

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Rafael Nunes Gomes

**Estudos complexométricos e biológicos do quelante
metálico N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino
(TPEN)**

Santo André
Novembro – 2021

Rafael Nunes Gomes

**Estudos complexométricos e biológicos do quelante
metálico N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino
(TPEN)**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado como
exigência para obtenção do
grau de Bacharel em Química,
ao Centro de Ciências Naturais
e Humanas da Universidade
Federal do ABC, Santo André.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Giselle Cerchiaro

Santo André 2021

Rafael Nunes Gomes

Estudos complexométricos e biológicos do quelante metálico N,N,N',N'-
tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino (TPEN)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência para
obtenção do grau de Bacharel em
Química, ao Centro de Ciências
Naturais e Humanas da Universidade
Federal do ABC, Santo André.

Aprovada em ____ de _____ de 2021

Prof.^a Dr.^a Karina Passalacqua Morelli Frin UFABC

Prof. Dr. André Sarto Polo UFABC

Prof.^a. Dr.^a. Giselle Cerchiaro Orientadora

Santo André 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo suporte e incentivo, especialmente a minha avó Celina.

Agradeço à minha digníssima orientadora Profa Dra Giselle por todos os ensinamentos, suporte e por acreditar em mim.

Agradeço ao Prof Dr Bruno Lemos e a Dra Tatiana Pedron pela colaboração.

Agradeço à Dra Emilene pela colaboração e ensinamentos.

Agradeço à Dra Caroline pelo suporte e apoio durante a execução do projeto.

Agradeço à Dra Tânia pelo incentivo e aconselhamentos.

Agradeço à Daniela pela convivência no laboratório e ajudas.

Agradeço a todo Cerchiaro Group pela convivência.

Agradeço à UFABC pela bolsa de iniciação concedida e pela infraestrutura.

RESUMO

N, N, N', N'-Tetrakis (2-piridilmetil) etilenodiamina (TPEN) é um composto hexadentado permeável à membrana que quela íons metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} , mas este quelante intracelular mostrou uma alta afinidade pelo zinco. Esta propriedade especial permite o uso de TPEN em uma variedade de configurações, muitas vezes como uma ferramenta para avaliar as funções de zinco em culturas de células. Estudos usando TPEN demonstraram que a depleção de zinco intracelular causa estresse oxidativo e danos ao DNA. O objetivo deste estudo foi determinar o pKa deste quelante para os diferentes íons metálicos, os efeitos citotóxicos e efeitos genotóxicos, bem como concentrações de metais e expressão de proteínas transportadoras de metais em células de hepatocarcinoma HepG2 em cultura submetidas ao quelante metálico TPEN. Em todas as análises *in vitro* foram utilizadas TPEN 5 μM , TPEN 25 μM e TPEN 50 μM incubados durante 6 horas e/ou 24 horas. A determinação do pKa foi feita utilizando 4-(2-piridilazo) resorcinol, como ligante comparativo. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio clonogênico, os danos ao DNA foram avaliados pelo ensaio cometa, as concentrações de Cu, Fe, Zn foram avaliadas por espectrômetro de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e a expressão de proteínas transportadoras de metais por western blot. Os tratamentos apresentaram alta citotoxicidade (Inibição da capacidade de formação de colônias- $P \leq 0,01$) e aumento do dano do DNA (Índice de danos: extensão de danos e frequência de danos: a proporção de células com fragmentação de DNA - $P \leq 0,001$) quando comparado com células de controle negativo. Para a expressão de proteínas transportadoras de metais, vemos a maior ativação de proteínas envolvidas com o efluxo de zinco (ZNT1), nas proteínas relacionadas ao cobre vemos a alta na expressão de ATP7A que está relacionada ao influxo de cobre. Análises para quantificação de metal via ICP-MS apontaram uma redução nos níveis de zinco nas células tratadas e alteração nos níveis de cobre e ferro principalmente na concentração de 5 μM de quelante. Desta forma, procuramos uma melhor compreensão da ação desse quelante quanto à sua possível capacidade de danificar as células e elucidar o comportamento de íons metálicos através da exposição dessa linhagem celular ao TPEN.

ABSTRACT

N, N, N', N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) is a membrane-permeable hexadentate compound that chelates metal ions such as Cu²⁺, Zn²⁺ and Fe²⁺, but this intracellular chelator is related to a high affinity by zinc. This special property allows the use of TPEN in a variety of settings, often as a tool to assess zinc functions in cell cultures. Studies using TPEN have shown that intracellular zinc depletion causes oxidative stress and DNA damage. The aim of this study was to determine the pKa of this chelator for different metal ions, cytotoxic and genotoxic effects, as well as metal procedures and expression of metal transporter proteins in cultured HepG2 hepatocarcinoma cells subjected to the metal chelator TPEN. In all in vitro analyses, TPEN 5µM, TPEN 25µM and TPEN 50µM were incubated for 6 hours and/or 24 hours. The pKa determination was made using 4-(2-pyridylazo) resorcinol, as a comparative ligand. Cytotoxicity was evaluated by clonogenic assay, DNA damage by comet assay, as Cu, Fe, Zn levels were measured by inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) and expression of metal transporter proteins by Western Blot. The treatments demonstrated high rate of cytotoxicity (Inhibition of the ability to form colonies - $P \leq 0.01$) and increase the DNA damage (Damage index: extent of damage and frequency of damage: the proportion of cells with DNA fragmentation - $P \leq 0.001$) when compared to negative control cells. For the expression of metal transporter proteins, we see increased activation of proteins involved in zinc efflux (ZNT1), in copper-related proteins we see a high expression of ATP7A that is related to copper influx. Analyzes for metal quantification via ICP-MS showed a reduction in zinc levels in treated cells and a change in copper and iron levels, especially in the concentration of 5µM of chelator. Thus, we sought a better understanding of the action of this chelator regarding its possible ability to damage cells and elucidate the behavior of metal ions through the exposure of this cell line to TPEN

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do quelante N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino (TPEN). 11
- Figura 2:** Estrutura do 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR).23
- Figura 3:** Estrutura dos complexos metálicos formados pelo PAR na forma M(PAR) e M(PAR)₂.....23
- Figura 4 :** Espectros eletrônicos do PAR e sulfato de cobre(II) submetidas à diferentes concentrações de TPEN em meio PBS(B) e em água(A). Curva $-\log[\epsilon]$ versus $\log [(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ em $\lambda = 420$ nm ($pK_a = 4,4$).24
- Figura 5:** Espectros eletrônicos do Fe(III) e PAR submetidas à diferentes concentrações de TPEN em meio PBS(D) e água(C). Curva $-\log[\epsilon]$ versus $\log [(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ em $\lambda = 400$ nm ($pK = 4,6$).25
- Figura 6:** Espectros eletrônicos do Zn e PAR submetidas à diferentes concentrações de TPEN em meio PBS (F) e água (E). Curva $-\log[\epsilon]$ versus $\log [(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ em $\lambda = 400$ nm ($pK = 4,9$).25
- Figura 7:** Avaliação da citotoxicidade em células Hep G2 através da capacidade de formação de colônias. Dados representativos de médias \pm SD ($n = 3$) e significância estatística (ANOVA - One way; Turkey's Test) $**P \leq 0.01$ e $***P \leq 0.001$ comparados com o controle negativo e entre os tratamentos.26
- Figura 8:** Danos no DNA (intensidade da cauda) detectados pelo ensaio cometa. (a) célula controle, (b)(c)(d) células com migração do DNA devido aos danos.27
- Figura 9:** Avaliação dos danos ao DNA através de ensaio cometa em células HepG2. Tratamento com TPEN em diferentes concentrações incubado por seis e vinte quatro horas. O controle positivo foi feito com MMS (Metanossulfonato de metila 44 μ g/mL) (A) Índice de danos ao DNA(B) Frequência de dano. Dados representativos de médias \pm SD ($n = 3$) e significância.28
- Figura 10:** Determinação da concentração de metais por ICP-MS na linhagem HepG2. Resultados expressos em ng Metal/mg de proteína total em células sem tratamento (controle negativo), células tratadas com TPEN 5 μ M, 25 μ M e 50 μ M. (A) Concentração de cobre nas células tratadas por 24 horas. (B) Concentração de zinco nas células tratadas por 24 horas. (C) Concentração de ferro nas células tratadas por 24 horas. Dados representativos de médias \pm SD ($n=3$); * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$ 45 (ANOVA one way - Bonferroni's test).28

Figura 11: (A) Western blots representativos para ATP7A e Znt1 são mostrados. A β -actina foi usada como controle de carregamento do gel nas células HepG2 tratadas com TPEN 5 μ M, 25 μ M e 50 μ M por 24 horas (n = 3). *** P \leq 0,001; ** P \leq 0,01 e * P \leq 0,05 em comparação entre as linhas celulares (ANOVA de uma via: teste de Bonferroni). Dados representativos da média \pm DP.....29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 TPEN.....	11
1.2 Zinco no meio biológico.....	12
1.3 Ferro no meio biológico.....	13
1.4 Cobre no meio biológico.....	14
2. OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATÉRIAS E MÉTODOS.....	15
3.1 Soluções e reagentes.....	15
3.2 Determinação do pKa.....	15
3.3 Cultura Celular.....	16
3.4 Ensaio Cometa.....	17
3.5 Ensaio Clonogênico.....	18
3.6 Extração e Quantificação de proteínas.....	18
3.7 Western Blotting.....	20
3.7.1 Corrida das proteínas em gel de poliacrilamida.....	20
3.7.2 Incubação da membrana com anticorpos.....	21
3.8 Determinação de metais por Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	21
3.9 Análises Estatísticas.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Determinação do pKa.....	22
4.2 Ensaio Clonogênico.....	25
4.3 Determinação dos danos primários ao DNA.....	26
4.4 Determinação dos níveis de Fe, Cu e Zn intracelular.....	28

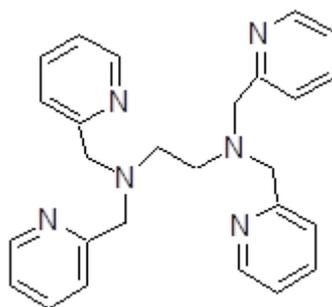
4.5 Avaliação dos níveis de expressão de proteínas transportadoras de Cu e Zn.	29
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 TPEN

O TPEN é um ligante hexadentado com seis átomos de nitrogênio que apresentam a função de quelar íons metálicos (figura 1) (Fukuoka et al., 2010). É permeável à membrana, por ser lipossolúvel e tem alta afinidade por vários metais pesados, tais como Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} (Cerchiaro, Manieri e Bertuchi, 2013; Webster, Bentley e Wojcikiewicz, 2003). Estas propriedades levam à utilização do TPEN em uma variedade de estudos, muitas vezes, utilizados como uma ferramenta para investigar as funções biológicas do Zn^{2+} .

Figura 1: Estrutura do quelante N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino (TPEN).



Estudos utilizando TPEN demonstraram que a depleção de zinco intracelular por este quelante provoca estresse oxidativo (Yu *et al.*, 2019), danos ao DNA (Rahal *et al.*, 2016) e apoptose (Zhu *et al.*, 2017). O próprio TPEN pode inibir os efeitos neurotóxicos do Zn^{2+} in vivo (Armstrong, Leong e Lees, 2001). Entretanto, os mecanismos que esse quelante atua, ainda não são bem compreendidos.

Vários estudos propuseram um mecanismo diferente para os efeitos do TPEN sobre a morte celular programada, e todos estavam relacionados com a depleção dos níveis intracelular de zinco. Os efeitos pró-apoptóticos do TPEN foram relatados em vários tipos de células, incluindo células neuronais (Ra *et al.*, 2009), células de câncer de próstata (Gmeiner *et al.*, 2015), células de câncer de cólon (Gali-Muhtasib *et al.*, 2015), células de carcinoma hepatocelular (Zhang *et al.*, 2012) e células de câncer de mama (Xu e Purtzki, 2010).

Por outro lado o TPEN é capaz de atenuar a morte neuronal induzida pela beta amiloide ao recuperar as concentrações intracelulares de Zn^{2+} . Manter a homeostase desse metal intracelular podendo ser uma alternativa eficaz para

aliviar o dano neuronal na doença de Alzheimer (Chen *et al.*, 2021). Como relatado anteriormente o TPEN pode induzir a morte celular, via apoptose. Porém, especula-se que haja outras vias envolvidas na citotoxicidade do TPEN, como por exemplo a autofagia, já que zinco é um regulador desse processo (Yu *et al.*, 2019).

1.2 Zinco no meio biológico

O zinco é um componente essencial de um grande número de enzimas que participam da síntese e degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, bem como do metabolismo de outros micronutrientes. O zinco estabiliza a estrutura molecular dos componentes celulares e membranas e contribui desta forma para a manutenção da integridade celular e orgânica. Além disso, o zinco tem um papel essencial na transcrição de polinucleotídeos e, portanto, no processo de expressão genética. Seu envolvimento em tais atividades fundamentais provavelmente explica a essencialidade do zinco para todas as formas de vida (Roohani *et al.*, 2013)

O zinco é liberado dos alimentos como íons livres durante a digestão. Esses íons liberados podem então se ligar a ligantes secretados endogenamente antes de seu transporte para os enterócitos no duodeno e jejuno. Uma vez absorvido o zinco é transportado rapidamente para o fígado. Sendo a albumina a principal proteína plasmática responsável por este transporte (Krežel e Maret, 2016).

Existem principalmente duas grandes famílias de proteínas responsáveis pela manutenção dos níveis de zinco dentro e fora da célula. A família ZnT é constituída por aproximadamente dez proteínas, que atuam transportando o zinco do citoplasma para fora da célula ou para dentro de vesículas intracelulares. Já a família ZIP é formada por pelo menos quatorze proteínas que transportam o zinco do meio extracelular para o citoplasma (Hernández-Camacho *et al.*, 2020; Maares e Haase, 2020).

A grande variedade de transportadores apresenta diferentes padrões de expressão gênica de acordo com os níveis de zinco. O transportador ZnT1, por exemplo, tem sua expressão aumentada em resposta ao aumento de zinco (Nishito e Kambe, 2019).

1.3 Ferro no meio biológico

O ferro é um mineral de extrema importância para o metabolismo celular. É essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. A sua habilidade de aceitar e doar elétrons o torna indispensável para diversas reações metabólicas. É um cofator importante para enzimas envolvidas na cadeia respiratória mitocondrial, na fixação do nitrogênio e processos de detoxificação. Nos mamíferos é utilizado na maior parte na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado. Um indivíduo adulto tem no seu organismo de 4 a 5 g de ferro, sendo que cerca de 2,5 g na forma de Hb. Sendo obtido principalmente por duas fontes: dieta e reciclagem das hemácias senescentes. (Grotto, 2010; W Grotto e Associado, 2008)

Em pH fisiológico, o ferro existe no estado férrico oxidado (Fe^{3+}). Para ser absorvido, o ferro deve estar no estado ferroso (Fe^{2+}) ou ligado a uma proteína. O baixo pH do ácido gástrico no duodeno proximal permite que uma enzima redutase férrica, citocromo B duodenal (Dcytb), converta os íons férrico insolúvel (Fe^{3+}) em íons ferrosos absorvíveis (Fe^{2+}). A produção de ácido gástrico desempenha um papel fundamental na homeostase do ferro plasmático (Ems, Lucia e Huecker, 2021).

Muitas proteínas foram identificadas desempenhando papéis no metabolismo do ferro. Algumas proteínas, como ferritina ou Tf, são as principais carreadoras de ferro no sangue, essa transporta o ferro (Fe^{3+}) que foi oxidado pela ceruloplasmina, no fígado. Enquanto peptídeos reguladoras de ferro (IRPs), hepcidina e matriptase (Mt2) são os principais determinantes da regulação de absorção do ferro em diferentes níveis fisiológicos, através da sua ligação com a ferroportina. Um conjunto de proteínas como a transportadora de metal divalente-1 (DMT1), ferroportina (FPN1) e receptores de transferrina (Tfrs) em associação com ferroxidases, como citocromo B duodenal, ceruloplasmina (Cp) e proteína transportadora heme (HCP1), são envolvidos no transporte de ferro pela membrana celular. Outras proteínas, como mioglobina (Mb), Hb e muitas enzimas diferentes são os produtos "finais" do metabolismo do ferro, porque requerem ferro para suas funções (Ems, Lucia e Huecker, 2021; Waldvogel-Abramowski *et al.*, 2014).

1.4 Cobre no meio biológico

O cobre é um micronutriente essencial, um homem adulto contém aproximadamente 100 mg de Cu pelo corpo. É um importante cofator catalítico e componente estrutural de proteínas envolvido em diversos processos bioquímicos essenciais para a vida. O cobre pode existir em dois estados de oxidação em sistemas biológicos Cu^{2+} e Cu^+ , tendo cada um deles afinidade por ligantes específicos, o Cu^{2+} tem preferência por ligantes de enxofre como a cisteína e metionina, já o Cu^+ se liga preferivelmente a doadores nitrogenados, como a histidina ou oxigenados como glutamato e aspartato. Essa propriedade redox é responsável pela catálise de uma ampla gama de processos enzimáticos com alta importância em processos biológicos (Linder e Hazegh-Azam, 1996).

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

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

Uma vez dentro da célula, o cobre se liga à metalochaperonas que guiam o metal a destinos intracelulares específicos em outras proteínas. As chaperonas CCS, COX17 e ATOX1 são responsáveis por transferir o cobre à superóxido

dismutase (SOD), citocromo c oxidase e as cobre ATPases, respectivamente. Essas transferências são realizadas através de interações específicas proteína-proteína, de modo que o cobre não fique livre no interior da célula. Por isso estima-se que haja apenas um átomo de cobre livre por célula, já que ele está sempre ligado a proteínas (Denoyer *et al.*, 2015).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Determinação da afinidade do quelante metálico TPEN pelos metais Cu, Fe e Zn, bem como as alterações intracelulares provocadas por ele utilizando como modelo, cultura celular de hepatocarcinoma.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o pKa do quelante TPEN com os principais metais traços intracelulares – cobre, ferro e zinco, tanto em meio aquoso quanto em meio aquoso salino simulando o meio celular.
- Em cultura celular HEP-G2 expostas ao quelante TPEN determinar: eficiência de plaqueamento, genotoxicidade, retirada seletiva dos metais e níveis de expressão das proteínas ATP7A (transportadora de cobre intracelular) e Znt1 (transportadora de zinco intracelular).

3. MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1 Soluções e reagentes

Todos os reagentes, bem como meios de cultura e suplementos foram obtidos de reconhecidos fornecedores comerciais e de grau analítico. Todas as soluções foram feitas com Água Ultrapura (resistividade 18.2 MΩ) obtida por sistema de purificação Milli-Q.

3.2 Determinação do pKa

Para a análise de complexação fixou-se uma concentração padrão de 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) combinado aos metais Cu, Fe e Zn de 4μM, nas formas de CuSO₄.5H₂O, ZnSO₄.7H₂O e Fe₂SO₄.5H₂O. Através de uma titulação do quelante TPEN e com auxílio do espectrômetro de raios UV-vis foi acompanhada

a modificação do perfil do espectro. A determinação do pKa do ligante foi feita através da equação 1.

$$-\log [\text{LIGANTE}] = \text{pKa} + \log [(A - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A)] \quad (1)$$

No qual A_{max} representa a absorvância máxima e A_{min} representa a absorvância mínima da banda. Assim, traçou-se a curva $-\log [\text{LIGANTE}]$ versus $\log [(A - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A)]$ e o pKa é determinado pelo coeficiente linear da curva traçada. Essas avaliações foram realizadas tanto em água como em meio tampão salino PBS pH=7,3.

3.3 Cultura Celular

A cultura de células humanas de carcinoma hepatocelular Hep G2, foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection). As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e antibiótico contendo 10.000 UI de penicilina e 10 mg/L de estreptomicina. A cultura celular foi mantida à temperatura de 37°C em atmosfera controlada composta por 5% de CO₂ (Estufa de cultivo celular – Forma Series II, Hepa Class 200, Thermo Scientific). Frascos de cultura com confluência de 80% de crescimento celular foram utilizados para subculturas e/ou ensaios. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas, em capela de fluxo laminar, sendo realizada limpeza prévia com álcool 70% e utilização de luz ultravioleta por 15 minutos para garantir a esterilidade do ambiente de cultivo celular. As células em cultivo foram plaqueadas somente após verificação de condições para os ensaios (confluência ~ 80%). Para realizar o plaqueamento, elas foram lavadas com PBS (do termo em inglês, Phosphate Buffered Saline - Tampão fosfato salino: NaCl 137 Mm e KCl 2,7 mM em 10 mM de solução tampão fosfato a pH 7,40), tripsinizadas e submetidas à centrifugação (1500 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em quantidade adequada de meio DMEM.

Após a ressuspensão, alíquotas de 10µL de suspensão celular desta solução foram submetidas a contagem em câmara de Neubauer para utilização nos ensaios. As células foram plaqueadas em uma densidade de 4x10⁴células/cm² e após 24 horas de plaqueamento as células foram submetidas ao tratamento com o quelante TPEN nas concentrações de 5µM, 25µM e 50µM durante 24 horas.

Após esse período de exposição, foram então desaderidas e utilizadas nos ensaios seguintes.

3.4 Ensaio Cometa

Para a avaliação de danos pela fragmentação de DNA, o ensaio de eletroforese em gel de célula única (Ensaio Cometa) foi aplicado. Este foi realizado com base no procedimento descrito por Wang e colaboradores (Pu, Wang e Klaunig, 2015) e conforme as recomendações do MIRCA (Informações Mínimas para Relatórios sobre o Ensaio de Cometa) (Møller *et al.*, 2020). As células foram plaqueadas na densidade de 4×10^4 células/cm² em placas de 6 poços e tratadas por 24 horas com TPEN e controle positivo com MMS (metanossulfonato de metila - concentração final MMS 4×10^{-4} M) – agente clastogênico (Poersch, 2009) - e controle negativo. Após 24 horas de incubação, as células tripsinizadas foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. A suspensão de células com concentração de aproximadamente 2.000 células/ml foi suspensa em 100µl de 0,5% (p/v) de agarose de baixo ponto de fusão (LMP – do termo em inglês “Low Melting Point”) dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS - pH 7,5) e colocada em lâminas de microscópio, pré-revestidas com uma camada de agarose com ponto de fusão normal a 1,5% (p/v) (NMP do termo em inglês “Normal Melting Point”). As lâminas foram deixadas por 5 minutos em uma geladeira para solidificar a agarose LMP. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução tampão fria de lise (NaCl 2,5 M, Tris 10 M, Na₂EDTA 100 mM e Triton X-100 1%; pH 7,5 a 4°C por 1 hora e 30 minutos). A seguir, essas lâminas foram mantidas em tampão desnaturante (Na₂EDTA 1,0 mM, NaOH 300 mM; pH 13,0) por 30 minutos a 4°C. Realizou-se a eletroforese com tampão desnaturante (300 mA; 25V - 0,76V/cm) por 20 minutos e a seguir a neutralização (TRIS 0,4 M; pH 7,5) foi realizada por 5 minutos em temperatura ambiente e lavada três vezes com água destilada. Após, as lâminas foram fixadas por imersão em etanol 100% frio por 5 minutos e deixadas secar ao ar.

Após a secagem das lâminas, finalmente, são coradas através do emprego de uma solução de nitrato de prata (5 % carbonato de sódio 0,1% nitrato de amônia, 0,1 % de nitrato de prata, 0,25% de ácido tungstosilicico e 0,15% de formaldeído) .

A identificação de danos ao DNA é feita através da classificação visual em diferentes classes de células com dano, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células. Para a análise são escolhidas aleatoriamente 100 nucleóides (50 de cada lâmina). No qual são classificadas visualmente em cinco classes de acordo com o comprimento da cauda, formada pelos fragmentos de DNA. 1) classe 0: sem danos, sem cauda; (2) classe 1 : com cauda menor do que o diâmetro do nucléolo; (3) classe 2: com cauda 1-2 vezes maior que o diâmetro do nucléolo; classe; (4) classe 3: com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucléolo; (5) classe 4: dano significativo com cauda longa, mais de 3 vezes do diâmetro do nucléolo. A partir disso, será calculado o índice de dano, que pode variar de 0 (nenhum dano) a 400 (máximo dano) unidades arbitrárias.

3.5 Ensaio Clonogênico

As células HEP-G2 foram plaqueadas com 200 células por cm² em uma placa de seis poços e submetidas ao tratamento com o quelante TPEN em três concentrações diferentes (5µM, 25µM e 50 µM) por um tempo de exposição de seis horas e vinte e quatro horas. Após o tempo de exposição o meio com o tratamento foi retirado e substituído por um novo meio para que a célula possam crescer por sete dias. Passados os sete dias, as células foram fixadas com carnoy (metanol e ácido acético 3:1) por dez minutos e coradas com cristal violeta (0,5%). Após a secagem, foi feita a contagem das colônias.

Para o cálculo da eficiência de plaquiamento (EP) foi feita a divisão do número de colônias formadas pelo número de células plaquiadas. Esse número representa a capacidade desse tipo celular de formar colônias, e será tido como base para o cálculo da fração de sobrevivência (FS), que representa o número de colônias que surgem sob exposição de diferentes (Franken et al, 2006) quantidades do quelante TPEN. Esse ensaio foi realizado em triplicada, de maneira independente para validação dos resultados (Franken *et al.*, 2006).

3.6 Extração e Quantificação de proteínas

Para a extração de proteínas, as células previamente tripsinizadas e lavadas por 3 vezes com PBS (25°C, 1500 RPM, 5 minutos), foram ressuspensas em 150 µL de tampão de lise celular, RIPA – do termo em inglês, modified radioimmunoprecipitation buffer (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 1 mM de ditiotretol,

1% de Triton X-100, desoxicolato de sódio a 0,5% e 0,1% de SDS em 50 mM de Tris a pH 7,5) contendo 50 µL de inibidor de protease, agitadas por 30 segundos em vórtex, e em sequência mantidas em repouso por 30 minutos em banho de gelo. Após este período, as alíquotas foram centrifugadas sob alta agitação e baixa temperatura (14.000xg, 4°C) por 20 minutos. O sobrenadante foi preservado e retirou-se uma alíquota de 20 µL para realizar a quantificação de proteínas totais. O procedimento de quantificação de proteínas foi adaptado do método descrito por Lowry e colaboradores em 1951 (LOWRY *et al.*, 1951). O método é baseado na reação de biureto em que o complexo de tartarato cúprico reage com ligações peptídicas das proteínas, seguido pela redução do reagente Folin, que produz a coloração azulada, e sua intensidade ocorre de acordo com a quantidade de proteínas presentes na amostra. Para determinar a quantidade de proteína, a absorbância da amostra é lida espectrofotometricamente à 750 nm, e a concentração é obtida através de uma curva de calibração com um padrão de proteína de concentrações conhecidas (µg/mL), neste caso a albumina sérica bovina (BSA). O método de Lowry é altamente sensível, utiliza pouca quantidade de amostra e dependendo do caso está menos suscetível a alguns tipos de interferentes (Zaia *et al.*, 1998). As alíquotas de proteínas (20 µL) provenientes do sobrenadante, obtidas na extração de proteínas, bem como os pontos da curva padrão de BSA foram misturadas com 500 µL do reagente de Lowry, constituída da mistura aquosa em proporções 100:1:1 consecutivamente do reagente A (0,15M de NaOH; 2,65M de Na₂CO₃), reagente B (0,6M de CuSO₄.5H₂O) e reagente C (0,12M de Na₂C₄H₄O₆.2H₂O) e em seguida mantidas em repouso por 20 minutos sob abrigo da luz. Subsequentemente adicionou-se 250 µL do reagente de Folin & Ciocalteu's fenol, preparado previamente pela diluição de 5 mL da solução comercial de Folin & Ciocalteu's fenol em 6 mL de água ultrapura. Deixou-se a solução final contendo as proteínas e os reagentes em repouso por mais 30 minutos sob abrigo da luz. Então a 28 leitura da absorbância tanto para as amostras quanto para a curva de calibração foi realizada em 750 nm. Através da construção de um gráfico da curva de calibração, foi obtida a equação da reta e determinação da concentração de proteínas totais das amostras desconhecidas.

3.7 Western Blotting

3.7.1 Corrida das proteínas em gel de poliacrilamida

As amostras (100 µg de proteínas totais advindas das células tratadas com o quelante) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-PAGE". Durante a eletroforese em gel, as proteínas são submetidas a um campo elétrico, que faz com que essas biomoléculas migrem de acordo com vários fatores, como o peso molecular, carga, formato e a interação com outras moléculas (proteínas e lipídeos). O método "SDS-PAGE", descrito por Laemmli em 1970, foi desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa uniformemente entre todas as proteínas, que migram para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares. O gel de empilhamento que foi preparado a 5%, permite que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas migram de acordo com seus tamanhos. A concentração do gel de separação vai depender da proteína que se pretende analisar. Os géis foram preparados a partir de uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1). A polimerização química da acrilamida com a bisacrilamida foi iniciada com a adição do persulfato de amônio e do TEMED; o persulfato de amônio gera radicais livres que levam à polimerização, enquanto o TEMED catalisa a formação destes radicais. A corrida das amostras foi feita em gel de separação na porcentagem de 12% por cerca de 2 horas (amperagem fixa em 15 mA) em um tampão de corrida (25 mM TRIS base, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Após eletroforese, seguiu-se a transferência das proteínas, contida nos géis, para a membrana, que foi otimizada com a aplicação de um campo elétrico com uma intensidade de corrente de 100 Volts, por 1 hora, mantendo o aparelho em baixa temperatura (4 °C) para evitar o aquecimento do gel e da membrana. Neste procedimento, utilizou-se um tampão de transferência constituído por 48 mM TRIS base, 39 mM de glicina, 0,037% SDS, 20% metanol. A eficiência do transferência foi verificada corando a membrana com vermelho de Ponceo, um corante reversível que pode ser lavado com água e PBS.

3.7.2 Incubação da membrana com anticorpos

Após a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, esta foi incubada em tampão de bloqueio por 1 hora, constituído por TBS-T contendo Nonfat-Dried Milk 5%. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (diluição 1:1000) contra a proteína de interesse. Depois da incubação, a membrana foi lavada 3X com TBS-T por 10 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos em 1% BSA-TBST como indicado pelo fabricante. Os complexos formados (proteína + anticorpo) após o tratamento com os anticorpos secundários, foram detectados utilizando SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) em fotodocumentador BioRad ChemiDoc XR+ e quantificados pelo Software ImageLab™ 6.0.1. Foram utilizados anticorpos para as proteínas: Anti-ATP7B produzido em coelho (Sigma HPA013187 – 1: 1000) e Anti-Znt1 policlonal produzido em coelho (Abcam ab110383-1:1000).

3.8 Determinação de metais por Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Para a determinação dos níveis intracelulares de metais, foi utilizada a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), de acordo com o protocolo descrito por Lago e colaboradores (Lago *et al.*, 2017) com pequenas alterações. Para isso as células foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/cm² em garrafas de 75cm² e tratadas com TPEN e após 24 horas as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos de centrifugação Falcon® de 15mL (estes estéreis, livres de metais e previamente pesados), lavadas com PBS por 3 vezes a 1500 rpm por 5 minutos. Após a última lavagem, o pellet celular foi ressuspenso em 5mL de PBS e uma alíquota de 1 mL foi separada para realizar a quantificação de proteínas totais (protocolo descrito detalhadamente no subitem a seguir 3.6. (Lowry *et al.*, 1951)). O conteúdo restante no tubo de centrifugação foi novamente centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos e ao final foi descartado o sobrenadante e o sedimento de células foi seco em estufa a 60°C por 5 dias. Antes das amostras seguirem para a análise de metais, as células foram submetidas ao processo de digestão com 50µL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado (65% p/v) bidestilado, homogeneizadas, e permaneceram em repouso durante 24 horas. Subsequentemente, 900µL de água ultrapura foi adicionada e submetidas a aquecimento em banho maria a 90°C por cerca de 1 hora, até observar digestão

completa do material orgânico. Após o resfriamento, as amostras foram pesadas novamente para a obtenção da massa final analisada e determinação do fator de diluição. No dia das análises foram adicionados 50µL de ródio (Rh) como um padrão interno na concentração final de 10µg.L⁻¹. Os seguintes materiais de referência foram utilizados (QMEQAS05S07 e QMEQAS06S06 L'Institut National de Santé Publique du Quebec - Canada). Todas as curvas de calibração com padrão analítico e brancos foram feitas por diluição em série de soluções padrão em estoque a 5% v/v de HNO₃. Finalmente, as amostras foram analisadas em colaboração com o Prof. Dr. Bruno Lemos (UFABC) por um espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado (DRC-ICP-MS Elan DRCII; Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA). Os resultados foram dados em ppb e convertidos usando a concentração de proteína por amostra e o fator de diluição, produzindo o resultado em ng/metal por mg de proteína da amostra.

3.9 Análises Estatísticas

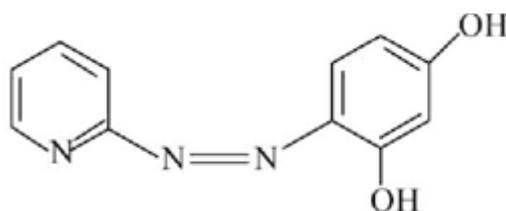
Cada bloco de ensaios foi realizado em triplicata (n=3), podendo variar o número experimental, conforme a metodologia empregada. Todas as amostras tratadas foram comparadas com os seus respectivos controles negativos através de Análise Estatística de Variância (ANOVA), seguido pelos pós testes de Bonferroni ou Turkey. As análises foram realizadas através do software Graphpad Prism version 5.0 sendo avaliadas as médias obtidas nos ensaios e obtendo-se a significância estatística e desvio padrão (\pm SD), considerando valores os $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**) e $P \leq 0.001$ (***) para diferenças entre as amostras experimentais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do pKa

Para determinação da afinidade do quelante TPEN frente aos metais Cu, Fe e Zn utilizou-se como comparativo o ligante 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR) (figura 2), um dos principais reagentes do grupo dos azocompostos. Esse ligante forma complexos estáveis em soluções aquosas e solventes polares na proporção molar metal:ligante 1:1 ou 1:2 e possuem intensa coloração avermelhada. Essa coloração oriunda das transições ligante metal permite o emprego do PAR para diversas técnicas colorimétricas de quantificação de metais (Souza, De e Rossi, 2014).

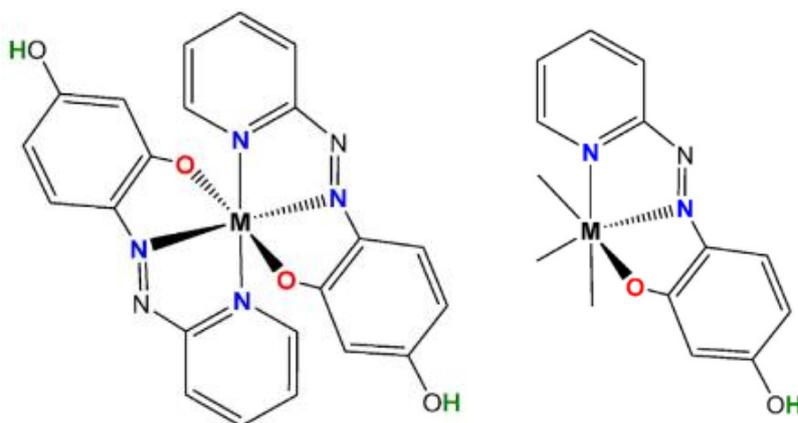
Figura 2: Estrutura do 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR).



Fonte: Autoria própria

O PAR forma quelatos com metais através do átomo de nitrogênio da piridina, do átomo de nitrogênio do grupo azo mais afastado do anel heterocíclico e do grupo orto-hidroxila. Assim, o PAR atua como um ligante tridentado que complexa formando dois anéis estáveis de cinco membros, como ilustrado na figura 3 (Karipcin e Kabalcilar, 2007). Sendo um ligante atraente para muitos íons metálicos com diferentes raios, estados de oxidação e geometrias. A literatura indica que o PAR é capaz de se associar a grandes número de íons metálicos dos blocos d, p e f da tabela periódica, se mostrando um ligante bem versátil (Kocyla, Pomorski e Krężel, 2015).

Figura 3: Estrutura dos complexos metálicos formados pelo PAR na forma $M(\text{PAR})$ e $M(\text{PAR})_2$.



Fonte: Adaptado de Kocyla, Pomorski e Krężel, 2015.

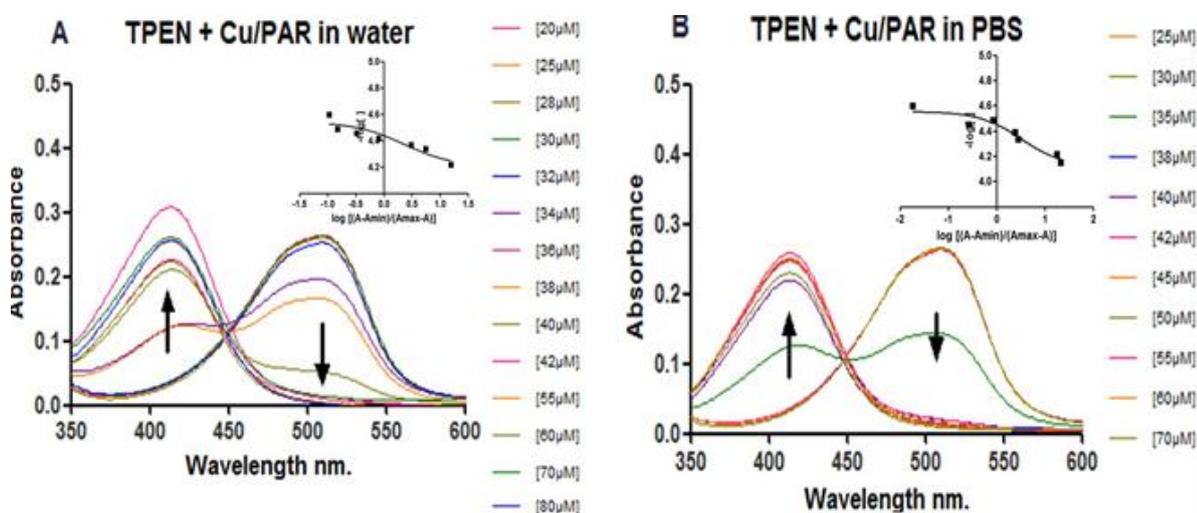
A ligação de íons metálicos à molécula PAR está associada à desprotonação do grupo fenólico, que tem grande implicação para o espectro eletrônico do PAR. Os complexos exibem a formação de uma nova banda entre 480 a 540 nm em um pH neutro ou básico.

A fim de monitorar a capacidade do TPEN de “sequestrar” o metal ligado ao PAR. As mudanças no espectro UV do complexo $M(\text{PAR})$ na presença do TPEN

foram monitoradas, com adição de diferentes concentrações do quelante TPEN à uma concentração fixa de M(PAR).

Observa-se na figura 4 que com o aumento da concentração do quelante, há um decréscimo da absorbância em 510nm e aumento da absorbância em 411nm, indicando que o TPEN é capaz de influenciar na complexação do PAR-Cu(II), esse comportamento é observado tanto em meio aquoso quanto em meio tamponado.

Figura 4 : Espectros eletrônicos do PAR e sulfato de cobre(II) submetidas à diferentes concentrações de TPEN em meio PBS(B) e em água(A). Curva $-\log[\]$ versus $\log [(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ em $\lambda = 420$ nm ($pK_a = 4,4$).



O TPEN é um ligante hexadentado que forma complexos octaédricos com o Cu (II), Zn(II) e Fe(III) (Blindauer *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2021). Como observado nas figuras 4, e 6 há um deslocamento de uma banda de absorção na região de mais baixa energia para uma região de mais alta energia no espectro UV-vis, enquanto na figura cinco há apenas o surgimento da nova banda em 411. Estes dados mostram que o quelante TPEN é capaz de se ligar ao cobre prioritariamente em concentrações acima de $30\mu\text{M}$, podendo-se calcular o pK_a de 4,4 para o Cu(II), 4,6 para o Fe(III) e 4,9 para o Zn(II).

Figura 5: Espectros eletrônicos do Fe(III) e PAR submetidas à diferentes concentrações de TPEN em meio PBS(D) e água(C). Curva $-\log I$ versus $\log [(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ em $\lambda = 400$ nm ($pK = 4,6$).

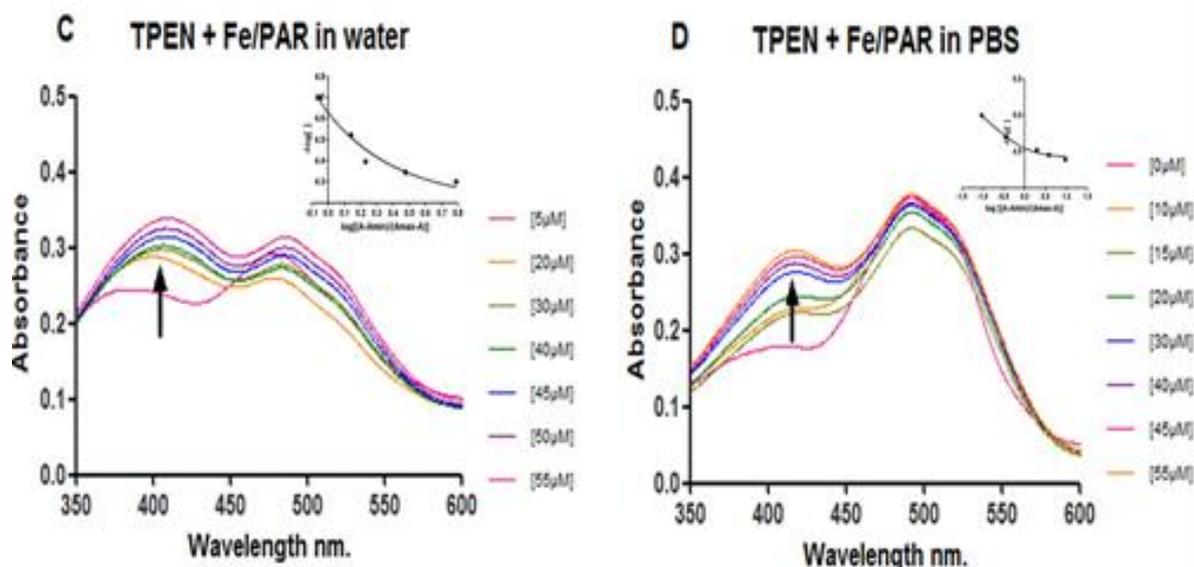
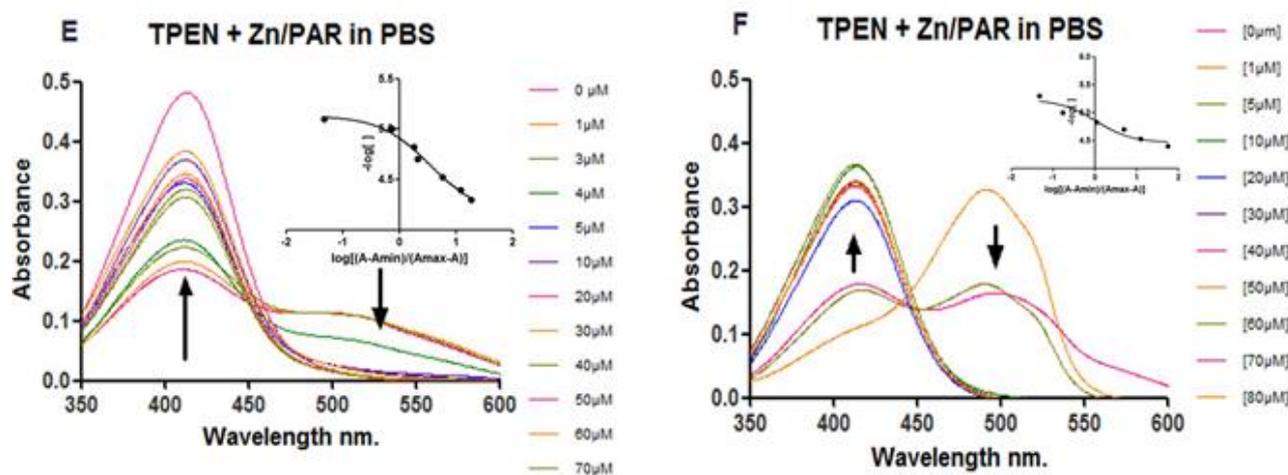


Figura 6: Espectros eletrônicos do Zn e PAR submetidas à diferentes concentrações de TPEN em meio PBS (F) e água (E). Curva $-\log I$ versus $\log [(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ em $\lambda = 400$ nm ($pK = 4,9$).



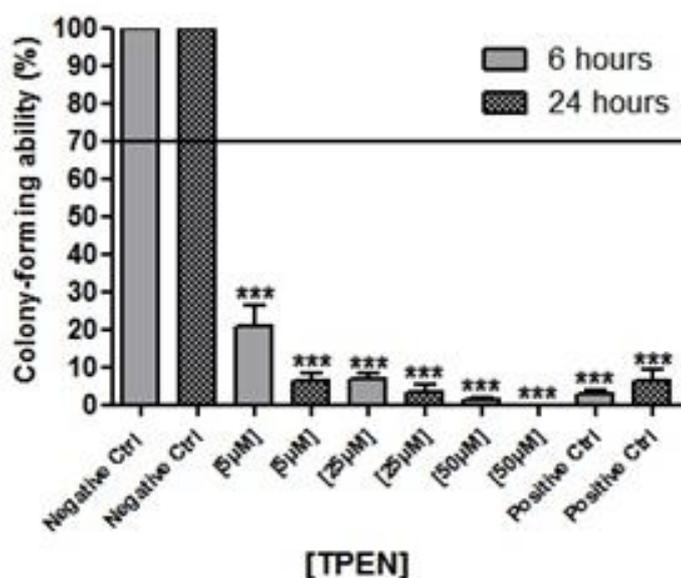
4.2 Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico é amplamente utilizado no campo da pesquisa do câncer, uma vez que a formação de colônias é interpretada como uma característica das células cancerosas com capacidade de iniciação de tumores. Embora este ensaio tenha sido inicialmente usado no campo da radiobiologia, para avaliar a capacidade de radiações ionizantes na inviabilização de células tumorais. Essa técnica tornou-se uma ferramenta padrão na pesquisa do câncer para avaliar o crescimento celular e capacidade proliferativa, além dos efeitos

citotóxicos ou genotóxicos de vários agentes com potencial aplicação clínica. Isso inclui agentes quimioterápicos e terapias direcionadas isoladamente ou em combinação (Mayr *et al.*, 2018; Rafehi *et al.*, 2011)

O ensaio clonogênico mede a capacidade das células de reter sua integridade reprodutiva por um período prolongado. Esta é uma característica importante, pois revela efeitos fenotípicos que requerem tempo e, possivelmente, várias divisões celulares para se desenvolver (Buch *et al.*, 2012).

Figura 7: Avaliação da citotoxicidade em células Hep G2 através da capacidade de formação de colônias. Dados representativos de medias \pm SD (n= 3) e significância estatística (ANOVA - One way; Turkey's Test) **P \leq 0.01 e ***P \leq 0.001 comparados com o controle negativo e entre os tratamentos.



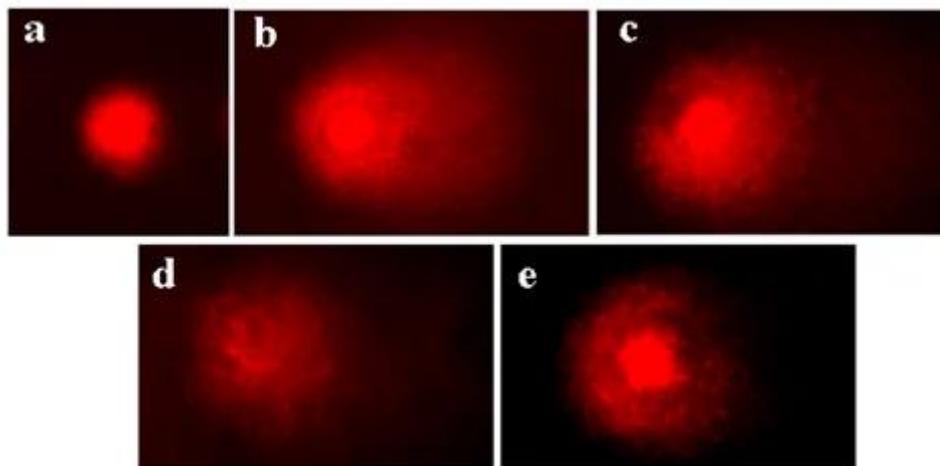
No atual contexto deste trabalho, o objetivo deste ensaio é avaliar o impacto do desbalanço metálico, provocado pela presença do quelante metálico no meio celular, no processo proliferativo desta linhagem celular. A presença do quelante afeta a proliferação celular significativamente, com pouca variação conforme a concentração de quelante e tempo de exposição, como pode-se observar na figura 7. Apenas a presença do quelante em concentrações de 5µM ou maior é capaz de comprometer severamente o processo proliferativo das células HepG2.

4.3 Determinação dos danos primários ao DNA

O ensaio do cometa (eletroforese em gel de célula única) é um método simples para medir quebras de fita de ácido desoxirribonucléico (DNA) em

células eucarióticas. As células incorporadas em agarose em uma lâmina de microscópio são lisadas com detergente e alto teor de sal para formar nucleoides contendo alças superenroladas de DNA ligadas à matriz nuclear. A eletroforese em pH alto resulta em estruturas semelhantes a cometas (figura 8), observadas por microscopia; a intensidade da cauda do cometa em relação à cabeça reflete o número de quebras de DNA. A explicação para isso é que os loops contendo uma quebra perdem seu superenrolamento e se tornam livres para se estender em direção ao ânodo, quanto maior essa migração maiores são os danos, estes danos são passíveis de reparo, por isso este ensaio avalia apenas os danos primários. (Collins, 2004).

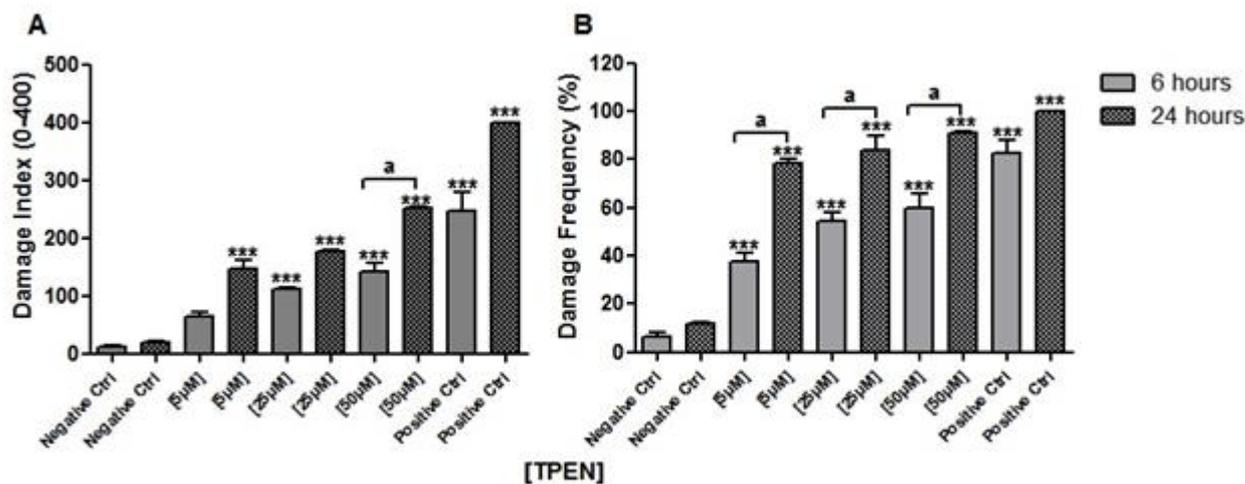
Figura 8: Danos no DNA (intensidade da cauda) detectados pelo ensaio cometa. (a) célula controle, (b)(c)(d) células com migração do DNA devido aos danos.



. Fonte: Aviello et al. (2011) PLOS Journal.

Assim, o ensaio cometa permitiu elucidar os efeitos genóxicos do TPEN em células HepG2, causados pelo desbalanço metálico. De acordo com os dados obtidos, figura 9, o quelante é capaz de causar fragmentação do DNA, que é apontado pela alta frequência de dano apresentada em todas as concentrações utilizadas. A frequência de dano mostra a porcentagem de células com algum tipo de lesão no DNA, independente da classificação. Contudo, quando olhamos para o índice de dano, percebemos que nas concentrações menores, a extensão do dano é menor (menor migração dos fragmentos, logo menor classificação do cometa), conforme a concentração aumenta a migração dos fragmentos é também aumentada. Assim, podemos inferir que há uma relação entre a concentração de TPEN e a extensão dos danos causados ao DNA.

Figura 9: Avaliação dos danos ao DNA através de ensaio cometa em células HepG2. Tratamento com TPEN em diferentes concentrações incubado por seis e vinte quatro horas. O controle positivo foi feito com MMS (Metanossulfonato de metila 44µg/mL) (A) Índice de danos ao DNA(B) Frequência de dano. Dados representativos de medias ± SD (n = 3) e significância.



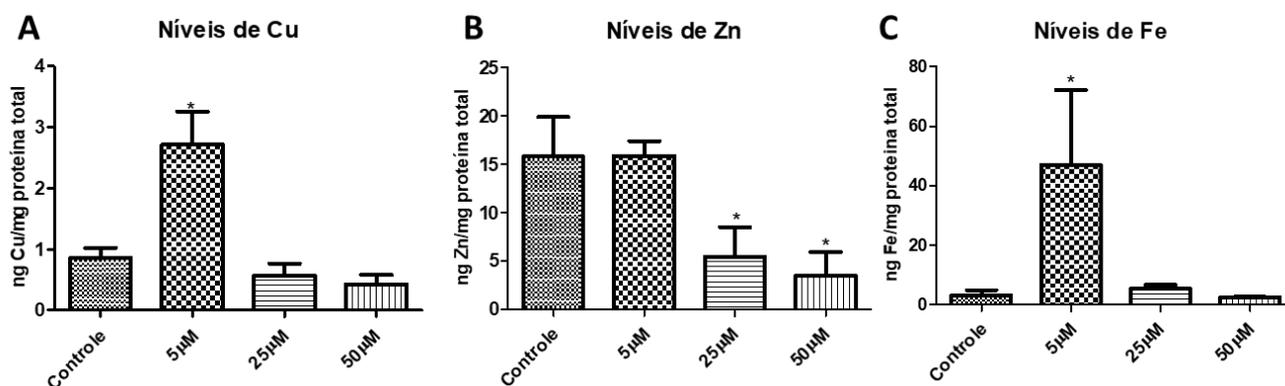
Estudos realizados em células de câncer de colo demonstraram que o TPEN é capaz de causar danos ao DNA via geração de espécies reativas de oxigênio, devido a sua capacidade de se ligar aos metais, especialmente o cobre, tornando-o disponível para o ciclo redox e causando danos ao DNA (Gali-Muhtasib *et al.*, 2015; Rahal *et al.*, 2016). Sendo assim, a geração de espécies reativas de oxigênio pode ser uma explicação para a fragmentação do DNA encontrada, porém são necessárias mais análises para identificar o mecanismo no qual esse processo acontece na linhagem celular HepG2.

4.4 Determinação dos níveis de Fe, Cu e Zn intracelular

Como já evidenciado em literatura o TPEN é capaz de reduzir os níveis de zinco intracelular (Armstrong, Leong e Lees, 2001; Gmeiner *et al.*, 2015; Hashemi *et al.*, 2007; He *et al.*, 2020) essa ação aumenta com a concentração de quelante. Contudo, ele também tem uma ação na alteração dos níveis de outros metais como cobre e ferro, podendo aumentar a quantidade desses metais no meio intracelular, especialmente na concentração de 5µM como mostra a figura 10.

Figura 10: Determinação da concentração de metais por ICP-MS na linhagem HepG2. Resultados expressos em ng Metal/mg de proteína total em células sem tratamento (controle negativo), células tratadas com TPEN 5µM, 25µM e 50µM. (A) Concentração de cobre nas células tratadas por 24 horas. (B) Concentração de zinco nas células tratadas por 24 horas. (C) Concentração de ferro nas células tratadas por 24 horas. Dados

representativos de médias \pm SD (n=3); * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$ 45 (ANOVA one way - Bonferroni's test).



4.5 Avaliação dos níveis de expressão de proteínas transportadoras de Cu e Zn.

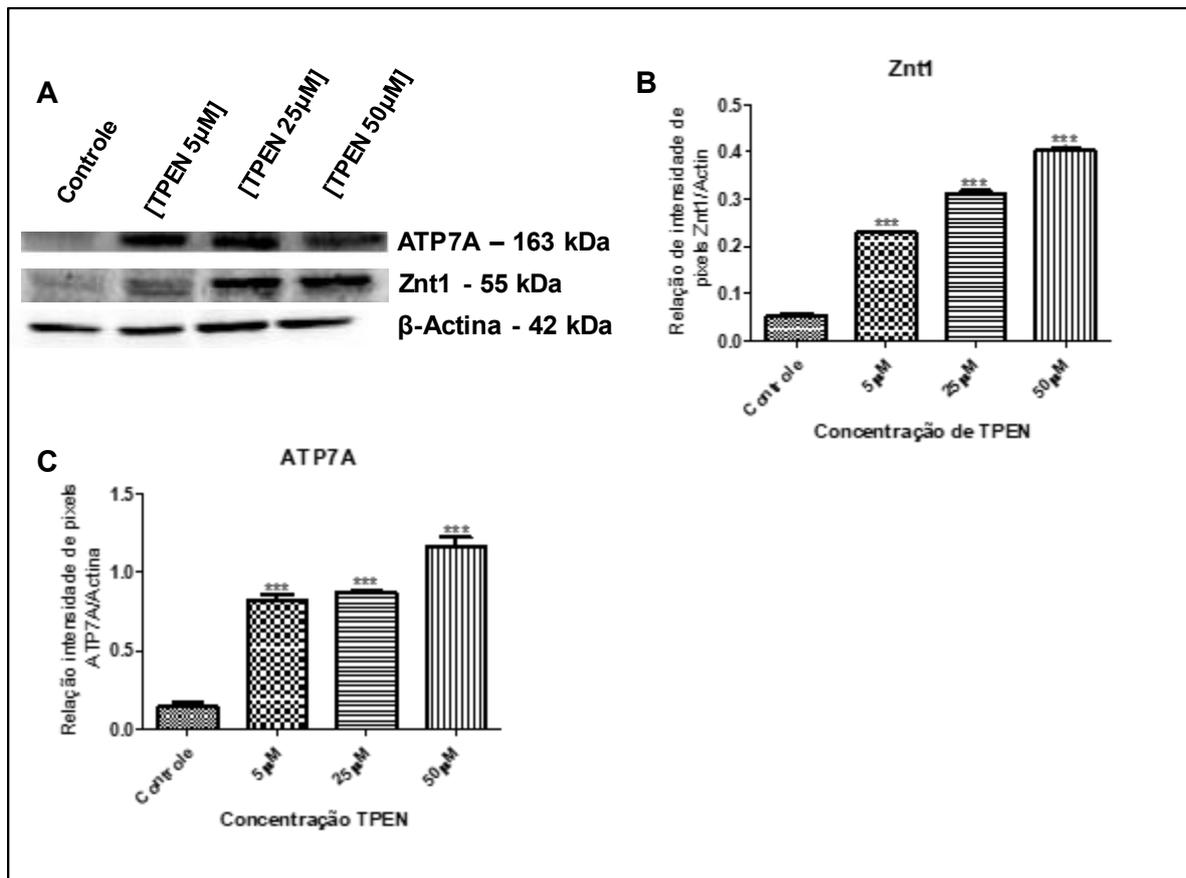
A fim de compreender de forma mais clara como acontece a variação nos níveis de metais na célula, evidenciado pelos dados obtidos na análise de ICP-MS (figura 9), decidiu-se avaliar o nível de expressão de proteínas transportadoras de zinco (ZNT1) e cobre (ATP7A) através da técnica de western blotting utilizando anticorpos específicos para essas proteínas.

A proteína transportadora de zinco 1 (ZNT1), é uma proteína codificada pelo gene SLC30A1 pertencente a super família de proteínas facilitadoras de difusão de cátion (CDF). É o único transportador de zinco localizado predominantemente na membrana plasmática, onde desempenha um papel fundamental na exportação do zinco citosólico para o espaço extracelular (Bin, Seo e Kim, 2018).

ATP7A, também conhecida como proteína de Menkes (MNK), é uma ATPase do tipo P de transporte de cobre que usa a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar Cu (I) através das membranas celulares. A ATP7A regula a absorção de Cu (I) no corpo humano, transportando Cu (I) do intestino delgado para o sangue. Em outros tecidos, o ATP7A se desloca entre o aparelho de Golgi e a membrana celular para manter as concentrações adequadas de Cu (I) (uma vez que não há Cu (I) livre na célula, os íons Cu (I) estão fortemente ligados a proteínas) na célula (Uhlemann *et al.*, 2021).

Figura 11: (A) Western blots representativos para ATP7A e Znt1 são mostrados. A β -actina foi usada como controle de carregamento do gel nas células HepG2 tratadas com TPEN 5µM, 25µM e 50µM por 24 horas. (B)(C) Taxa comparativa da quantidade de pixels da proteína

analisada pela proteína controle. (n = 3). *** P ≤ 0,001; ** P ≤ 0,01 e * P ≤ 0,05 em comparação entre as linhas celulares (ANOVA de uma via: teste de Bonferroni). Dados representativos da média ± DP.



Os resultados de expressão proteica, apresentados na figura 11 apontam um aumento significativo na expressão das proteínas ZNT1 e ATP7A sob exposição com o quelante, quando comparado a célula sem tratamento.

O aumento na expressão da proteína ZNT1 pode explicar o mecanismo no qual o zinco intracelular é exportado para o meio extracelular. A diminuição dos níveis de zinco evidenciados na análise de ICP-MS são resultado do efluxo de zinco através da proteína ZNT1, provocado pela exposição da célula ao TPEN. Evidenciando o importante papel dessa proteína na ação do quelante de diminuição da quantidade de zinco intracelular.

A proteína ATP7A também sofreu aumento na sua expressão, porém houve um acúmulo de cobre intracelular na concentração de 5µM de TPEN e leve diminuição na quantidade de cobre nas concentrações de 25µM e 50µM, indicados pelos dados de ICP-MS (figura 10). Isso, somado a alta da expressão dessa proteína, evidencia o papel dela no efluxo de cobre causado pelo TPEN,

porém essa função não é observada quando as células são expostas a menor concentração de quelante (5 μ M), já que houve acúmulo de cobre e uma expressão significativa de ATP7A.

A preferência do TPEN pelo zinco (maior pKa) também pode influenciar na pouca alteração dos níveis de cobre nas concentrações maiores, já que a quantidade dos outros metais não se alterou significativamente. Contudo são necessárias mais investigação para entender o acúmulo de cobre e ferro nas células HepG2 na concentração de 5 μ M de TPEN.

5. CONCLUSÃO

O TPEN é um quelante capaz de atravessar a membrana plasmática, devido a sua lipofilicidade. Uma vez dentro da célula ele é capaz de perturbar processos internos das células, especialmente se ligando a metais que muitas vezes são cofatores enzimáticos com importantes funções em processos celulares. Levando a danos ao DNA, evidenciados no ensaio cometa; comprometimento da proliferação celular, inibindo a capacidade celular de formar colônias, visto no ensaio clonogênico; alteração nos níveis de Cu, Fe e Zn intracelular bem como provoca aumento na expressão de proteínas transportadoras de cobre e zinco.

Este trabalho mostrou que o TPEN não só é capaz de simular processos de deficiência de zinco, amplamente visto na literatura, como também é capaz de alterar a quantidade de outros metais no meio intracelular e comprometer processos importantes para a manutenção dos processos celulares. Em suma, esse composto atua de forma ampla na célula interferindo em muitos processos, não só no sequestro de zinco intracelular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, C.; LEONG, W.; LEES, G. J. Comparative effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity induced by copper (Cu²⁺), iron (Fe³⁺) and zinc in the hippocampus. **Brain Research**, v. 892, n. 1, 2001.

BIN, B. H.; SEO, J.; KIM, S. T. Function, structure, and transport aspects of ZIP and ZnT Zinc transporters in immune cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

BLINDAUER, C. A. *et al.* Metal complexes of N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN): Variable coordination numbers and geometries. 2005.

BUCH, K. *et al.* Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. **Radiation Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 3 jan. 2012.

CERCHIARO, G.; MANIERI, T. M.; BERTUCHI, F. R. **Analytical methods for copper, zinc and iron quantification in mammalian cells***Metallomics*, 2013.

CHEN, W. BO *et al.* TPEN attenuates amyloid-β_{25–35}-induced neuronal damage with changes in the electrophysiological properties of voltage-gated sodium and potassium channels. **Molecular Brain**, v. 14, n. 1, 2021.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

DENOYER, D. *et al.* **Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”***Metallomics*, 2015.

EMS, T.; LUCIA, K. S.; HUECKER, M. R. Biochemistry, Iron Absorption. **StatPearls**, 2021.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols** 2006 1:5, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006.

FUKUOKA, S. *et al.* Thermo-responsive extraction of cadmium(II) ion with TPEN-NIPA gel. Effect of the number of polymerizable double bond toward gel formation and the extracting behavior. **Tetrahedron**, v. 9, n. 66, p. 1721–1727, 27 fev. 2010.

GALI-MUHTASIB, H. *et al.* **Abstract 2564: The anticancer molecule TPEN induces DNA damage in human colon cancer cells**2015

GMEINER, W. H. *et al.* The cytotoxic and pro-apoptotic activities of the novel fluoropyrimidine F10 Towards prostate cancer cells are enhanced by Zn²⁺-chelation and inhibiting the serine protease Omi/HtrA2. **Prostate**, v. 75, n. 4, 2015.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 08–17, 2010.

HASHEMI, M. *et al.* Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, n. 1, 2007.

HE, YIFEI *et al.* Zn²⁺ and mPTP mediate resveratrol-induced myocardial protection from endoplasmic reticulum stress. **Metallomics**, v. 12, n. 2, 2020.

HELLMAN, N. E.; GITLIN, J. D. **Ceruloplasmin metabolism and function***Annual Review of Nutrition*, 2002.

- HERNÁNDEZ-CAMACHO, J. D. *et al.* **Zinc at the crossroads of exercise and proteostasis***Redox Biology*, 2020.
- KARIPCIN, F.; KABALCILAR, E. Spectroscopic and Thermal Studies on Solid Complexes of 4-(2-pyridylazo)resorcinol with Some Transition Metals. **undefined**, 2007.
- KOCYŁA, A.; POMORSKI, A.; KRĘŻEL, A. Molar absorption coefficients and stability constants of metal complexes of 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR): Revisiting common chelating probe for the study of metalloproteins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 152, p. 82–92, 2015.
- KRĘŻEL, A.; MARET, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, 2016.
- LAGO, L. *et al.* Flow of essential elements in subcellular fractions during oxidative stress. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 30, n. 1, p. 83–96, 1 fev. 2017.
- LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. **Copper biochemistry and molecular biology***American Journal of Clinical Nutrition*, 1996.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.
- LUTSENKO, S. *et al.* **Function and regulation of human copper-transporting ATPases***Physiological Reviews*, 2007.
- MAARES, M.; HAASE, H. **A guide to human zinc absorption: General overview and recent advances of in vitro intestinal models***Nutrients*, 2020.
- MAYR, C. *et al.* Miniaturization of the Clonogenic Assay Using Confluence Measurement. **International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 724**, v. 19, n. 3, p. 724, 3 mar. 2018.
- MØLLER, P. *et al.* Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817–3826, 1 dez. 2020.
- NISHITO, Y.; KAMBE, T. Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 43, 2019.
- PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J. E. Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. **Current Protocols in Toxicology**, v. 2015, p. 3.12.1-3.12.11, 2015.
- RA, H. *et al.* Essential role of p53 in TPEN-induced neuronal apoptosis. **FEBS Letters**, v. 583, n. 9, 2009.
- RAFEHI, H. *et al.* Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 49, p. 49, 2011.
- RAHAL, O. N. *et al.* Chk1 and DNA-PK mediate TPEN-induced DNA damage in a ROS dependent manner in human colon cancer cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 17, n. 11, 2016.
- ROOHANI, N. *et al.* Zinc and its importance for human health: An integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 144, 2013.

- SOUZA, P. T. DE; ROSSI, A. V. Determinação espectrofotométrica indireta de capsaicinoides em pimentas *Capsicum* a partir da reação com o complexo de Co(II) com 4-(2-piridilazo) resorcinol. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 631–637, 2014.
- UHLEMANN, E. M. E. *et al.* At sixes and sevens: cryptic domain in the metal binding chain of the human copper transporter ATP7A. **Biophysical Journal**, v. 120, n. 20, p. 4600–4607, 19 out. 2021.
- VALLE, E. M. A. *et al.* Study of the Cull Affinity by Three Chelating Agents of Biological Interest: TPEN, TRIEN and Et2DTC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 4, 2021.
- W GROTTTO, H. Z.; ASSOCIADO, P. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390–397, 2008.
- WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S. *et al.* Physiology of Iron Metabolism. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 213, 2014.
- WEBSTER, J. M.; BENTLEY, M. T.; WOJCIKIEWICZ, R. J. H. N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine inhibits ligand binding to certain G protein-coupled receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 474, n. 1, 2003.
- XU, Z.; PURTZKI, M. Zinc Depletion-induced Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Is Calcium-dependent. **The FASEB Journal**, v. 24, n. S1, 2010.
- YU, ZHEN *et al.* Zinc chelator TPEN induces pancreatic cancer cell death through causing oxidative stress and inhibiting cell autophagy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, 2019.
- ZHANG, C. *et al.* Diabetes-Induced Hepatic Pathogenic Damage, Inflammation, Oxidative Stress, and Insulin Resistance Was Exacerbated in Zinc Deficient Mouse Model. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- ZHU, B. *et al.* Zinc Depletion by TPEN Induces Apoptosis in Human Acute Promyelocytic NB4 Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, 2017.