradores voluntários, autodeclarados saudáveis e sem uso de medicação nas últimas 72 horas. A descrição dos riscos está apresentada na folha de informações básicas, no termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) e, de forma mais detalhada, no próprio projeto.

No projeto estão apresentadas estratégias para minimizar os riscos de danos e constrangimentos como, por exemplo, o esclarecimento, ao voluntário, do que vem a ser o projeto, qual o objetivo, e a indagação de se ele sente-se à vontade para doar uma pequena amostra de sangue, enfatizando ser, o doador, um agente importantíssimo para a descoberta de novas terapias anticâncer.

A pesquisadora ressalta que o indivíduo só participará da pesquisa se assim desejar, podendo desistir a qualquer momento. Garante ser mantida a confidencialidade dos participantes durante todas as fases da pesquisa, e que os pesquisadores serão os únicos a terem acesso às amostras coletadas.

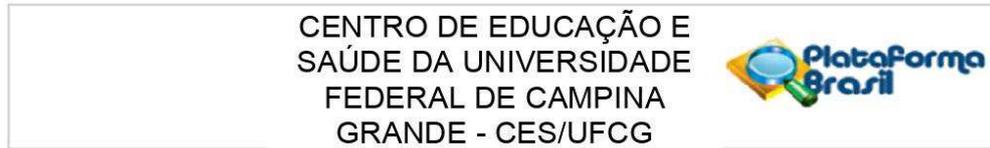
Relata que serão utilizados materiais estéreis descartáveis e que serão mínimos os riscos e desconfortos decorrentes do procedimento de punção venosa.

Descreve que o doador voluntário receberá importantes orientações sobre o procedimento de coleta de sangue, tais como:

- a) Evitar, durante a punção, movimentações espontâneas e conseqüente desconforto;
- b) Pressionar, por alguns minutos, o local puncionado, sem massagear ou flexionar a região;

<p>Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de</p>	<p>CEP: 58.175-000</p>
<p>Bairro: DISTRITO DE MELO</p>	
<p>UF: PB Município: CUITE</p>	
<p>Telefone: (83)3372-1835</p>	<p>E-mail: cep.ces.ufcg@gmail.com</p>

Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).



Continuação do Parecer: 4.994.062

- c) Realizar compressa gelada no local, caso ocorram reações locais, tais como hematomas;
- d) Procurar os pesquisadores responsáveis, caso, em situações muito raras, um desconforto persista ou apareçam sintomas de inflamação.

Sobre os benefícios da pesquisa, em termos sociais e científicos, está relatada a possível contribuição deste estudo, de caráter inovador, na identificação de moléculas inéditas que possam vir a ser usadas para tratamento de pacientes com câncer, com ação antiangiogênica e atividades hemolizante e tóxica reduzidas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora propõe investigar a atividade antiangiogênica de novos complexos metálicos, no sentido de busca de novos fármacos que possam conter o desenvolvimento de tumores malignos. Desta forma, este estudo poderá trazer novas contribuições para a ciência e a tecnologia, na área da saúde. Para a sociedade, pesquisas assim têm uma grande relevância, pois representam a esperança de sobrevivência para pacientes em tratamento de câncer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora inseriu os seguintes documentos:

1. Folha de Rosto;
2. Termo de Compromisso do Pesquisador;
3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
4. Termo de Anuência Institucional;
5. Projeto Completo.

Não foi apresentado um instrumento de coleta de dados, o que é justificável, pois este item não se aplica ao tipo de metodologia desta pesquisa.

Recomendações:

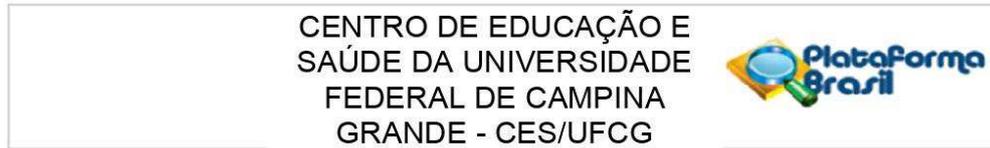
-Elaborar o relatório final, após término do projeto e inserir na plataforma para acompanhamento por este comitê.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa tem relevância científica e social, com metodologia dentro dos padrões éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Saúde, para pesquisas envolvendo seres humanos. Desta

<p>Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de</p>	<p>CEP: 58.175-000</p>
<p>Bairro: DISTRITO DE MELO</p>	
<p>UF: PB Município: CUITE</p>	
<p>Telefone: (83)3372-1835</p>	<p>E-mail: cep.ces.ufcg@gmail.com</p>

Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).



Continuação do Parecer: 4.994.062

forma, considera-se APROVADO para execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1792388.pdf	04/09/2021 02:57:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa_VF.pdf	04/09/2021 02:56:12	Bruna Braga Dantas	Aceito
Outros	TERMODEANUENCIAINSTITUCIONAL.pdf	04/09/2021 02:26:30	Bruna Braga Dantas	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	31/07/2021 02:04:45	Bruna Braga Dantas	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termodecompromissodospesquisadores.pdf	18/07/2021 17:51:04	Bruna Braga Dantas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termodeconsentimentolivreeesclarecido.pdf	18/07/2021 17:50:19	Bruna Braga Dantas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CUITE, 23 de Setembro de 2021

Assinado por:
Glauca Veríssimo Faheina Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de
Bairro: DISTRITO DE MELO **CEP:** 58.175-000
UF: PB **Município:** CUIATE
Telefone: (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com