

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

PRISCYLLA ANDRADE VOLKART

**ESTUDO DE ÍONS COBRE NO MECANISMO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO COM  
RESVERATROL EM MODELO DE CÉLULAS MCF-7**

Porto Alegre

2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PRISCYLLA ANDRADE VOLKART

**ESTUDO DE ÍONS COBRE NO MECANISMO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO  
COM RESVERATROL EM MODELO DE CÉLULAS MCF-7**

Porto Alegre

2017

PRISCYLLA ANDRADE VOLKART

**ESTUDO DE ÍONS COBRE NO MECANISMO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO  
COM RESVERATROL EM MODELO DE CÉLULAS MCF-7**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. André Arigony Souto

Co-Orientador: Dr. José Eduardo Vargas

PORTO ALEGRE

2017

## Ficha Catalográfica

V916e Volkart, Priscylla Andrade

Estudo de Íons cobre no Mecanismo de Formação de Complexo com Resveratrol em Modelo de Células MCF-7 / Priscylla Andrade Volkart . – 2017.

41 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. André Arigony Souto.

Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo Vargas.

1. Cobre. 2. Resveratrol. 3. MCF-7. 4. ROS. 5. apoptose. I. Souto, André Arigony. II. Vargas, José Eduardo. III. Título.

PRISCYLLA ANDRADE VOLKART

**ESTUDO DE ÍONS COBRE NO MECANISMO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO  
COM RESVERATROL EM MODELO DE CÉLULAS MCF-7**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 27 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dra. Patricia Luciana da Costa Lopez – HCPA

---

Prof. Dra. Barbara Nery Porto - FAMED/PUCRS

---

Prof. Dra. Maria Martha Campos - PPGBCM/PUCRS

PORTO ALEGRE

2017

“Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você. Ser feliz é agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida e usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.”

*Augusto Cury*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu Orientador Prof. Dr. André Arigony Souto pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pelos ensinamentos, confiança depositada e apoio constante. Ao meu co-orientador Dr. José Eduardo Vargas pela colaboração nas etapas de desenvolvimento dessa dissertação e à Prof. Dra. Bárbara Nery Porto por disponibilizar o espaço e recursos necessários para o andamento do trabalho.

Agradeço à minha mãe e ao meu irmão, pelo apoio, amor, paciência e carinho durante esses dois anos de estudos e dedicação, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e por acreditarem em mim e no meu potencial.

Agradeço à todos os meus amigos pela constante compreensão pelas ausências e imediata disponibilidade quando necessária sua companhia e aos amigos que fiz durante esse período, meus colegas de laboratório e de pós-graduação, pela vivência em grupo, pelo auxílio, companheirismo e momentos de descontração ou troca de conhecimentos.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Química, do Instituto de Toxicologia da PUCRS e do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas, pelo incentivo e amizade.

Agradeço por fim à todos os colaboradores por disponibilizarem tempo e recursos para a finalização desse projeto e à CAPES e a PUCRS pela bolsa de estudos que permitiu ser realizada mais essa etapa na minha jornada.

## RESUMO

As propriedades químicas redox-ativas do oligoelemento cobre o tornam cofator essencial para diversos mecanismos celulares como o de produção de ROS. Polifenóis vêm sendo utilizados no mecanismo de ação pró-oxidante de interação com íons Cu (II) endógeno para a produção dessas espécies oxigênio reativas em excesso como tratamento de malignidades, levando a apoptose. O presente trabalho estudou os íons Cu (II) no mecanismo de formação do complexo com Resveratrol em modelo de células MCF-7. Analisamos a seletividade do Resveratrol frente ao íon metálico cúprico utilizando *CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)* e verificou-se a formação do complexo Resveratrol-Cobre por meio de *UV-VIS (Espectrofotometria de Ultra-Violeta Visível)*. Analisou-se a morfologia celular e localização do íon metálico por *MET-EDS (Microscopia de Transmissão Eletrônica com Espectroscopia Dispersiva de Raios-X)*. Morte celular por apoptose e quantificação de ROS na linhagem enriquecida com cobre e tratadas com Resveratrol foi feita por Citometria de Fluxo. Os resultados mostram a seletividade do composto polifenólico pelo íon cobre bem como a formação do complexo Resveratrol-Cobre em condições extracelulares, porém mesmo com a verificação de acúmulo de cobre endógeno, em condições fisiológicas *in vitro* não foi constatada a formação do referido, pois não houve formação de ROS e morte celular conseguinte. Em suma, Nossa pesquisa revela que em condições *in vitro* para a linhagem MCF-7, não há formação de complexo Resveratrol-Cobre como observado quimicamente em quantidades sub-letais de células enriquecidas com CuSO<sub>4</sub> e tratadas com Resveratrol.

**Palavras chave:** cobre, Resveratrol, MCF-7, ROS, apoptose, CLAE, MET-EDS, Citometria de Fluxo.



## ABSTRACT

The redox-active chemical properties of trace element copper make it an essential cofactor for several cellular mechanisms, as for ROS production. Polyphenols have been used in the pro-oxidant mechanism of action of interaction with endogenous Cu (II) ions for the production of reactive oxygen species in excess as a treatment for malignancies, leading to apoptosis. This work studied Cu (II) ions in the complex formation mechanism with Resveratrol in MCF-7 cells model. We analyzed the selectivity of Resveratrol in relation to the cupric metal ion using *HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)* and the formation of the compound Resveratrol-Copper through *UV-VIS (Ultra-Violet Visible Spectrophotometry)*. We analyzed the cellular morphology and location of the metal ion by *MET-EDS (Electronic Transmission microscopy with Dispersive X-ray Spectroscopy)*. Cell death by apoptosis and quantification of ROS in said cell line with copper enrichment and treated with Resveratrol was made by flow cytometry. The results show the selectivity of the polyphenol compound by copper ion as well as the formation of the complex Resveratrol-Copper in extracellular conditions, however even with verification of endogenous copper accumulation in physiological conditions *in vitro*, the formation of that complex did not occur because there was no production of ROS and therefore, no cell death. In short, our research reveals that for *in vitro* conditions for the MCF-7 line, there's no Resveratrol-Copper complex formation as observed in sub-lethal quantities of chemically enriched cells with  $\text{CuSO}_4$  and treated with Resveratrol.

**Keywords:** copper, Resveratrol, MCF-7, ROS, apoptosis, HPLC, TEM-EDS, Flow Cytometry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atox1 – Metalochaperona de Cobre  
APP – Proteína Precursora Amilóide  
ATP7 A – Proteína Transportadora de Cobre Intracelular  
ATP7 B – Proteína Transportadora de Cobre  
AVC – Acidente Vascular Cerebral  
Bax – Proteína X Associada à Bcl-2  
Bcl-2 – Proteína-2 da Leucemia/Linfoma da Célula B  
CCS – Chaperona de Cobre para SOD1  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.  
Cox 17 – Chaperona de Cobre para a Citocromo c Oxidase  
Ctr1 – Transportador de Membrana Integral  
Cu – Íon Cobre  
CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de Cobre  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
EDS –Espectroscopia Dispersiva de Raios-X  
ICP-MS – Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma  
MCF-7 – Linhagem de células de adenocarcinoma de mama - Michigan Cancer Foundation-7  
MT-1 – Metalotioneína Tipo 1  
MT-2 – Metalotioneína Tipo 2  
Murr 1 – Chaperona de Transporte  
NOS – Óxido Nítrico Sintetase  
p21 – Proteína Recombinante Humana  
p53 – Proteína Citoplasmática  
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio  
RESV –Resveratrol  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
SOD – Superóxidos Dismutases  
TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- (a) Reação de Haber-Weiss; (b) Reação de Fenton .....	12
Figura 2- Mecanismo de Exposição de Células Cancerígenas a Espécies de Oxigênio Reativas (ROS).....	14
Figura 3- Estrutura <i>trans</i> - 3, 5,4'-trihidroxiestilbeno, RESV.....	15
Figura 4- Efeitos Anti-tumorais e Mecanismos Moleculares do Resveratrol.....	16
Figura 5- Mecanismo do efeito pró-oxidante do Resveratrol. Formação do Complexo de Peróxido de Cobre com Transferência Eletrônica entre Resveratrol e Oxigênio Molecular.....	18
Figura 6- Reação oxidativa de acoplamento de radicais livres na molécula de Resveratrol.....	20

## SUMÁRIO

<b>4. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Bioquímica do Cobre e Doenças Relacionadas</b> .....	<b>10</b>
1.1.1. Reações enzimáticas .....	10
1.1.2. Transporte Intracelular de Cobre.....	10
1.1.3. Cobre e Câncer .....	11
1.1.4. Bioquímica do Cobre e Espécies Oxigênio Reativas .....	12
<b>1.2 Resveratrol</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 Comportamento pró-oxidante do Resveratrol em presença de íons cobre	17
<b>1.3 Localização do Íon Cobre</b> .....	<b>21</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Objetivos específicos:</b> .....	<b>23</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>31</b>

## 4. INTRODUÇÃO

### 1.1 Bioquímica do Cobre e Doenças Relacionadas

#### 1.1.1. Reações enzimáticas

Cobre é um oligoelemento que desempenha importante papel nas reações bioquímicas regulatórias dos organismos vivos (1). Suas propriedades químicas o tornam cofator essencial para catálise de diversas reações enzimáticas como angiogênese, embriogênese, mecanismos do desenvolvimento, respiração, manutenção e crescimento celular (2, 3, 4).

Numa reação química, no nível molecular, íons de cobre podem auxiliar no mecanismo de reações intracelulares pela sua capacidade estrutural de formação de uma ponte entre uma enzima e um substrato (5). A característica fundamental que permite a participação do cobre nessas e em outras reações celulares, é a possibilidade do íon catalizar transferências eletrônicas no ambiente biológico, tendo alta capacidade redox, sendo encontrado em ambos os estados de oxidação Cu (I) e Cu (II) (4, 5, 6, 7, 8, 9).

No nível celular, proteínas como citocromo c oxidase, superóxido dismutase e lisil oxidase interagem com o cobre. Estas proteínas estão ligadas a complexos mecanismos de detoxificação celular. Por exemplo, o citocromo c oxidase está relacionado diretamente à redução de oxigênio durante respiração aeróbica e as superóxido dismutases (SOD) à eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (10, 11, 12).

#### 1.1.2. Transporte Intracelular de Cobre

$\text{Cu}^+$  é principalmente transportado para o interior da célula eucariota pelo receptor de membrana Ctr1 (13, 14). Além desta proteína, um sistema de metalochaperonas citoplasmáticas também parecem estar envolvidas no transporte intracelular destes íons. Este sistema está constituído por Atox1, CCS (chaperona para Cu e Zn) e Cox17, também como ATPases (ATP7 A e ATP7 B) conhecidas pelo seu papel no transporte de cobre para chaperonas tais como Murr1, metalotioneína (MT-1 e MT-2) e proteína precursora amiloide (APP). Estas últimas

proteínas são finalmente responsáveis pela entrega do íon para as enzimas que metabolizam cobre (15).

Esses sistemas de regulação de transporte intracelular de cobre permitem que exista uma homeostase dos níveis de cobre (16). Uma perturbação nesse balanço, acarreta diversas modificações que podem ser letais para o funcionamento celular. Níveis do íon cobre abaixo do normal ou excessivos geram problemas para a saúde (17, 18). Por exemplo, seu desbalanço pode promover estados patológicos, como a doença de Menkes, que é consequência de uma série de mutações no gene transportador de cobre ATP7 A, responsável pela distribuição de cobre para enzimas dependentes desse metal (6, 19, 20, 21). A doença de Menkes acarreta em características físicas específicas e neurodegeneração cerebelar severa na infância (22).

Por outro lado, altos níveis de cobre também são descritos em doenças como esquizofrenia (23), aterosclerose (24), esclerose lateral amiotrófica familiar (25), síndrome cerebral traumática (26), síndrome de Down (18, 26), AVC agudo (27), Doença de Wilson (uma degeneração hepatolenticular desencadeada por uma desordem autossômica recessiva que permite o acúmulo desse íon em certos órgãos) (28, 29), além de estar relacionado com a progressão do Alzheimer (30, 31) e ainda a processos relacionados ao câncer (4, 7, 8, 11).

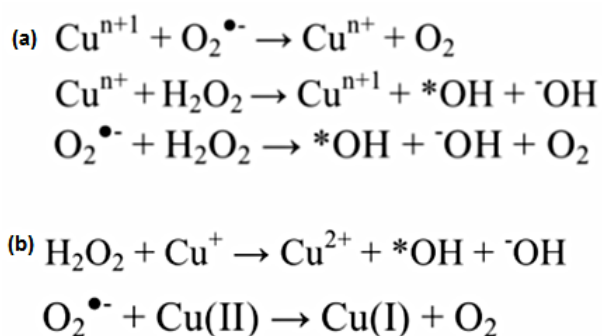
### 1.1.3. Cobre e Câncer

De acordo com Kuo e colaboradores em 2002, os níveis de cobre estão significativamente mais altos nos tecidos e no soro de pacientes com câncer, de modo que é possível perceber, por meio de diversas análises (AAS, ICP-AES), que os níveis deste metal em soro aumentam progressivamente com o avanço da doença (7). Na literatura, o aumento dos níveis dessa coenzima foi amplamente descrito em casos de câncer de mama (8, 29, 30, 31, 32). Além disso, outros estudos em câncer também constataram o aumento dos níveis de ceruloplasmina (alfa-2-globulina), glicoproteína responsável por 95% do transporte de cobre plasmático (36). Esses resultados podem estar relacionados à participação do referido elemento no surgimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) que

podem irrigar e alimentar os tumores, contribuindo para seu crescimento e migração até metastizarem (8, 10, 29, 33, 34).

Assim, agentes quelantes de cobre vêm sendo desenvolvidos e pesquisados como tratamentos alternativos para reduzir as concentrações de cobre quando em excesso, o que diminuiria a progressão dessa doença (11, 30).

Entre os mecanismos moleculares que podem explicar o surgimento de tumores pelo envolvimento de cobre, pode ser mencionada a afinidade do íon cobre por ácidos nucleicos, como o seu acúmulo em regiões heterocromáticas do DNA, que pode levar muitas vezes à iniciação do processo carcinogênico. Não obstante, o fato de que o íon Cu (I) oxida-se ao estado Cu (II) em presença de oxigênio molecular por meio das reações Haber-Weiss e Fenton (Figura 1), demonstra que este também é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. Quando há produção elevada de ROS a integridade celular, via dano de DNA, é comprometida (35, 36).



**Figura 1: (a) Reação de Haber-Weiss; (b) Reação de Fenton.**

#### 1.1.4. Bioquímica do Cobre e Espécies Oxigênio Reativas

Todas as células no organismo possuem espécies químicas oxidantes e antioxidantes, as quais estão em homeostase como mencionado anteriormente. A manutenção desse equilíbrio biológico faz com que haja um funcionamento apropriado da maquinária intracelular (37). A geração de ROS é um processo normal

do metabolismo celular que ocorre em todos os seres vivos, porém pode ser alterada por mudanças no ambiente celular, por exemplo, por infecções ou até pelo uso de medicamentos, podendo levar ao câncer como por mecanismos previamente citados (38, 39). Nas células, ROS pode ser produzido por organelas comuns como as mitocôndrias, peroxissomas e por ativação inflamatória celular (40).

Altos níveis de ROS podem causar danos no DNA e propiciar o surgimento de células neoplásicas e sua subsequente proliferação, além de suprimir o mecanismo de morte celular por apoptose, um mecanismo programado (41). Por outro lado, quando existem níveis excessivos de ROS, eleva-se ainda mais o estresse oxidativo intracelular, ocasionando uma resposta direta de morte celular por apoptose (Figura 2) (42). Esse comportamento adverso acontece, no segundo caso, pela liberação de fatores pró-apoptóticos pela mitocôndria quando exposta a esses níveis exacerbados de espécies oxigênio reativas (42, 43).

Íons cuprosos ou cúpricos estão associados a reações de oxidação e redução, como referido pelas reações associadas de produção de ROS. Enquanto na reação de Fenton (Figura 1b) observamos a decomposição de peróxido, temos o íon cúprico reduzido a íon cuproso, que por sua vez pode catalizar a formação de radicais hidroxila (44).

A geração dessas espécies ainda pode ocorrer por meio de ativação das óxido nítrico sintases (NOS), enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico. Esse mecanismo também gera ROS em sua forma monomérica, ou seja, quando há desacoplamento dessa espécie. A elevação de superóxido ou peroxinitritos, induz ao estresse oxidativo e posterior apoptose como descrito acima (45, 46). Segundo Zhong e colaboradores, em 2014, altas concentrações de íons Cu (II) causam uma diminuição na produção de óxido nítrico, modulando a expressão translacional de NOS, ocasionando desacoplamento e conseqüente elevação de formação de ROS (47).

Associando esse dado com o fato de que células cancerígenas podem estar mais sujeitas à transferência de elétrons entre íons cobre e agentes anticarcinogênicos, como os polifenóis, podemos explorar o mecanismo de iniciação de apoptose, mediante às suplementações adequadas, por meio de produção de ROS, (48, 49). Este tipo de estratégia tem sido estudada como resposta preferencial



à tratamentos para a carcinogênese, por modulação de espécies oxigênio reativas (11, 38).



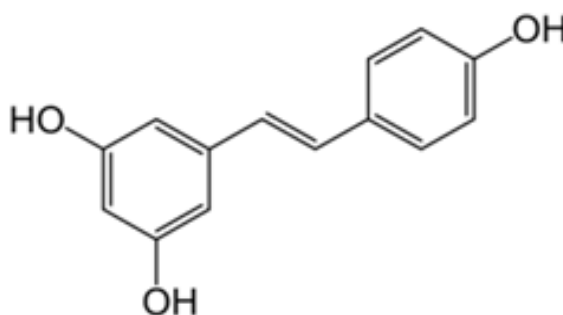
**Figura 2: Mecanismo de Exposição de Células Cancerígenas a Espécies de Oxigênio Reativas (ROS). Adaptado de Fruehalf et al. (42)**

A importância da pesquisa sobre potenciais reguladores e na identificação de alvos para o tratamento da carcinogênese e sua prevenção, vêm crescendo. Dados indicam que proximadamente 35% dos tumores malignos podem ser evitados com o uso de agentes naturais (10, 11). Antioxidantes naturais, como polifenóis de plantas, podem ser utilizados como tratamento na progressão do câncer. Porém sua ação terapêutica permanece inexplicada e pouco fundamentada por mecanismos antioxidantes. São considerados moduladores da apoptose devido às suas habilidades de eliminar radicais livres e ROS (11, 33, 50, 51). Hipótese que corrobora com a mudança do ambiente celular devido ao baixo pH e presença de altos níveis de Cu (33). Esses compostos naturais podem ser preferíveis ao uso de fármacos no tratamento de câncer, pois enquanto os últimos podem oferecer efeitos colaterais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade (52) entre outros, os componentes

suplementares podem não oferecer tantos riscos e não comprometerem células normais durante o tratamento (39).

## 1.2 Resveratrol

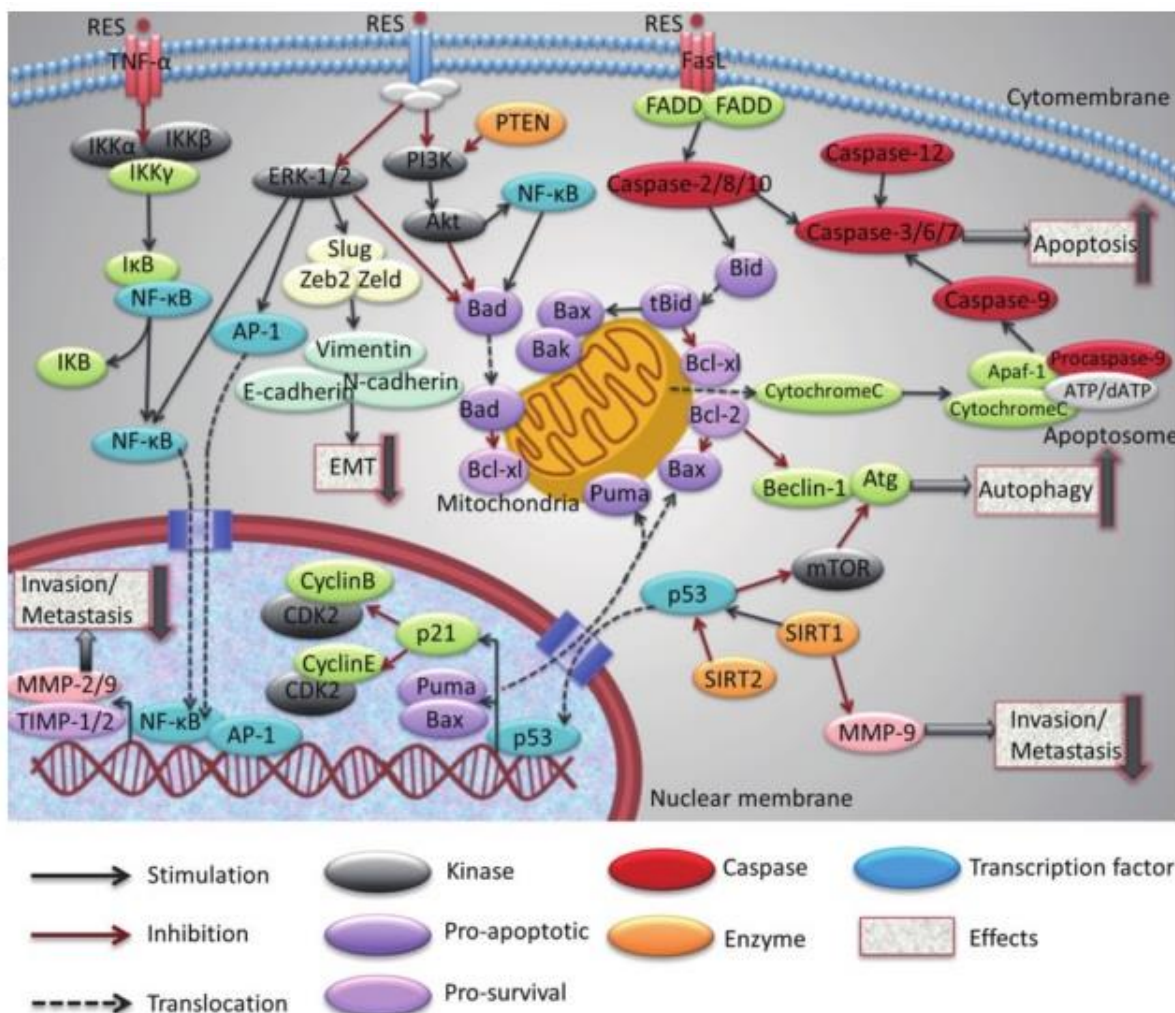
O Resveratrol (3, 5, 4'-*trans*-trihidroxi estilbeno, Resv) (Figura 3), um polifenol encontrado majoritariamente na casca de uvas e em amendoins, possui uma gama de benefícios à saúde. Com atividades antioxidante (53), antiinflamatória (54), anticarcinogênica (55), cardioprotetora (13, 51) e capaz de reduzir índices de glicemia e gordura, entre as principais ações, vem sendo estudado como suplemento no tratamento relacionado a seus efeitos diante processos associados à tumorigênese. Assim como vários polifenóis, ele age tanto inibindo como bloqueando a formação e desenvolvimento de células malignas (56).



**Figura 3: Estrutura 3, 5, 4' -trihidroxiestilbeno, RESV**

Este polifenol, uma fitoalexina de ocorrência natural, vem sendo crescentemente pesquisado em resposta preventiva a diversos efeitos biológicos. Já está descrita sua atividade anticarcinogênica em diversos tipos de cânceres, agindo nos mecanismos intrínsecos p53, p21, Bax/Bcl-2, interferindo no ciclo celular e estimulando a apoptose como resposta, assim como podemos observar no esquema da Figura 4, dentre outras diversas vias de ação descritas como as das caspases, pró-apoptóticas e pró-sobrevivência (41, 57). Resveratrol também reduz a proliferação e a viabilidade celular de forma concentração-dependente em linhagens de câncer de mama MCF-7 (58, 59). Suas características antiproliferativas, anti-

metástase e indutoras de apoptose são de extrema valia durante futuras pesquisas e na descoberta de novos tratamentos contra o câncer (60).



**Figura 4: Efeitos Anti-tumorais e Mecanismos Moleculares do Resveratrol; Han et al. (57)**

O comportamento anti-oxidante de Resveratrol o torna responsável por sua atividade sequestradora de radicais livres gerados na mitocôndria celular por sua forte capacidade de deslocalização eletrônica, devido à sua estrutura molecular (61). Esse comportamento pode ser apontado como responsável pela captura de radicais como  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , gerados anteriormente pelas mesmas reações de Fenton e Haber-Weiss (62, 63, 64).

Além de sua conhecida ação antioxidante, polifenóis como o Resvetratrol, comportam-se de maneiras opostas quando em altas e baixas concentrações e na presença de íons Cu. Nessas condições, os polifenóis podem também adotar uma ação pró-oxidante, que em tratamento de células tumorigênicas, é preferível à ação antioxidante, uma vez que promove a indução da apoptose (39, 48, 51).

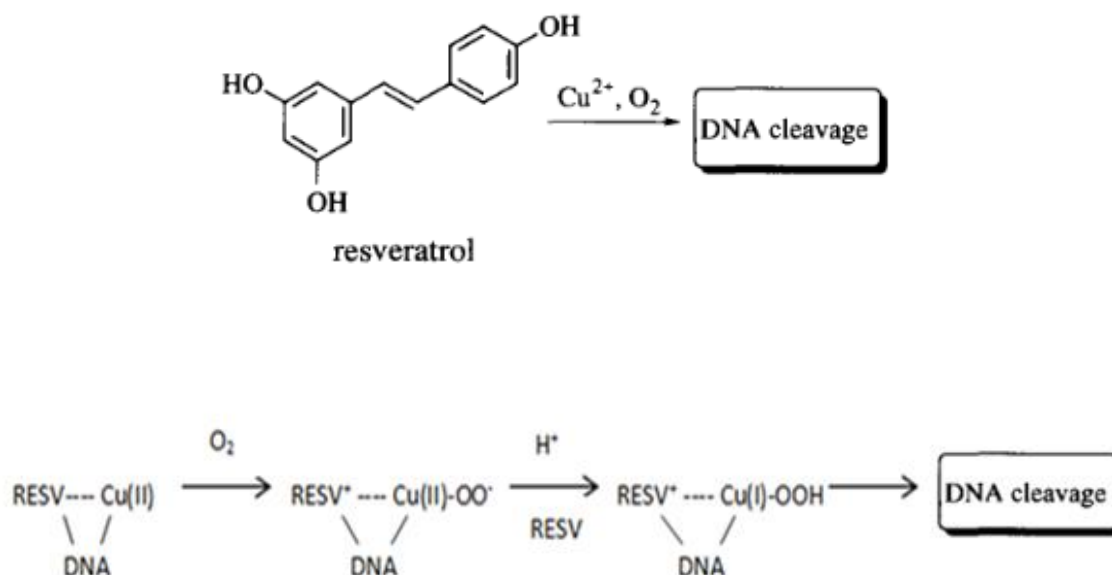
### 1.2.1 Comportamento pró-oxidante do Resveratrol em presença de íons cobre

Para estudar as diferenças entre possíveis ambientes celulares que possam favorecer essa diferença de comportamento do Resv, vem sendo pesquisada a heterogeneidade de íons Cu. Dessa mesma maneira, analisando a concentração de íons Cu e mudanças nos níveis de ROS e RNS, podemos inferir sobre a variação de pH intracelular. Para ser possível a operação de funções celulares importantes, existe uma regulação estrita de pH para mantê-lo entre 6.8 – 7.3. Quando há modificação no pH do sistema em uma célula tumoral, podem ser alteradas funções celulares, proliferativas e, até mesmo, a resistência a ação de algumas moléculas (65).

O pH de células tumorais é ácido (aproximadamente 6.0) (66). O Resveratrol possui um grupamento OH o que a torna mais reativo, facilitando a complexação de Cu (II) para a formação do complexo Resv-Cu (II) (41). Isso parece ocorrer somente em células malignas, devido à diferença de pH entre estas e células benignas, que também possuem cobre ligado à cromatina. Enquanto a conformação da fita de DNA em células normais permite que as bases estejam protegidas de ataques por agentes químicos, essa mesma conformação fica ameaçada em ambientes de pH mais baixos (células malignas), o que permite a exposição de cobre ligado à guanina e posterior ataque (38).

Existem duas maneiras pelas quais Resveratrol pode levar à clivagem do DNA. A primeira delas propõe a não oxidação da molécula de Resveratrol e a outra propõe a geração de espécies Resveratrol oxidadas. O mecanismo proposto por Fukuhara e Miyata (1998) foi desenvolvido a partir de um estudo onde, Resveratrol em presença de concentrações micromolares de Cu (II) ocasionava uma reação onde Resveratrol torna-se capaz de gerar um complexo Resv-Cu, podendo ligar-se efetivamente à fita de DNA e ocasionar danos a mesma. O anel benzênico da

molécula do polifenol não é oxidado no processo, mas ocorre doação de elétrons da molécula de Resveratrol para oxigênio molecular, o que acarreta a formação de peróxido de cobre e por sua consequência, clivagem de DNA (Figura 5) (38, 67).



**Figura 5: Mecanismo do Efeito Pró-Oxidante do Resveratrol. Formação do Complexo de Peróxido de Cobre com Transferência Eletrônica entre Resveratrol e Oxigênio Molecular. Adaptado de Fukuhara et al. (67)**

No segundo mecanismo existente, ocorre a catalisação da reação produtora de ROS, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por meio da ação de Resveratrol em contato com íons Cu (II) localizados internamente na célula. Em presença de íons Cu (II), o polifenol catalisa a redução do íon a Cu (I) e formação de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) via transferência eletrônica intermolecular. Posteriormente, O<sub>2</sub> forma radicais hidroxil que são altamente reativos e induzem danos ao DNA (Reação de Fenton) (38, 67).

De acordo com Tamboli e colaboradores em 2012, o acoplamento oxidativo da molécula de Resveratrol, induzido por ciclagem de íons cobre ainda pode passar por ataque nucleofílico molecular, por formar preferencialmente um radical 4'-O resveratrol. Isso ocorre devido à posição *para* do grupamento ácido OH desse, que por posicionamento em relação de comparação à *meta*, torna-se mais

favorável à formação de radicais pela retirada de um hidrogênio (68, 69, 70). Quando acontece essa reação, forma-se uma espécie intermediária (Figura 6), ela sofre uma reação de acoplamento com radicais livres até produzir formas subsequentes e finalmente o produto dehidrodímero final em questão apontado como  $\delta$ -viniferina (71, 72). Esse mecanismo de ação reacional, em presença de íons cobre, pode ocorrer devido à capacidade pró-oxidante de Resveratrol em presença de íons metálicos. O comportamento pró-oxidante da molécula do polifenol é ativado no momento em que há a formação do radical fenóxido, que após perder um próton, tem esse mesmo próton participando na reação redox do íon cobre. Este, por sua vez, forma ROS que são prejudiciais ao DNA como citado por Ullah, Ahmad, Fukuhara (48, 51, 67).

Compreendendo que o íon cobre apenas reage com radicais proximais para desencadear o processo de clivagem subsequente, a localização do íon metálico se torna foco de importância para esse mecanismo Resv-Cu dependente (38, 48, 51, 57, 58).

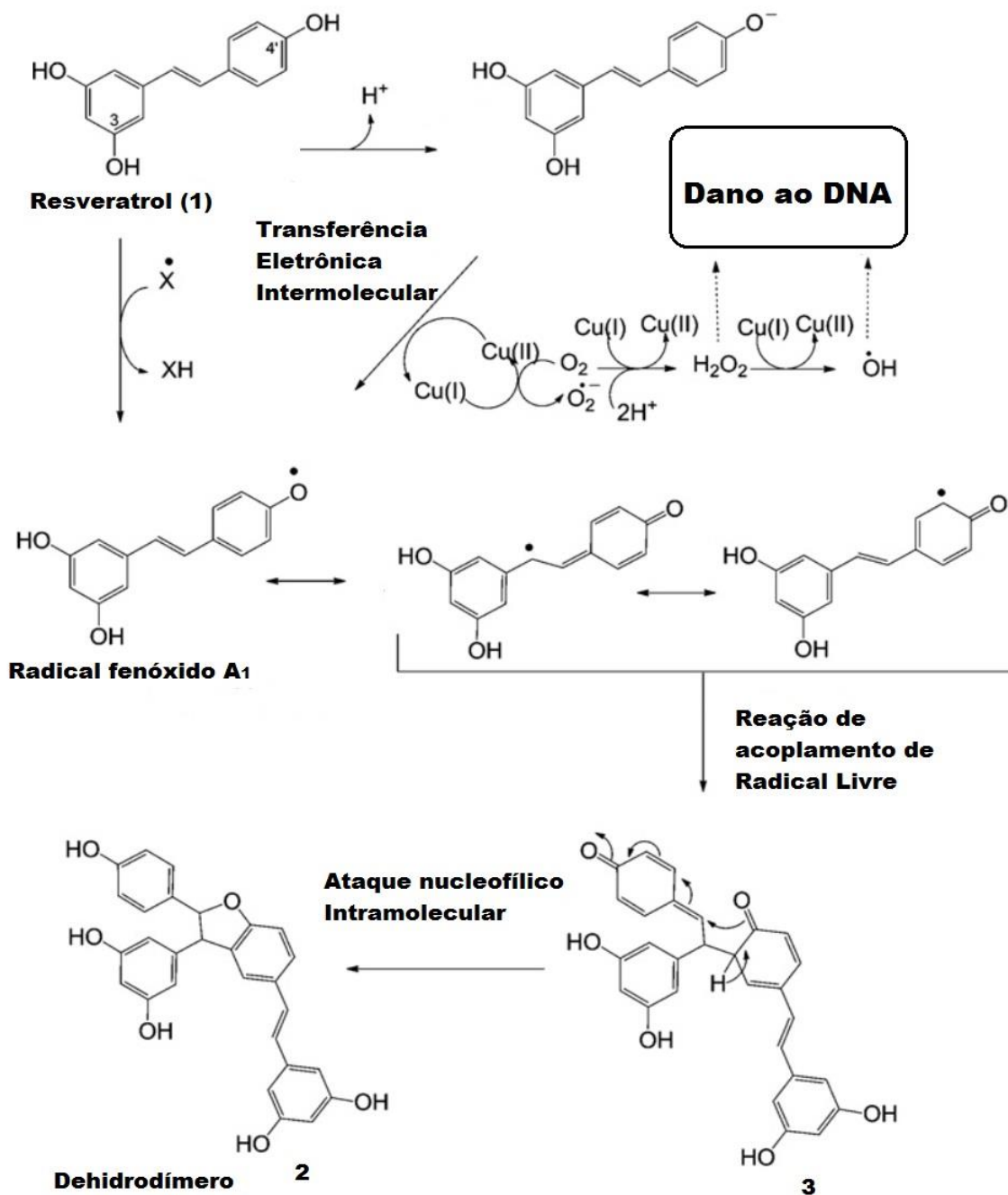


Figura 6: Reação oxidativa de acoplamento de radicais livres na molécula de Resveratrol. Adaptado de Tamboli et al. (72)

### 1.3 Localização do Íon Cobre

O cobre não é distribuído de maneira uniforme para tecidos e células; portanto, a topografia celular de cobre possui papel fundamental para o estudo da condição do seu acúmulo frente a fisiopatologias. Compreender a alteração da concentração e sua topografia pode inferir sobre o desenvolvimento de novos possíveis tratamentos ligados a tal condição (26, 73).

Análises para determinação do íon metálico em tecidos e células geralmente são feitas por histologia e métodos colorimétricos. Porém técnicas químicas analíticas são muito mais precisas. Para estudar Cu intracelular, diversos sensores fluorescentes vêm sendo criados; porém, possuem limitações de método e de sensibilidade (74).

Buscando maior detalhamento para a análise de depósitos de cobre, vem se utilizando TEM (microscopia eletrônica de transmissão), entre outros métodos, para testar distribuição de nanopartículas intracelulares (75, 76, 77, 78, 79). Jang e colaboradores, em 2014, introduziram a técnica de acoplar espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS) a TEM para identificar e quantificar a nanoestrutura e composição granular de depósitos de cobre no modelo para doença de Wilson com extrema precisão quantitativa e resolução espacial elementar de partículas únicas (80, 81).



## 2 JUSTIFICATIVA

Devido ao surgimento de novas estratégias para o tratamento de malignidades com polifenóis entre outros suplementos de dieta, houve um crescente número de pesquisas associadas a estes mecanismos de ação (51).

O Resveratrol, apontado como responsável por resultados positivos para proteção e redução de células tumorigênicas, pode atuar por meio de dois mecanismos distintos. Um desses apoia-se em sua ação prooxidante de mobilização de íons Cu (II) endógeno, a qual caracteriza quebra oxidativa de DNA intranucleossomal via formação de ROS, levando a apoptose, preferível arquétipo de morte celular (38).

Sendo cobre um metal redox-ativo, ele torna-se importante não apenas por fazer parte desse modelo, mas para diversos mecanismos intracelulares relacionados, entre eles desacoplamento de NOS e resultante aumento da produção de ROS, da qual já participa por meio de ciclagem redox. Conseqüentemente, sua quantificação relativa e de níveis de transportadores de cobre bem como sua localização, tornam-se pertinentes para uma verificação aprofundada da ação do Resveratrol (33, 47).

Assim utilizaremos neste projeto microscopia de transmissão eletrônica com espectrometria de energia dispersiva de raios-X (TEM-EDS), um método contemporâneo para identificar alvos e íons moleculares e comparar a ultra estrutura celular de células normais e de câncer de mama, tratadas e não tratadas, com CuSO<sub>4</sub> e Resveratrol e quantificar relativamente íons cobre em uma única célula utilizando EDS em linhagem MCF-7 em relação à ação de Resveratrol.

Este trabalho contribuirá na elucidação do mecanismo de ação do Resveratrol em associação ao cobre frente a células malignas, sendo um passo importante no desenvolvimento de terapias alternativas.

### **3 OBJETIVO GERAL**

- Estudar os íons cobre no mecanismo de formação do complexo com Resveratrol em modelo de células MCF-7;

#### **3.1 Objetivos específicos:**

1. Analisar a seletividade do Resveratrol frente ao íon metálico cúprico utilizando CLAE;
2. Verificar a formação do complexo Resveratrol-Cobre por meio de UV-VIS;
3. Avaliar morte celular por apoptose na linhagem enriquecida com cobre e tratadas com Resveratrol por Citometria de Fluxo;
4. Estudar a morfologia intracelular em linhagem MCF-7 após enriquecimento com íons cobre e tratamento com Resveratrol por digitalização da imagem por MET;
5. Quantificar relativamente o cobre endógeno em uma única célula por EDS em linhagem MCF-7 enriquecidas com diferentes quantidades de cobre e tratadas com Resveratrol;
6. Quantificar cobre total em células MCF-7 enriquecidas com cobre por ICP-MS;
7. Quantificar ROS nas linhagens enriquecidas com cobre e tratadas com Resveratrol;

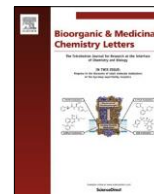
## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

O seguinte artigo está de acordo com as normas da revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, para a qual foi submetido.



Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters



# Antitumor activity of resveratrol is independent of Cu(II) complex formation in MCF-7 cell line



Priscylla Andrade Volkart <sup>a</sup>, Rodrigo Benedetti Gassen <sup>b</sup>, Bettina Mühlen Nogueira <sup>a</sup>, Bárbara Nery Porto <sup>b</sup>, José Eduardo Vargas <sup>b,c,†</sup>, André Arigony Souto <sup>a,†</sup>

<sup>a</sup> Department of Pure Chemistry, School of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Centro INFANT – Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Passo Fundo University (UPF), CEP: 99052-900, Passo Fundo, RS, Brazil

## article info

### Article history:

Received 13 May 2017

Revised 12 June 2017

Accepted 13 June 2017

Available online 15 June 2017

### Keywords:

Copper  
Resveratrol  
MCF-7  
ROS  
Apoptosis

## abstract

Resveratrol (Rsv) is widely reported to possess anticarcinogenic properties in a plethora of cellular and animal models having limited toxicity toward normal cells. In the molecular level, Rsv can act as a suppressive agent for several impaired signaling pathways on cancer cells. However, Fukuhara and Miyata have shown a non-proteic reaction of Rsv, which can act as a prooxidant agent in the presence of copper (Cu), causing cellular oxidative stress accompanied of DNA damage. After this discovery, the complex Rsv-Cu was broadly explored as an antitumor mechanism in multiples tumor cell lines. The aim of the study is to explore the anticarcinogenic behavior of resveratrol–Cu(II) complex in MCF-7 cell line.

Selectivity of Rsv binding to Cu ions was analyzed by HPLC and UV–VIS. The cells were enriched with concentrations of 10 and 50 mM CuSO<sub>4</sub> solution and treated with 25 mM of Rsv. Copper uptake after enrichment of cells, as its intracellular distribution in MCF-7 line, was scanned by ICP-MS and TEM-EDS. Cell death and intracellular ROS production were determined by flow cytometry.

Different from the extracellular model, no relationship of synergy between Rsv–Cu(II) and reactive oxidative species (ROS) production was detected *in vitro*. ICP-MS revealed intracellular copper accumulation to both chosen concentrations (0.33 ± 0.09 and 1.18 ± 0.13 ppb) but there is no promotion of cell death by Rsv–Cu(II) complex. In addition, significant attenuation of ROS production was detected when cells were exposed to CuSO<sub>4</sub> after Rsv treatment, falling from 7.54% of ROS production when treated only with Rsv to 3.07 and 2.72% with CuSO<sub>4</sub>.

Based on these findings antitumor activity of resveratrol when in copper ions presence, is not mediated by Rsv-Cu complex formation in MCF-7 human cell line, suggesting that the antitumoral reaction is dependent of a cancer cellular model.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihydroxy-stilbene, Rsv), a polyphenol mainly found in grapes and peanuts, possesses antioxidant activities,<sup>1</sup> anti-inflammatory,<sup>2</sup> cardioprotective<sup>3</sup> and anticarcinogenic activity,<sup>4</sup> between other benefits for health. When in the presence of copper ions, Rsv can cause damage in DNA, through a mechanism that is still being pursued.<sup>5</sup> Rsv adopts a prooxidant activity, promoting cell death.<sup>6,7</sup> According to our knowledge, high levels of copper were described in cancer cells,<sup>8–10</sup> diverse authors in consensus,

reported apoptosis induction mediated by of Rsv-Cu complex through production of ROS on tumor cells.<sup>11,12</sup> Copper (Cu) is a cellular micronutrient that has the ability of generating reactive oxygen species (ROS), viz., O<sub>2</sub> and HO radicals.<sup>13</sup> Rsv forms a complex with Cu (II), leading to its reduction to Cu (I) with concomitant production of ROS, causing DNA scission.<sup>14</sup> *In vitro*, resveratrol-copper (Rsv-Cu) complex was also shown to be active in biological systems, inactivating bacteriophages<sup>15</sup> and promoting fragmentation of nuclear DNA in human cells.<sup>16</sup> Based on these evidences, we explore this anticarcinogenic behavior in human breast cancer cell line MCF-7.

Our proposal was to demonstrate ROS-dependent apoptosis induced by Rsv-Cu(II) complex formation in this cell line. Initially, we determined the interaction and selectivity of Rsv binding to Cu<sup>2+</sup> ions and formation of a Rsv-Cu metal complex through HPLC

<sup>†</sup> Corresponding authors at: Av. Ipiranga, 6681, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil (J. Eduardo Vargas).

E-mail addresses: priscylla.volkart@acad.pucrs.br (P. Andrade Volkart), rbgassen@gmail.com (R. Benedetti Gassen), bettina.nogueira@acad.pucrs.br (B. Mühlen Nogueira), barbara.porto@pucrs.br (B. Nery Porto), josevargas@upf.br (J. Eduardo Vargas), arigony@pucrs.br (A. Arigony Souto).

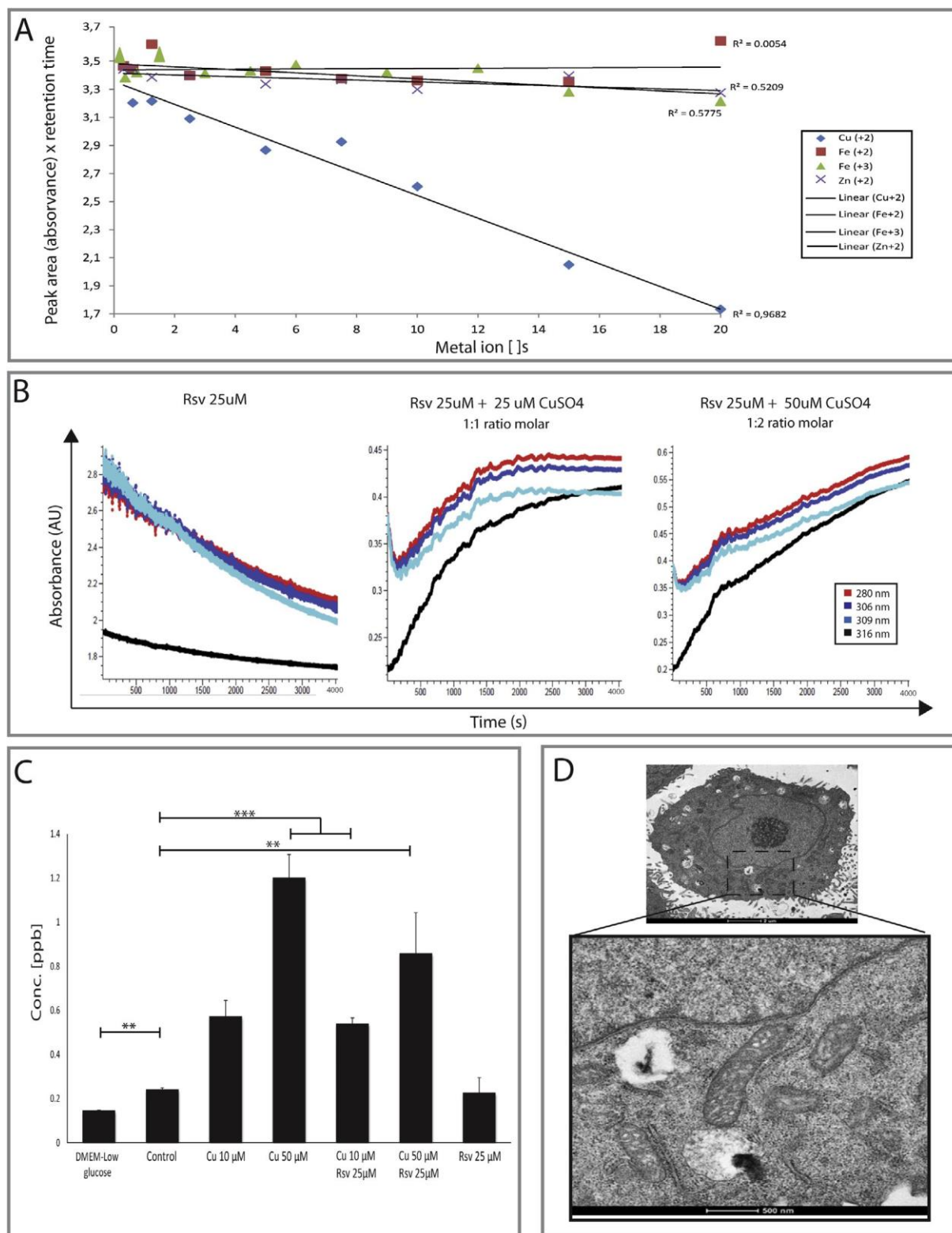


Fig. 1. Rsv selectivity by copper ions and intracellular metal localization. (A) Increasing concentrations of different metal ions/Rsv molar ratios on absorbance versus retention time. (B) Formation of Rsv-Cu(II) complex. (C) Plot of intracellular Cu uptake to MCF-7 cells (24 h incubation). (D) TEM micrographs of a MCF-7 cell treated with 50 mM CuSO<sub>4</sub> for 2 h. Cu appear as electron dense agglomerates inside vesicles (indicated by black arrows). Scale bar = 2 μm. At higher magnification, electron deposits are also seen (white arrows). Scale bar = 500 nm. Elemental profiling of a Cu(II)-treated MCF-7. The high Pt content peak reflects the platinum grid on which the TEM specimen was mounted and the osmium peak is due to the osmium process in the specimen preparation. Bar = 2 μm. Triplicate assays and mean values have been plotted for all analysis. Each data points represent the mean of three independent experiments performed in triplicate ± SD. Pos hoc analysis Student's *t* test was performed. \**p* < 0.5, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

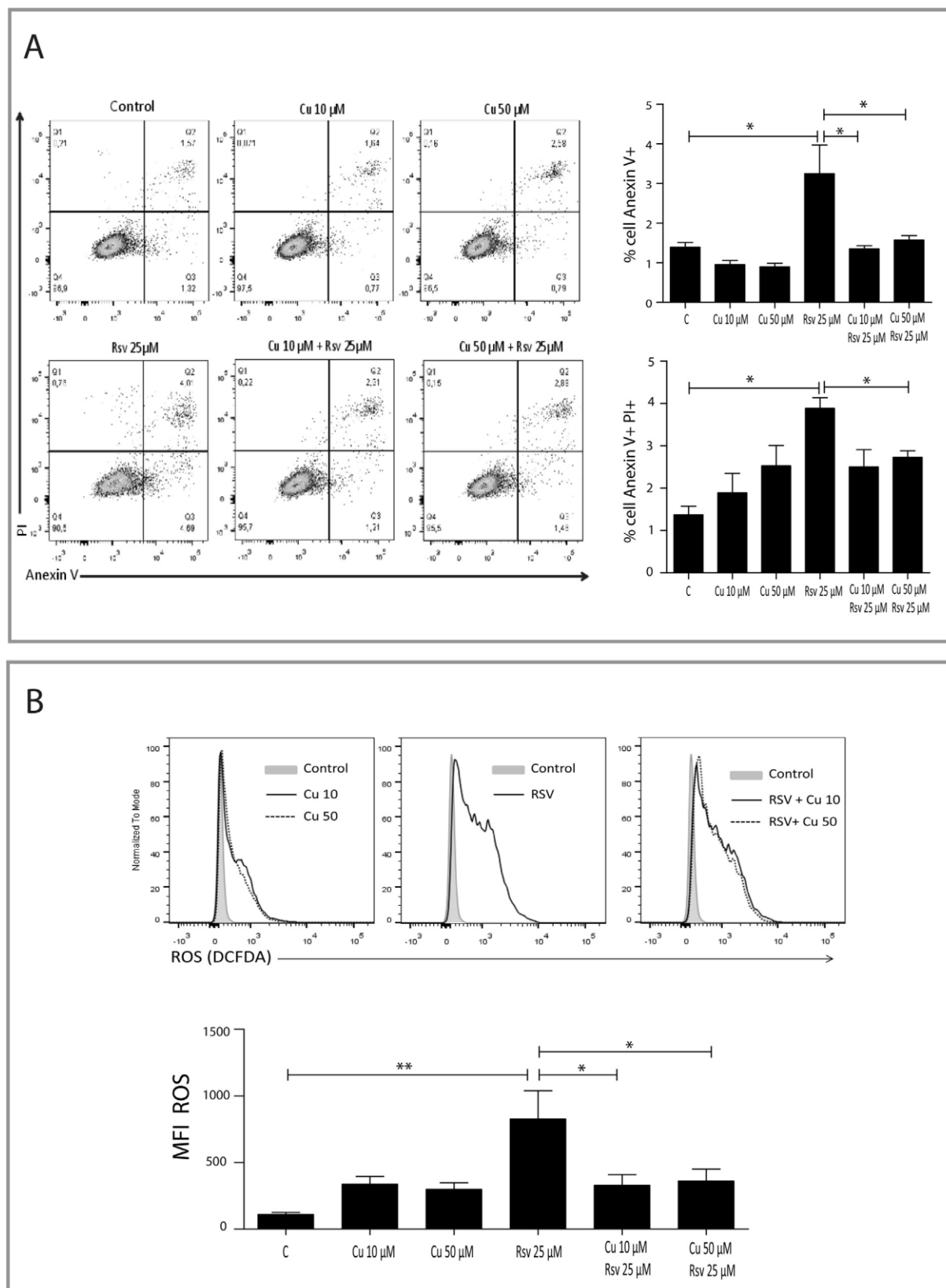


Fig. 2. Cell viability quantification and ROS production mediated by Cu(II) and Rsv treated and untreated MCF-7 cells. (A) Annexin-V/PI apoptosis assay and (B) ROS production analysis upon exposing the cells to different concentrations of Cu(II) with or without Rsv. The periods incubating cells with Cu(II) were of 2 h and 24 h for Rsv. Triplicate assays and mean values have been plotted for all analysis. Each data points represent the mean of three independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. Pos hoc analysis Student's *t* test was performed. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

and UV–VIS extracellular analysis (Fig. 1A).  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{ZnCl}_2$  solutions were prepared by dissolution in ultra-purified water undergoing solubilization in ultrasound for 60 min before each analysis. To analyze the capacity of copper ion binding by Rsv, the analysis in HPLC was done according to Belguendouz et al. (1997).<sup>17</sup> The assay showed a decrease in the absorbance of Rsv molecule when in solution with increasing concentrations of  $\text{CuSO}_4$ . Increasing concentrations of copper solution denote a decrease in peak area from 3.20 ( $\pm 4.41$ ) to 1.73 ( $\pm 0.70$ ) absorbance versus retention time with a linear curve ( $R = 0.9682$ ). The same was not observed for iron and zinc ions that showed no correlation, presenting non-linear curves (Fig. 1A). These results show Rsv affinity to copper ions, agreeing with previous studies by Fukuhara and Miyata (1998).<sup>18</sup> Consequently, Rsv-Cu(II) formation was analyzed by UV–VIS assay performed at  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .<sup>19,20</sup>

Firstly, we analyzed an aqueous solution of 25 mM Rsv alone. This concentration showed a decrease in absorbance at 280, 306, 309, 316 nm wavelengths for 3600 s (Fig. 1B). This data corresponds to isomerization reaction of *trans*-resveratrol to compound *cis*-resveratrol.<sup>21</sup> Later, we prepared mixtures containing different concentrations of  $\text{CuSO}_4$  solution, 1:1 and 2:1 Cu/Rsv, respectively. For the 1:1 ratio of copper/Rsv mixture, we detected an increase in absorbance at all wavelengths; however the same remains fixed after approximately 2500 s analysis until its ending at 3600 s. We also observed in the analysis of the spectra for 1:2 ratio of copper/Rsv mixture an increase of absorbance in all wavelengths until the end of the run. In this sense, 1:1 and 1:2 ratios of Rsv-Cu mixture showed an increase in absorbance in all wavelengths, suggesting a metal complex formation in extracellular environment (Fig. 1B), similar to report by Flieger et al (2017).<sup>22</sup>

In addition, we explored intracellular accumulation of copper in MCF-7 cells through mass spectrometry with plasma (ICP-MS) analysis according to protocol described by Price et al., 2011.<sup>23</sup> MCF-7 cells in exponential growth were seeded in  $3.5 \times 10^6$  cells/well in 6 well plates and enriched with 10 and 50 mM  $\text{CuSO}_4$  for 2 h plus 25 mM Rsv for 24 h.<sup>24</sup> Posterior to treatments, 450 mL of ultrapure concentrated  $\text{HNO}_3$  was added leading to cell digestion. The samples were then heated for 25 min to  $90^\circ\text{C}$  and 1 mL of 1%  $\text{HNO}_3$  (v/v) was added to complete digestion process.<sup>25</sup> Cells absorbed 0.33 ( $\pm 0.09$ ) and 1.18 ( $\pm 0.13$ ) ppb of copper respectively for both concentrations of  $\text{CuSO}_4$  solution (10 and 50  $\mu\text{M}$ ). This analysis suggests intracellular copper accumulation. Cells treated with only Rsv did not present any significant difference in regards to control. Cells enriched with 10 and 50 mM copper solution and treated with 25 mM Rsv, accumulated 0.29 ( $\pm 0.03$ ) and 0.62 ( $\pm 0.23$ ) ppb of intracellular copper respectively (Fig. 1C).

To verify the intracellular region of copper localization *in vitro*, we performed transmission electronic microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy (TEM-EDS) in a single cell. The cells were seeded and treated as described previously. The cell pellets were then fixed with 2.5% glutaraldehyde and 8% paraformaldehyde and post-fixed with osmium tetroxide 2%. After fixation, the samples underwent dehydration with increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 95 and 100%) for 20 min. each. Then, soaked in 100% resin and through ultramicrotomy, cut into thin sections and stained with osmic acid.<sup>26</sup> As seen in Fig. 1D, 0.11% of copper was detected in cell perinuclear region in the sample enriched with 50 mM of  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 1C), according to findings of Qin et al. (2012).<sup>27</sup> Previous studies revealed that cells in response to metal stress undergo cell death.<sup>28,29</sup> For this last step, Annexin-V FITC cell viability assay was performed. Each well had its medium reserved together with the cells. The remaining pellet had a volume of 200 mL of buffer solution added and later 5 mL of Annexin-V FITC and 10 mL of IP on its total suspension, and incubated at room tem-

perature for about 10 min. The information was plotted graphically after analysis.<sup>30</sup> Flow cytometry data were analyzed and interpreted with the aid of FlowJo 10 (TreeStar) program. This assay showed that cells treated with Rsv had an increase of 6.9 ( $\pm 0.4$ )% of early apoptosis correlating to the control of untreated cells. Cells enriched with copper 10 and 50 mM and subsequently treated with Rsv, presented 1.2 ( $\pm 0.8$ ) and 1.4 ( $\pm 0.8$ )% of early apoptosis and 1.1 ( $\pm 0.2$ )% for late apoptosis for both cases (Fig. 2A). However, cells enriched with copper showed no significant decrease in the viability, while cells with Cu and Rsv revealed a decrease in apoptosis promoted by Rsv alone,<sup>31,32</sup> suggesting a protective effect of Rsv against apoptotic death.

By consensus, several authors described an increase of ROS production, when copper and Rsv are combined.<sup>33–35</sup> To confirm this data, we analyzed ROS production by flow cytometry analysis. MCF-7 cells enriched and treated were washed with PBS twice and its pellets received treatment, according to instructions of the kit Image-IT LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit. Cells treated with only 25 mM Rsv produced more ROS than the cells enriched with copper and treated with Rsv, presenting an increase of 7.52 ( $\pm 13$ )% in ROS production (Fig. 2B). Our findings show that copper ions decreased levels of ROS when put together with Rsv. Enriched cells with copper showed no significant decrease in the viability. In contrast, cells with Cu and Rsv revealed a decrease in apoptosis promoted by Rsv alone values found for cells enriched with 10 and 50  $\mu\text{M}$  of  $\text{CuSO}_4$  and treated with Rsv were of 3.07 ( $\pm 16$ )% and 2.72 ( $\pm 13$ )% respectively,<sup>31,32</sup> suggesting a protective effect of Rsv against apoptosis. Two copper concentrations and Rsv are capable of inducing ROS separately as reported by Dos Santos and co-workers (2015).<sup>32</sup>

These results confirm that Rsv and Cu (II) do not have synergistic effect of action in producing ROS or promoting cell death, revealing that there is no formation of Rsv-Cu (II) complex in *in vitro* model for MCF-7 cell line. A putative explanation could be that pH is not adequate for complex formation. The ideal pH is at 7.2 for that extracellular reaction to occur, since malignant cells possess an intracellular pH of approximately 6.0.<sup>18,36</sup>

In addition, the differences with literature data could result from cell line types and culture conditions. In normal cells, Hadi et al. (2010) showed that Rsv together with copper (10–100  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ ) or alone (200  $\mu\text{M}$ ) mediates DNA degradation by complex formation in human peripheral lymphocytes. In tumors, copper is greatly increased in malignancies<sup>37,38</sup> and metal ion distribution is altered.<sup>39</sup> These are variability factors of chemical reactions between copper and Rsv.

Our research shows that for *in vitro* conditions, Rsv-Cu cannot form complex on MCF-7 cell line. This is the first time that the absence of Rsv antitumor mechanism is demonstrated in both chemical and cellular levels, suggesting a putative specificity in complex formation based on cancer cellular model.

Raw data of all experimental procedures can be access in the Supplementary material.

#### Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [grant number 305547/2013-5s].

#### A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.036>.

#### References

1. Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*. 1998;76:270–276.



1. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000;66:663–673.
2. Pena MM, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* 1999;129:1251–1260.
3. Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997;275:218–220.
4. Muqbil I, Beck FW, Bao B, et al. Old wine in a new bottle: the Warburg effect and anticancer mechanisms of resveratrol. *Curr Pharm Des.* 2012;18:1645–1654.
5. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1881–1886.
6. Manson MM. Cancer prevention - the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med.* 2003;9:11–18.
7. Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial. *Cancer Control.* 1999;6:436–458.
8. Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res.* 2002;89:1–11.
9. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:32–46.
10. Zheng LF, Wei QY, Cai YJ, et al. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biol Med.* 2006;41:1807–1816.
11. Ullah MF, Ahmad A, Khan HY, Zubair H, Sarkar FH, Hadi SM. The prooxidant action of dietary antioxidants leading to cellular DNA breakage and anticancer effects: implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67:431–438.
12. Li Y, Kuppusamy P, Zweier JL, Trush MA. ESR evidence for the generation of reactive oxygen species from the copper-mediated oxidation of the benzene metabolite, hydroquinone: role in DNA damage. *Chem Biol Interact.* 1995;94:101–120.
13. Fukuhara K, Nagakawa M, Nakanishi I, et al. Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). *Bioorg Med Chem.* 2006;14:1437–1443.
14. Azmi AS, Bhat SH, Hadi SM. Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: implications for anticancer properties. *FEBS Lett.* 2005;579:3131–3135.
15. Hadi SM, Ullah MF, Azmi AS, et al. Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharm Res.* 2010;27:979–988.
16. Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 1997;53:1347–1355.
17. Fukuhara K, Miyata N. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8:3187–3192.
18. Lamuela-Raventos RM, Romero-Perez A, Waterhouse AL. Direct HPLC analysis of cis and trans resveratrol and piceid isomers in Spanish red Vitis vinifera wine. *J Agric Food Chem.* 1995;43:281–283.
19. Tamboli VF, Re N, Coletti C, Defant A, Mancini I, Tosi P. A joint experimental and theoretical investigation on the oxidative coupling of resveratrol induced by copper and iron ions. *Int J Mass Spectrom.* 2012;319–320:55–63.
20. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003;189:147–163.
21. Flieger J, Tatarczak-Michalewska M, Blicharska E, Swieboda R, Banach T. HPLC identification of copper (II)-trans-resveratrol complexes in ethanolic aqueous solution. *J Chromatogr Sci.* 2017;55:445–450.
22. Price KA, Crouch PJ, Volitakis I, et al. Mechanisms controlling the cellular accumulation of copper bis(thiosemicarbazonato) complexes. *Inorg Chem.* 2011;50:9594–9605.
23. Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:351–361.
24. Ghezzi A, Aceto M, Cassino C, Gabano E, Osella D. Uptake of antitumor platinum (II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *J Inorg Biochem.* 2004;98:73–78.
25. Scimeca M, Orlandi A, Terrenato I, Bischetti S, Bonanno E. Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis. *Eur J Histochem.* 2014;58:2403.
26. Qin Z, Lai B, Landero J, Caruso JA. Coupling transmission electron microscopy with synchrotron radiation X-ray fluorescence microscopy to image vascular copper. *J Synchrotron Radiat.* 2012;19:1043–1049.
27. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 2008;82:493–512.
28. Rahman MM, Ukiana J, Uson-Lopez R, Sikder MT, Saito T, Kurasaki M. Cytotoxic effects of cadmium and zinc co-exposure in PC12 cells and the underlying mechanism. *Chem Biol Interact.* 2017;269:41–49.
29. Vallverdu-Queralt A, Regueiro J, Rinaldi de Alvarenga JF, Torrado X, Lamuela-Raventos RM. Home cooking and phenolics: effect of thermal treatment and addition of extra virgin olive oil on the phenolic profile of tomato sauces. *J Agric Food Chem.* 2014;62:3314–3320.
30. Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381:253–263.
31. dos Santos NV, Matias AC, Higa GS, Kihara AH, Cerchiaro G. Copper uptake in mammary epithelial cells activates cyclins and triggers antioxidant response. *Oxid Med Cell Longevity.* 2015;2015:162876.
32. Win W, Cao Z, Peng X, Trush MA, Li Y. Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro. *Mutat Res.* 2002;513:113–120.
33. Qian YP, Cai YJ, Fan GJ, et al. Antioxidant-based lead discovery for cancer chemoprevention: the case of resveratrol. *J Med Chem.* 2009;52:1963–1974.
34. Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM. Oral administration of copper to rats leads to increased lymphocyte cellular DNA degradation by dietary polyphenols: implications for a cancer preventive mechanism. *Biomaterials.* 2011;24:1169–1178.
35. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4:891–899.
36. Yoshida D, Ikeda Y, Nakazawa S. Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selected human brain tumors. *J Neuro-Oncol.* 1993;16:109–115.
37. Nasulewicz A, Mazur A, Opolski A. Role of copper in tumour angiogenesis – clinical implications. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18:1–8.
38. Apelgot S, Coppey J, Fromentin A, Guille E, Poupon MF, Roussel A. Altered distribution of copper (64Cu) in tumor-bearing mice and rats. *Anticancer Res.* 1986;6:159–164.



## 6. CONCLUSÃO

Nossa pesquisa revela que em condições *in vitro* para a linhagem MCF-7, não há formação de complexo Resv-Cu, como observado quimicamente em quantidades sub-letais de células enriquecidas com CuSO<sub>4</sub> e tratadas com Resveratrol.

Em condições extracelulares, Resveratrol forma o complexo com cobre como verificou-se por CLAE. Também verificamos acúmulo de cobre em células após enriquecimento com cobre. Entretanto, a não produção de níveis elevados de ROS, nem a morte celular significativa frente ao enriquecimento com cobre e subsequente tratamento com Resveratrol, prova que não houve formação de complexo em ambiente intracelular. É a primeira vez que se comprova esse resultado *in vitro* para a linhagem MCF-7.

São necessários mais estudos para verificar os sub-produtos de Resveratrol em outras rotas bioquímicas para que seja comprovado o mecanismo de ação pró-oxidante do Resveratrol.

## REFERÊNCIAS

1. De Robertis, E. M. F., Hib, J. Bases da biologia celular e molecular. Tradução por Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade; Sérgio Ferreira de Oliveira; Telma Maria Tenório Zorn. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
2. Linder, M. C., Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797–811.
3. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 8(2), 89–193.
4. Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M., & Dameron, C. T. (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci*, 25(1), 29-32.
5. Tortora, G.R. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
6. Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
7. Kuo, H. W., Chen, S. F., Wu, C. C., Chen, D. R., Lee, J. H. (2002). Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biological Trace Element Research*, 89(1), 1–11.
8. Ames, B. N., Gold, L. S., Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5258–5265.
9. Daniel, K. G., Harbach, R. H., Guida, W. C., Dou, Q. P. (2004). Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. *Frontiers in Bioscience*, 9, 2652–2662.
10. Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(9), 386–398.
11. Gupte, A., Mumper, R. J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 32–46.
12. Suntharalingam, K., Awuah, S. G., Bruno, P. M., Johnstone, T. C., Wang, F., Lin, W., Zheng, Y. R., Page, J. E., Hemann M. T., Lippard, S. J. (2015).

- Necroptosis-inducing rhenium (V) oxo complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 137(8), 2967–2974.
13. Pena, M. M., Lee, J. Thiele, D. J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129(7), 1251–1260.
  14. Petris, M. J., Smith, K., Lee, J. Thiele, D. J. (2003). Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J. Biol. Chem.* 278(11), 9639–9646.
  15. Mercer, J. F. B. (2000). The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 7(2), 64–69.
  16. Harris, E. D. (1991). Copper transport: an overview *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196, 130-140.
  17. Chevion M. (1988). Site-specific mechanism for free radical induced biological damage. The essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med* 5(1), 27–37.
  18. Meguid, N. A., Dardir, A. A., El-Sayed, E. M., Ahmed, H. H., Hashish, A. F., Ezzat, A. (2010). Homocysteine and oxidative stress in Egyptian children with Down syndrome. *Clin. Biochem.* 43(12), 963–967.
  19. Goodyer I. D., Jones E. E., Monaco A. P., Francis M. J. (1999). Characterization of the Menkes protein copper binding domains and their role in copper-induced protein re-localization. *Hum Mol Genet* 8(8), 1473–1478.
  20. Kaler S. G. (1994). Menkes disease. *Adv Pediatr* 441, 263–304.
  21. Tisato F., Marzano C., Porchia, M., Pellei, M., Santini, C. (2010). Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med. Research Reviews* 30(4), 708-749.
  22. Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B., Gitlin, J. D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiology of Disease*, 6(4), 221–230.
  23. Pfeiffer, C. C. (1975). *Mental and Elemental Nutrients*. Keats Publishing, 396-421.
  24. Easter R., Qilin C., Lai B., Ritman E., Caruso J., Zhenyu Q. (2010). Vascular metallomics: copper in the vasculature. *Vasc. Med.* 15(1), 61–69.
  25. Seetharaman, S. V, Prudencio, M., Karch, C., Holloway, S. P., Borchelt, D. R., Hart, P. J. (2010). Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial

- amyotrophic lateral sclerosis. NIH Public Access. *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), 1140–1154.
26. Qin, Z., Lai, B., Landero, J., Caruso, J. A. (2012). Coupling transmission electron microscopy with synchrotron radiation X-ray fluorescence microscopy to image vascular copper. *Journal of Synchrotron Radiation*, 19(6), 1043–1049.
27. Altamura, C., Squitti, R., Pasqualetti, P., Gaudino, C., Palazzo, P., Tibuzzi, F., Lupoi, D., Cortesi, M., Rossini, P. M., Vernieri, F. (2009). Ceruloplasmin/Transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke J. Cerebr. Circ.* 40(4), 1282–1288.
28. Cerpa, W., Varela-nallar, L., Reyes, A. E., Minniti, A. N., Inestrosa, N. C. (2005). Is there a role for copper in neurodegenerative diseases?, 26(4-5), 405–420.
29. Linder, M. C., Moor, J. R., Wright, K. (1981). Ceruloplasmin assays in diagnosis and treatment of human lung, breast, and gastrointestinal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 67(2), 263–275.
30. Brem, S. (1999). Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial, 6(5), 436–458.
31. Kaiafa, G. D., Saouli, Z., Diamantidis, M. D., Kontoninas, Z., Voulgaridou, V., Raptaki, M., Arampatzi, S., Chatzidimitriou, M., Perifanis, V. (2012). Copper levels in patients with hematological malignancies. *Eur. J. Intern. Med*, 23(8), 738–741.
32. Das, D., Tapryal, N., Goswami, S. K., Fox, P. L., Mukhopadhyay, C. K. (2007). Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *The Biochemical Journal*, 402(1), 135–141.
33. Khan, H. Y., Zubair, H., Faisal, M., Ullah, M. F., Farhan, M., Sarkar, F. H., Ahmad, A., Hadi, S. M. (2014). Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: a mechanism for cancer chemopreventive action. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(3), 437–46.

34. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
35. Agarwal, K., Sharma, A., Talukder, G. (1989). Effects of copper on mammalian cell components. *Chert-biol. Interactions*, 69(1), 1-16.
36. Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
37. Poli, G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarpotto E. (2004). Oxidative stress and cell signaling. *Curr. Med. Chem.*, 11 (2004) 1163–1182.
38. Muqbil, I., W.J. Beck, F., Bao, B., H. Sarkar, F., M. Mohammad, R., M., Hadi, S. M., Azmi, A. S. (2012). Old Wine in a New Bottle: The Warburg Effect and Anticancer Mechanisms of Resveratrol. *Current Pharmaceutical Design*, 18(12), 1645–1654.
39. Manson, M. M. (2003). Cancer Prevention - The Potential For Diet To Modulate Molecular Signalling. *Trends In Molecular Medicine*, 9(1), 11–18.
40. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 239-267.
41. Sun, S.-Y., Hail, N., Lotan, R. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(9), 662–672.
42. Huffman, D. L., O'Halloran, T. V. (2001). Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem*, 70, 677–701.
43. Fruehauf J. P., Meyskens F.L. (2007). Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin Cancer Res*, 13(3), 789–94.
44. Seog, J. H., Kong, B., Kim, D., Graham, L. M., Choi, J. S., Lee, S. B. (2015). Short-term effects of ultrahigh concentration cationic silica nanoparticles on cell internalization, cytotoxicity, and cell integrity with human breast cancer cell line (MCF-7). *Journal of Nanoparticle Research*, 17(1), 6.
45. Lloyd, R. V., Hanna, P. M., Mason, R. P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5), 885–888.
46. Pignitter M., Gorren A. C. F., Nedeianu S., Schmidt, K., Mayer, B. (2006). Inefficient spin trapping of superoxide in the presence of nitric-oxide: implications for studies on nitric-oxide synthase uncoupling. *Free Radic Biol Med.*, 41(3), 455–463.

47. Rochette L, Lorin J, Zeller, M., Guillard, J. C., Lorgis, L., Cottin, Y., Vergely, C. (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*, 140(3), 239–257.
48. Zhong, L., Wang, L., Xu, L., Liu, Q., Jiang, L., Zhi, Y., Lu, W., Zhou, P. (2014). The role of NOS-mediated ROS accumulation in an early phase Cu-induced acute cytotoxicity in MCF-7 cells. *BioMetals*, 28(1), 113–122.
49. Ullah, M. F, Ahmad, A., Khan, H. Y., Zubair, H., Sarkar, F. H., Hadi, S. M. (2013). The Prooxidant Action of Dietary Antioxidants Leading to Cellular DNA Breakage and Anticancer Effects: Implications for Chemotherapeutic Action Against Cancer. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67(2), 431-438.
50. Zheng, L. F., Wei, Q. Y., Cai, Y. J., Fang, J. G., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z. L. (2006). DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogs in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1807–1816.
51. Mccullough, M. L., Giovannucci, E. L. (2004). Diet And Cancer Prevention. *Oncogene*, 23(38), 6349–6364.
52. Ahmad, N., Feyes, D. K., Niemen, A. L., Argawal, R., Mukhtar, H. (1881). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal Of The National Cancer Institute*, 89(24), 1881–1886.
53. Zhang, C. X., Lippard, S. J. (2003). New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 7(4), 481–489.
54. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
55. Fremont, L. (2000). Minireview - Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663-673.
56. Jang, M. S., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.
57. Baur, J. A., Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506.

58. Han, G., Xia, J., Gao, J., Inagaki, Y., Tang, W., Kokudo, N. (2015). Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 9(1), 1–12.
59. Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., Alvarez-Rios, E., Garcia-Mena, J., Gariglio, P. (2012). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(1), 11–20.
60. Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Shamim, U., Ullah, M. F. (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 370–376.
61. Shukla Y, Singh R. (2011). Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 121(5), 1-8.
62. Alarcón de la Lastra, C., Villegas, I., Martín, A. R. (2006). Resveratrol in Health and Disease (Aggarwald, B.B, and Shishodia, S., eds), 33–55, CRC Press, Boca Raton.
63. Leonard, S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 309(4), 1017–1026.
64. Losa, G.A. (2003). Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Clin. Invest*, 33(9), 818–823.
65. Martínez, J., Moreno, J. J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol*, 59(7), 865–870.
66. Damaghi, M., Wojtkowiak, J. W., Gillies R. J. (2013). pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.*, 4, 370.
67. Gatenby, R. A., Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer*, 4(11), 891–899.
68. Fukuhara, K., & Miyata, N. (1998). Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorg Med Chem Lett.*, 8(22), 3187–3192

69. Mikulski, D., Górnjak, R., Molski, M. (2010). A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(3), 1015–1027.
70. Queiroz, A. N., Gomes, B. A. Q., Moraes, W. M., Borges, R. S. (2009). A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 1644–1649.
71. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916–4922.
72. Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K., Viret, O. (2003). Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5488–5492.
73. Tamboli, V. F., Re, N., Coletti, C., Defant, A., Mancini, I., Tosi, P. (2012). A joint experimental and theoretical investigation on the oxidative coupling of resveratrol induced by copper and iron ions. *International Journal of Mass Spectrometry*, 319–320, 55–63.
74. Gaetke, L. M., Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147–163.
75. Ciesiński, K. L., Hyman, L. M., Derisavifard, S., Franz, K. J. (2010). Toward the detection of cellular copper(II) by a light-activated fluorescence increase. *Inorganic Chemistry*, 49(15), 6808–6810.
76. Harry, J., Tripathi, R. (1970). Kayser-Fleischer ring. A pathological study. *Br. J. Oph- thalmol.*, 54(12), 794-800.
77. Johnson, R.E., Campbell, R.J. (1982). Wilson's disease. Electron microscopic, X-ray energy spectroscopic, and atomic absorption spectroscopic studies of corneal copper deposition and distribution. *Lab. Investig.*, 46(6), 564-569.
78. Tousimis, A., Adler, I. (1962). Electron probe X-ray microanalyzer study of copper within Descemet's membrane of Wilson's disease. *J. Histochem. Cytochem.* 11, 40-47.
79. Uzman, L. L., Jakus, M. A. (1957). The Kayser-Fleischer ring; a histochemical and electron microscope study. *Neurology* 7(5), 341-355.



80. Brenner C, Grimm S. (2006). The permeability transition pore comple cancer cell death. *Oncogene*, 25(34), 4744-4756.
81. Jang, H. J., Kim, J. M., Choi, C. Y. (2014). Elemental analysis of sunflower cataract in Wilson's disease: A study using scanning transmission electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. *Experimental Eye Research*, 121, 58–65.
82. Scimeca, M., Orlandi, A., Terrenato, I., Bischetti, S., Bonanno, E. (2014). Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis. *European Journal of Histochemistry*, 58(3), 233-238.
83. Belguendouz, L., Fremont, L., Linard, A. (1997). Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*, 53(9), 1347–1355.
84. Lamuela-Raventos, R.M., Romero-Perez, A., Waterhouse, A. L. (1993). Direct HPLC analysis of cis and trans resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 281-283.
85. Price, K. A., Crouch, P. J., Volitakis, I., Paterson, B. M., Lim, S., Donnelly, P. S., White, A. R. (2011). Mechanisms controlling the cellular accumulation of copper bis (thiosemicarbazonato) complexes. *Inorganic Chemistry*, 50(19), 9594–9605.
86. Ostrakhovitch, E. A., Cherian, M. G. (2004). Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423(2), 351–361.
87. Ghezzi, A., Aceto, M., Cassino, C., Gabano, E., Osella, D. (2004). Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(1), 73–78.
88. Tor, Y. S., Yazan, L. S., Foo, J. B., Armania, N., Cheah, Y. K., Abdullah, R., Imam, M. U., Ismail, N., Ismail, M. (2014). Induction of apoptosis through oxidative stress-related pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 55-67.

89. Vargas, J. E., Filippi-Chiela, E. C., Suhre, T., Kipper, F. C., Bonatto, D., Lenz, G. (2014). Inhibition of HDAC increases the senescence induced by natural polyphenols in glioma cells. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 92(4), 297–304.
90. Figueiras, T. S., Neves-Petersen, M. T., Petersen, S. B. (2011). Activation energy of light induced isomerization of resveratrol. *Journal of Fluorescence*, 21(5), 1897–1906.
91. Visagie, M. H., Birkholtz, L.-M. M., Joubert, A. M. (2014). 17-Beta-Estradiol Analog Inhibits Cell Proliferation By Induction of Apoptosis in Breast Cell Lines. *Microscopy Research and Technique*, 77(3), 236–42.
92. Burkitt, M. J., Duncan, J. (2000). Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 381(2), 253–263.
93. Dos Santos, N. V., Matias, A. C., Higa, G. S. V., Kihara, A. H., & Cerchiaro, G. (2015). Copper Uptake in Mammary Epithelial Cells Activates Cyclins and Triggers Antioxidant Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-11.
94. Takashina, M., Inoue, S., Tomihara, K., Tomita, K., Hattori, K., Zhao, Q.-L., Suzuki, T., Noguchi, M., Ohashi, W., Hattori, Y. (2017). Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 50(3), 787–797.
95. Hadi, S. M., Ullah, M. F., Azmi, A. S., Ahmad, A., Uzma, S., Zubair, H., Khan, H. (2017). Resveratrol Mobilizes Endogenous Copper in Human Peripheral Lymphocytes Leading to Oxidative DNA Breakage: A Putative Mechanism for Chemoprevention of Cancer. *Pharmaceutical Research*, 27(6), 979-988