

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

## **CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

TESI DI LAUREA

**SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ  
ANTITUMORALE IN VITRO DI COMPLESSI DI RAME CON LEGANTE  
N-METIL, S-METIL DITIOCARBAZATO**

RELATORE: Chiar.ma Prof.ssa Valentina Gandin

CORRELATORI: Dott.ssa Cristina Bolzati

Dott. Michele De Franco

LAUREANDA: Nadia Cimarolli

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
1.1 COMPLESSI METALLICI IN MEDICINA	3
1.2 COMPLESSI METALLICI COME AGENTI ANTITUMORALI: IL CIS-PLATINO	6
1.2.1 Generalità ed origine del cis-platino	6
1.2.2 Meccanismo d'azione del cis-platino	8
1.2.3 Limiti del trattamento con cis-platino	11
1.2.4 Sviluppo di farmacoresistenza al cis-platino	12
1.3 IL RAME	14
1.3.1 Chimica di coordinazione del rame	16
1.3.2 Omeostasi del rame	19
1.3.3 Rame e patologie associate	23
1.4 COMPLESSI DI RAME COME AGENTI ANTITUMORALI	25
1.4.1 Il ruolo del rame nelle neoplasie	25
1.4.2 Sviluppo di complessi di rame	27
1.5 COMPLESSI DI RAME CON LEGANTE DITIOCARBAZATO	29
1.5.1 Chimica dei ditiocarbazati	29
1.5.2 Complessi metallici derivati dal ditiocarbazato	32
1.5.3 Attività biologica	33
1.6 MECCANISMO D'AZIONE DEI COMPLESSI DITIOCARBAZONICI DI RAME	34
1.6.1 Inibizione dell'attività del proteasoma	35
1.6.2 Complessi di rame come inibitori della Topoisomerasi I, II	38
1.6.3 Variazione dell'equilibrio redox indotto da complessi metallici	39
<b>2. OBIETTIVO DELLA TESI</b>	<b>42</b>
<b>3. PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>45</b>
3.1 MATERIALI, STRUMENTAZIONI E METODI	45
3.2 SINTESI DEI COMPLESSI DI Cu(II)	46
3.2.1 Complesso $[\text{CuCl}_2(\text{DTCZ})]$ (Cu1)	46
3.2.2 Complesso $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (Cu2)	48
3.2.3 Complesso $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{SO}_4]$ (Cu3)	50
3.3 STUDIO DI STABILITÀ	52
3.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA: MATERIALI E METODI	58
3.4.1 Reagenti	58
3.4.2 Linee cellulari e condizioni di crescita	58
3.5 TEST DI VITALITÀ CELLULARE	61
3.5.1 APH test su colture cellulari 3D	61
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>63</b>
4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO $[\text{CuCl}_2(\text{DTCZ})]$ (Cu1)	63
4.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (Cu2)	67
4.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2]\text{SO}_4$ (Cu3)	69
4.4 STUDIO DI STABILITÀ	71
4.5 TEST DI VITALITÀ CELLULARE	73
4.5.1 APH test su colture cellulari tridimensionali	73

4.5.2 Studi di resistenza crociata	75
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>77</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 COMPLESSI METALLICI IN MEDICINA

Molti metalli sono elementi essenziali per lo svolgimento di funzioni indispensabili in diversi processi biochimici negli organismi viventi (Orvig and Abrams 1999). Ferro, rame, zinco, magnesio e selenio sono definiti, infatti, metalli essenziali in quanto fisiologicamente presenti in tracce nell'organismo vivente in cui: partecipano alle reazioni enzimatiche, si comportano da donatori o accettori di elettroni nelle reazioni redox utili per il metabolismo energetico, o in cui hanno un ruolo strutturale garantendo la stabilità di molte molecole (Al-Fartusie and Mohssan 2017).

Svolgono quindi un'ampia varietà di compiti. Un esempio ci viene fornito dal ferro impegnato all'interno dell'emoglobina nel trasportare l'ossigeno in tutto il corpo; oppure dallo zinco che contribuisce alla struttura delle proteine *zinc finger*, che regolano la funzione dei geni all'interno del nucleo cellulare. Inoltre, lo zinco facilita la formazione e la stabilizzazione degli esameri di insulina, ormone fondamentale per la regolazione del metabolismo glucidico. Anche minerali contenenti calcio sono importanti in quanto elementi base costituenti le ossa (Orvig and Abrams 1999).

Al momento, l'utilizzo dei metalli essenziali spazia tra agenti diagnostici e/o terapeutici per studiare o trattare varie patologie e disordini metabolici. Quelli maggiormente impiegati a questi scopi sono quelli utili per la vita ovvero: rame, zinco e manganese, ma anche altri il cui ruolo è duplice, come selenio, oppure dannosi come il molibdeno (Thompson and Orvig 2003).

La caratteristica che permette di utilizzarli in tal senso, risiede nella loro capacità di perdere facilmente elettroni dallo stato elementare, detto anche 'stato metallico', dando origine a ioni carichi positivamente, solubili nei fluidi biologici. È proprio in tale forma che sono in grado di interagire con le molecole biologiche, come proteine e DNA (Frezza et al. 2010).

Molti di questi metalli vengono oggi utilizzati nella pratica clinica, anche se la loro attività era nota già nell'antichità, quando venivano usati a scopo medico già oltre 5000 anni fa da diverse popolazioni. Nel 3000 a.C. gli Egizi usavano il rame per sterilizzare l'acqua; in Arabia e in Cina 3500 anni fa veniva usato l'oro in diversi medicinali. L'oro fu poi utilizzato, durante il Medioevo sotto forma di elisir per il trattamento della perdita del così detto 'spirito vitale', ovvero per stati malinconici o debolezza. Mentre, nel 400 a.C. il medico greco Ippocrate introdusse l'uso del mercurio che in epoca rinascimentale venne usato, sotto forma di sale ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ), come diuretico (Orvig and Abrams 1999).

A partire dal '900 il possibile utilizzo dei composti inorganici e lo studio dell'attività farmacologica iniziò ad espandersi.

Nel 1912 Paul Ehrlich sviluppò un composto organometallico a base di arsenico con attività antimicrobica, noto come Salvarsan, adottato per il trattamento della sifilide. Nello stesso periodo si diffusero farmaci a base di antimonio per il trattamento di leishmaniosi cutanea e mucocutanea. Allo stesso modo, la sulfadiazina d'argento veniva e viene tutt'oggi adottata per prevenire e curare le infezioni derivanti da ustioni di secondo o terzo grado sottoforma di crema o soluzione acquosa (Mjos and Orvig 2014).

Agli inizi del ventesimo secolo fu individuata e sfruttata l'attività battericida del cianuro di oro contro il batterio causante la tubercolosi e successivamente nel 1930 il medico francese Forestier fu il primo ad usare i complessi tiolati a base di oro per trattare l'artrite reumatoide (Kostova 2006).

Un'altra rilevante applicazione è stata svolta dai composti di bismuto indicati per il trattamento di patologie a livello gastrointestinali grazie alla loro attività antimicrobica contro il batterio *Helicobacter pylori*. In merito a ciò recentemente è stato dimostrato che la somministrazione di bismuto, in regime di terapia quadrupla, risulta essere un metodo sicuro, efficace, economico e pratico per l'eradicazione di tale batterio in pazienti gastrectomizzati (Zhang et al. 2016).

I metalli oltre all'ambito terapeutico possono essere impiegati anche come agenti diagnostici. Infatti possono essere usati come radiofarmaci ad emissione  $\gamma$ , come agenti di contrasto nella risonanza magnetica per immagini (MRI), in cui si usa il

$Gd^{3+}$ , oppure il  $BaSO_4$  che viene utilizzato come agente di contrasto per screening a raggi X (Orvig and Abrams 1999).

A partire da tutte queste rilevanze storiche, l'interesse per la chimica inorganica applicata alla medicina per lo sviluppo di nuovi farmaci è andato via via crescendo incentivato anche dalla scoperta del cis-platino, il capostipite dei farmaci antitumorale a base metallica.

Lo sviluppo dei moderni farmaci inorganici è stato inoltre facilitato anche dall'avanzamento della conoscenza delle proprietà di coordinazione e di riduzione degli ioni metallici.

Nonostante ciò lo sviluppo di farmaci sotto forma di complessi metallici non è facile in quanto sono molti gli aspetti da dover tener conto. I metalli sono fisiologicamente presenti nei sistemi biologici in concentrazione regolata da un meccanismo di omeostasi e dove prendono parte a numerose reazioni di ossidoriduzione. Un loro accumulo nell'organismo può avere effetti indesiderati per questo motivo, nella formulazione bisogna tener conto della biodistribuzione, della *clearance* e della specificità d'azione del complesso. Un altro aspetto da dover tener in considerazione è la giusta combinazione metallo-legante, in quanto, il legante è spesso una molecola organica che legando ioni metallici modifica le proprietà fisiche e chimiche dello ione stesso. Di conseguenza, una caratteristica fondamentale nella progettazione di farmaci inorganici è il modo in cui il legante influisce sulla biodisponibilità (Thompson and Orvig 2003).

Ci sono tuttavia altri fattori che possono influenzare il meccanismo d'azione del complesso tra cui: la carica elettrica, il bilancio idrolipofilo e la cinetica di rilascio dei leganti. Inoltre, gran parte dei farmaci a base metallica sono di fatto 'pro-farmaci' e come tali in grado di interagire con i *targets* solo dopo aver subito bioattivazione (Kostova 2006).

Per contro, i complessi metallici presentano diversi vantaggi rispetto alle molecole organiche e per questo possono essere sfruttati nello sviluppo di nuovi agenti terapeutici. Questo perché gli ioni metallici oltre ad avere una buona reattività presentano anche diverse modalità e geometrie di legame che gli permettono di

raggiungere forme e strutture difficili da ottenere con composti organici. Possono di fatto creare legami labili o inerti con diversi numeri di coordinazione e con diverse geometrie (Cohen 2007).

## 1.2 COMPLESSI METALLICI COME AGENTI ANTITUMORALI: IL CIS-PLATINO

### 1.2.1 Generalità ed origine del cis-platino

Quello che ha portato a tutti gli effetti all'utilizzo dei metalli in terapia come agenti antitumorali e allo sviluppo di nuovi agenti *metal-based* è stata la scoperta dell'attività biologica del cis-platino.

Il *cis*-diamminodicloroplatino(II) (CDDP), chiamato anche cis-platino, è uno dei farmaci antitumorali maggiormente utilizzati negli attuali regimi di chemioterapia per la cura di molte patologie neoplastiche, come il tumore all'ovaio, alla cervice, al polmone e alla vescica, sia da solo che in associazione con altri farmaci. Venne sintetizzato per la prima volta nel 1844 dal medico italiano Michele Peyrone per questo inizialmente era conosciuto come 'Sale di Peyrone'. Fu solo nel 1965 che Rosenberg scoprì la sua attività biologica (Rosenber et al. 1969) e nel 1978 la Food and Drug Administration (FDA) ne approvò l'uso come farmaco antitumorale.

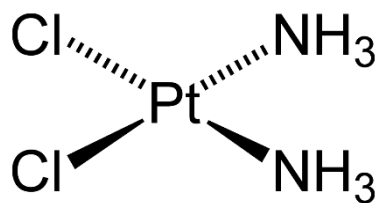


Figura 1: Formula del cis-platino

Rosenberg ed il suo *team* notarono l'attività del cis-platino la prima volta nel corso di uno studio riguardante la crescita e la divisione batterica sotto l'influenza di radiazioni elettromagnetiche.

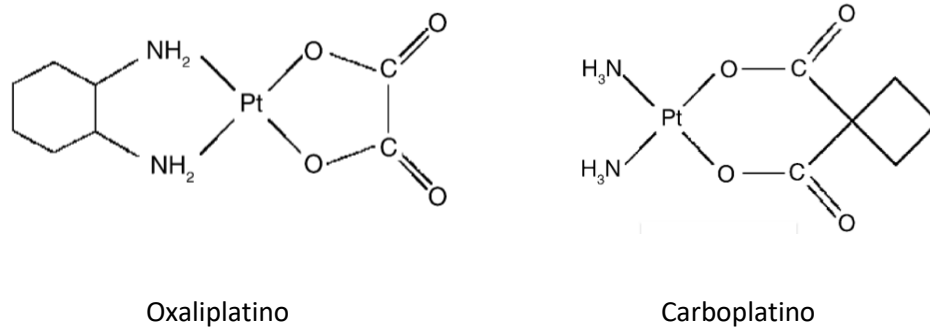


Sottoponendo batteri di *Escherichia coli* ad un campo generato da due elettrodi di platino in una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  notarono che i batteri presentavano dei filamenti cellulari dalle 200 alle 300 volte più lunghi del normale e che la divisione cellulare risultava fortemente inibita.

Ciò che fu poi dimostrato è che tale effetto era causato dalla formazione di prodotti di elettrolisi da parte degli elettrodi di platino. Da successive analisi fu poi indentificato che il composto attivo responsabile di ciò era il cis-platino. Vennero poi intraprese sia sperimentazioni su topi affetti da sarcoma-180 che sperimentazione clinica su pazienti affetti da varie tipologie di tumori e nel 1979 l'FDA approvò l'utilizzo clinico.

Tuttavia, durante la sperimentazione clinica sono emersi problemi riguardo la tossicità del cis-platino che ne limitano l'uso continuativo.

Dopo l'approvazione del cis-platino altri farmaci a base di platino sono entrati nei trials clinici, ma solo due sono stati approvati a livello internazionale: l'oxaliplatino e il carboplatino.



**Figura 2:** Formula dell'oxaliplatino e del carboplatino

Il cis-platino può essere utilizzato in molti regimi di trattamento in combinazione con altri agenti antitumorali tra cui gli inibitori della topoisomerasi II (doxorubicina, mitomicina, bleomicina), mostarde alchilanti (ciclofosfamide), gli antimetaboliti (metotrexato, gentamicina, 5-fluorouracile), gli alcaloidi della vinca ed il tassolo. Tali associazioni vengono fatte per vincere il fenomeno della resistenza e parte degli effetti collaterali emersi durante la sperimentazione clinica oltre che per

amplificarne l'efficacia. Si è infatti visto che la sua associazione con farmaci quali vinblastina e bleomicina è risultata essere efficace nel 60-70% dei casi carcinoma al testicolo con un aumento della probabilità di sopravvivenza nei pazienti con cancro alle ovaie in stadio avanzato (Prestayko et al. 1979).

Inoltre, si è osservato che associando il cis-platino alla radioterapia è stato registrato un aumento della risposta terapeutica e degli effetti citotossici verso le cellule tumorali (Bloemink et al. 1996).

### 1.2.2 Meccanismo d'azione del cis-platino

Il cis-platino può essere internalizzato all'interno della cellula tumorale e svolgere la sua azione principalmente attraverso tre modalità.

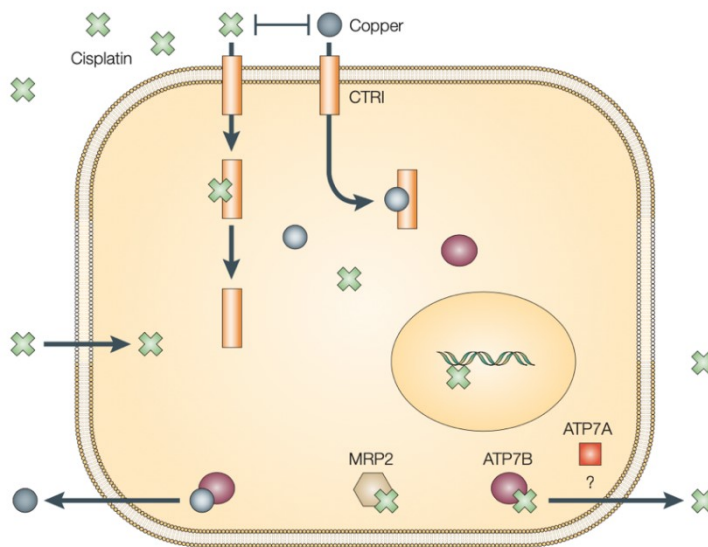
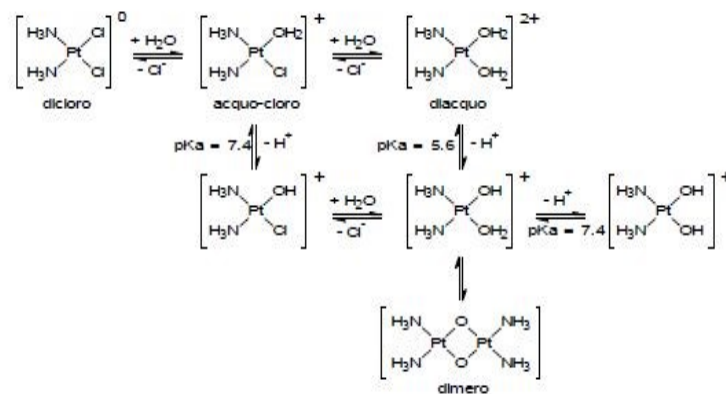


Figura 3: Meccanismo di uptake ed efflusso del cis-Pt

Nel plasma si ha una concentrazione di ioni cloruro piuttosto alta pari a 100mM; questo fa sì che quando il cis-platino viene somministrato al paziente il farmaco libero rimane in forma neutra perché i leganti cloruro rimangono legati all'atomo di platino e, come tale, si è visto, può attraversare la membrana con un meccanismo di diffusione passiva, attraverso canali trans membrana, oppure attraverso un trasporto attivo mediato dal trasportatore Ctr1 (*human Copper transporter*) o da trasportatori di ioni organici OCTs (*Organic Cation Transporters*) (Puckett, Ernst, and Barton 2010).

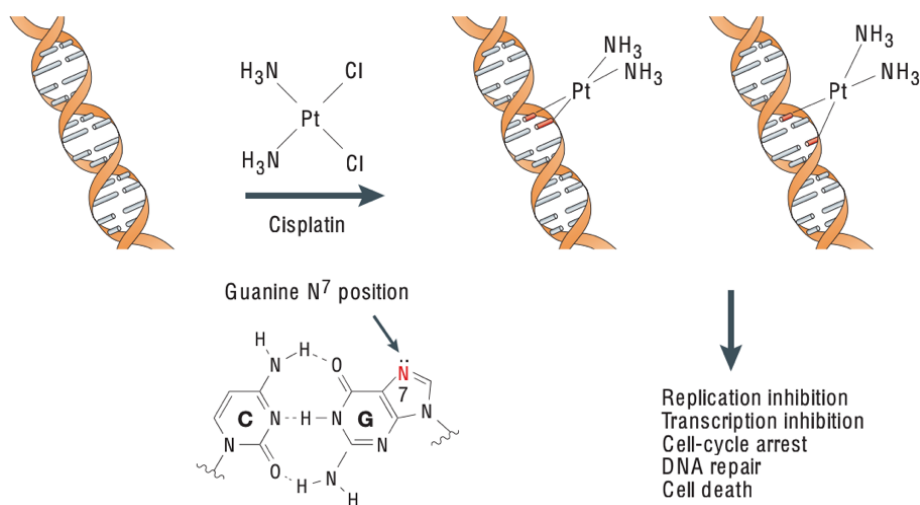
All'interno della cellula si ha una diminuzione della concentrazione citoplasmatica di ioni cloruro che è dell'ordine di 3-4mM questo fa sì che il cis-platino venga lentamente idrolizzato e che gli atomi di cloro vengano sostituiti dall'acqua o dallo ione OH<sup>-</sup> in una reazione a più stadi che porta alla formazione delle specie monoacquo e diaquo. I complessi che si formano presentano una certa acidità e possono ancora dissociare, lentamente, creando miscele di acquo-idrossidi, idrossi-complexi ed anche dimeri.



**Figura 4:** Equilibrio di idrolisi del cis-platino e formazione di complessi variamente idrati in soluzione acquosa.

Le specie acquo che si formano in questo processo sono considerate le forme reattive del cis-platino; esse infatti, essendo molto elettrofile e possedendo ottimi gruppi uscenti, reagiscono facilmente con substrati dotati di funzioni nucleofile (Wang and Lippard 2005).

Il target principale del cis-platino è rappresentato dal DNA ed in particolare dalle basi azotate soprattutto quelle puriniche (adenina e guanina) data l'elevata nucleofilia della porzione imidazolica. Sono disponibili le posizioni N(3) e l'N(7) delle basi, ma il farmaco interagisce in modo preferenziale con l'N(7) in quanto tra i due è quello più stericamente esposto. In questo modo si forma un legame covalente coordinato al doppietto solitario degli atomi di azoto (Kelland 2007). Avviene poi la chiusura ad anello attraverso la formazione di un secondo legame al DNA che porta alla formazione di una serie di addotti originando una distorsione della doppia elica compresa fra i 30° e i 40° attraverso il solco maggiore ed un disavvolgimento maggiore di 23° (Wang and Lippard 2005).



**Figura 5:** Schema di interazione del cis-platino con il DNA.

Queste distorsioni del DNA fanno sì che ci sia interferenza con la sua replicazione e trascrizione in quanto gli enzimi deputati a queste funzioni non sono in grado di operare dove il cis-platino è legato causando il danno. Ciò porta all'attivazione dei meccanismi apoptotici della cellula (Dasari and Tchounwou 2014).

L'addotto cis-platino-DNA ha la capacità di interagire con particolari proteine definite *HMG-domain proteins* (HMGs) e ciò pare concorrere all'azione del farmaco. Saggi *in vitro* su cellule di lievito hanno infatti dimostrato la loro importanza; in cellule knock-out per il gene che le esprime, il cis-platino è meno attivo. Molte HMG sono fattori di trascrizione e sono richieste per la sintesi di RNA da un *template* di DNA. Il legame dell'addotto cis-platino-DNA con queste *HMG-domain proteins* causa malfunzionamenti nei meccanismi di trascrizione portando alla morte cellulare. Inoltre, questo legame sembrerebbe essere responsabile del rallentamento dei processi riparativi a carico del DNA danneggiato dal farmaco in quanto tali proteine fanno in modo che gli addotti cis-platino-DNA non vengano riconosciuti dai sistemi di riparazione i quali non sono quindi in grado di espellere il frammento di DNA danneggiato e sintetizzarne uno nuovo da sostituire a quello perso (Cohen et al. 2000).

### 1.2.3 Limiti del trattamento con cis-platino

Il cis-platino ha delle limitazioni nel suo impiego dovuto allo sviluppo di resistenza ed alla bassa selettività per i tessuti tumorali, il che porta ad avere come conseguenza la comparsa di numerosi effetti indesiderati dose-dipendenti. Tra questi i principali sono:

- **Nefrotossicità:** Il cis-platino viene escreto principalmente per via renale ed è quindi qui che viene ad accumularsi maggiormente raggiungendo dosi tossiche a seguito della formazione di un chelato con i residui tiolici presenti a livello delle proteine renali (Dedon and Borch 1987). Tale tossicità è dose-dipendente e ciò ne limita la possibilità di aumentare il dosaggio, ecco perché in alcuni pazienti il trattamento può risultare inefficiente. La conseguenza è l'insufficienza renale acuta o una sindrome cronica che si manifesta con la perdita di elettroliti renali.

La tossicità renale è stata osservata nel 25-30% dei pazienti trattati con una singola dose di cis-platino, mentre dopo 10 giorni di trattamento con somministrazione endovenosa si è osservato una diminuzione dal 20% al 40% della filtrazione glomerulare (Peres and Cunha 2013).

- **Neurotossicità:** si manifesta con sintomi quali intorpidimento, formicolio e parestesie agli arti, difficoltà nella deambulazione e nella propriocezione (capacità di percezione e riconoscimento della posizione del proprio corpo nello spazio). La neurotossicità è il più importante effetto collaterale e ricorre nel 47% circa dei pazienti trattati.

Per il trattamento della neurotossicità possono essere utilizzate sostanze antiossidanti come melatonina, vitamina E, selenio, modulatori dell'ossido nitrico e diuretici (Boulikas et al. 2007).

- **Ototossicità:** è dovuta all'iperproduzione di ROS che inducono l'apoptosi delle cellule sensoriali uditive. Si manifesta in forma di fischi, ronzii, fruscii o pulsazioni all'orecchio, associati alla possibile perdita dell'udito unilaterale o bilaterale (Devarajan 2005).

- **Cardiotossicità:** si è osservato che il cis-platino induce cambiamenti istologici del tessuto cardiaco causando degradazione e necrosi delle cellule muscolari cardiache e formazione di vacuoli all'interno del citoplasma (Shaloam and Tchounwou 2014).
- **Tossicità gastrointestinale:** è uno degli effetti collaterali riscontrati in quasi la totalità dei pazienti sottoposti a terapia e si manifesta con nausea e vomito trattabili con la somministrazione di antiemetici. Tale tossicità può peggiorare nel caso vengano utilizzate terapie combinate tra cis-platino e altri agenti antineoplastici (Coluccia and Natile 2004).
- **Mielosoppressione:** altro effetto collaterale del cis-platino che comporta una ridotta ematopoiesi che può determinare anemia, leucopenia o trombocitopenia, rispettivamente caratterizzate da una ridotta quantità di emoglobina nel sangue, ridotto numero di leucociti e predisposizione ad infezioni, ridotto numero di piastrine e incrementato rischio di emorragie (Natile and Coluccia 2001).

#### 1.2.4 Sviluppo di farmacoresistenza al cis-platino

Una delle problematiche più importanti relative all'utilizzo prolungato del cis-platino come antitumorale è lo sviluppo di resistenza al farmaco stesso. Capita spesso che le cellule tumorali che hanno sviluppato resistenza al trattamento con cis-platino presentino poi resistenza crociata nei confronti di altri agenti antineoplastici. Sono diversi i meccanismi implicati nello sviluppo di tale resistenza da parte delle cellule:

- **Diminuzione dell'afflusso di cis-platino all'interno della cellula ed aumento dell'efflusso con conseguente diminuzione dell'accumulo a livello citoplasmatico.**

Ciò comporta una sua ridotta interazione con il DNA dovuta appunto ad una diminuzione dell'*uptake* del farmaco che di conseguenza è meno disponibile per il legame con il DNA (Kelland 2000). La modifica dell'*uptake* è conseguenza di diversi fenomeni che possono coinvolgere l'espressione di proteine implicate nel trasporto del farmaco oppure variazioni delle

proprietà di membrana delle cellule resistenti o ancora causata dal *quenching* citosolico.

- Nel primo caso si sono evidenziate in modo particolare due ATPasi, normalmente coinvolte nell'omeostasi del rame, ATP7A e ATP7B, che sembrerebbero essere coinvolte nella fase di efflusso del farmaco dalla cellula (Katano et al. 2002).
  - Nel secondo caso è stato dimostrato che le cellule resistenti mostrano una minore fluidità di membrana ostacolando l'accumulo del cis-platino comportando basse quantità di farmaco a livello citoplasmatico (Cohen et al. 2013).
  - Nel terzo caso si ha che il cis-platino all'interno della cellula può subire un fenomeno noto come *quenching* citosolico, ovvero può essere inattivato, a seguito della coniugazione con specie contenenti residui tiolici, come il glutatione o le metallothioneine che, sostituendo il centro metallico, ostacolano il legame del complesso con il DNA (Kelland 2000).
- **Aumento dei sistemi di riparazione del DNA** o sviluppo di maggiore tolleranza al danno.
- In seguito al legame del cis-platino al DNA le cellule tumorali possono sopravvivere e sviluppare resistenza proprio grazie ai sistemi di riparazione del DNA in grado di rimuovere con diversi meccanismi gli addotti farmaco-DNA e riparare le lesioni. A tal proposito diversi studi hanno evidenziato nelle linee cellulari resistenti al cis-platino l'aumento degli enzimi implicati nei processi di riparazione del DNA.
- Tra questi vi sono le proteine NER (*nucleotide excision repair*), le proteine BER (*base excision repair*) e le proteine MMR (*mismatch repair*). Le NER in particolare permettono di individuare e rimuovere la porzione di DNA danneggiata e procedere alla sintesi di un nuovo frammento sostitutivo (Jung, Y. and S.J. Lippard 2007).
- **Inibizione del processo di morte cellulare.** È stato ipotizzato che gli oncogeni siano implicati nell'insorgenza della resistenza in quanto in grado

di modulare la capacità della cellula di andare incontro o meno ad apoptosi. In tal caso si è osservato in alcune linee cellule resistenti al cis-platino, l'instaurarsi di alcuni meccanismi che coinvolgendo determinati oncogeni causano l'avvio del processo di replicazione e cambiando le modalità di trasduzione del segnale rendendole insensibili al processo apoptotico (Buja et al. 1993).

Proprio a causa di questi problemi di tossicità e sviluppo di farmacoresistenza al cisplatino la ricerca si è indirizzata verso complessi metallici alternativi come il carboplatino e l'oxaliplatino. Ad oggi l'oxaliplatino è l'unico agente a base di platino in grado di superare i meccanismi di resistenza in quanto gli adotti che forma con il DNA sono diversi rispetto a quelli formati dal cisplatino (Wehbe et al. 2017).

### **1.3 IL RAME**

Il rame è un metallo indicato in tavola periodica col simbolo 'Cu'. L'origine del suo nome risale all'Impero Romano dove la principale fonte di rame derivava dall'isola di Cipro. Da qui la sua definizione come '*aes Cyprium*' ovvero rame di Cipro poi modificato in Cyprium ed infine corretto in Cuprum.

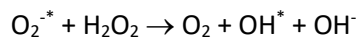
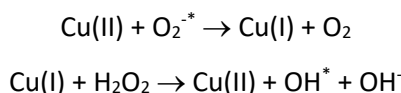
Il rame è un micronutriente essenziale per tutti gli organismi che vivono in ambienti ricchi di ossigeno. Risulta essere molto attivo dal punto di vista redox, passando facilmente dallo stato di ossidazione Cu(I), in cui si trova ridotto, alla forma ossidata Cu(II) o viceversa. Proprio grazie a questa sua capacità redox il rame è in grado di coordinare un'ampia varietà di leganti come l'ossigeno carbossilico, l'azoto imidazolico, i gruppi tiolici delle cisteine, lo zolfo dei gruppi tioeterei delle metionine ed il fosforo delle fosfine (Tisato et al. 2010).

Nei sistemi biologici il rame è presente soprattutto sotto forma di rame rameico Cu(II), molto stabile dal punto di vista ossidoriduttivo anche se lo si può ritrovare in piccole quantità anche nella forma Cu(I). Si tratta di un elemento essenziale per il funzionamento di numerosi enzimi e proteine coinvolti in importanti funzioni biologiche essenziali per la crescita e lo sviluppo cellulare tra cui il metabolismo



energetico, la respirazione mitocondriale e funzioni antiossidanti (Linder and Haegh-Azam 1996).

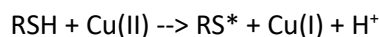
Dal momento che il rame ha un'innata capacità di reagire direttamente con l'ossigeno molecolare portando alla formazione di radicali liberi definiti ROS, le sue concentrazioni intracellulari sono mantenute a livelli bassi, 10-18M – 10-13M (Tapiero, Townsend, and Tew 2003). Tali livelli vengono giustificati dal fatto che in presenza dell'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e di determinati agenti riducenti come l'acido ascorbico o il GSH, il Cu(II) può essere ridotto a Cu(I) andando così a catalizzare la formazione del radicale idrossilico ( $OH^{\cdot}$ ) a partire dal perossido di idrogeno tramite la reazione di Haber-Weiss (Bremmer 1998) (Koppenol 2001).



Tale processo è alla base dello stress ossidativo che causa danno alla cellula. I ROS sono considerati tra i responsabili del processo di invecchiamento e dello sviluppo di alcune patologie quali il cancro e malattie neurodegenerative. Il radicale ossidrilico formatosi è in grado di interagire con qualunque molecola biologica portando via un idrogeno da un carbonio legato ad un gruppo amminico formando una proteina radicalica o da un acido grasso insaturo per formare un radicale lipidico (Powell 2000).

È stato inoltre dimostrato che il rame è in grado di indurre rotture nei filamenti di DNA e RNA, ossidazione delle basi azotate e delle proteine e perossidazione lipidica a livello delle membrane cellulari (Halliwell, B. and J.M. Gutteridge 1984).

Oltre a ciò il Cu(II) forma radicali tiolici ( $RS^{\cdot}$ ) secondo la reazione:



Sembrerebbe che il glutatone ha un effetto protettivo in quanto stabilizza la forma del Cu(I) e va ad inibire la formazione dei radicali liberi prevenendo l'innescamento della reazione.

La tossicità del rame non è però solamente attribuibile alla produzione di ROS, ma anche alla sua capacità di sostituirsi ad altri cofattori metallici a livello dei loro leganti naturali. Per esempio, la sostituzione dello zinco(II) con il rame(II) nel dominio *zinc finger* che lega il DNA del recettore umano per gli estrogeni rende questa proteina difettosa alterando il suo ruolo nella trasduzione del segnale ormone-dipendente (Predki and Sarkar 1992).

Un aspetto relativo alla tossicità di questo metallo è legato al fatto che esso può determinare l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) causando aterosclerosi vascolare (Burkitt 2001). È stato dimostrato da studi *in vitro* che in tale processo di ossidazione è coinvolta, oltre al rame, anche la ceruloplasmina un  $\alpha$ -2-glicoproteina sintetizzata nel fegato in grado di legare circa il 95% del rame presente a livello ematico (Bayrak et al. 2016).

Anche le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono sensibili all'ossidazione da parte del rame molto di più rispetto alle LDL e ciò è dovuto all'aumentare della perossidazione conseguente all'azione dell' $\alpha$ -tocoferossilico generato a seguito della riduzione del Cu(II) a Cu(I) da parte del  $\alpha$ -tocoferolo (Raveh et al. 2000).

Al fine di evitare l'insorgenza degli effetti tossici indotti dal rame sopra descritti, le cellule umane hanno sviluppato un fine meccanismo omeostatico che permette loro di regolare con precisione la concentrazione cellulare di rame.

### **1.3.1 Chimica di coordinazione del rame**

Il rame è un metallo di transizione posizionato al ventinovesimo posto in tavola periodica e appartenente al gruppo 11 avente massa atomica media di 63.546u e configurazione elettronica  $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ . Gli isotopi naturali del metallo sono  $^{65}\text{Cu}$  (69.09%) e  $^{63}\text{Cu}$  (30.91%).

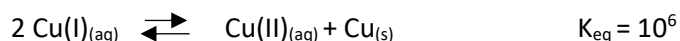
Gli stati di ossidazione più comuni del rame sono Cu(0) nel metallo, Cu(I) nei composti rameosi sensibili a ossidazioni e dismutazioni e Cu(II) in quelli rameici

molto stabili dal punto di vista ossidoriduttivo. Sono poi stati riportati in letteratura anche gli stati di ossidazione intermedia Cu(III) e Cu(IV) raramente presenti in alcuni composti di coordinazione. Una caratteristica che li contraddistingue è la loro colorazione; il rame metallico Cu(0) ha un colore rossastro-marrone mentre i composti Cu(II) hanno un colore verde-azzurro e quelli di Cu(I) sono invece tipicamente bianco-incolore.

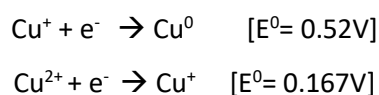
## Cu(I)

Tale ione esiste sottoforma di sale o di complessi bianchi e diamagnetici in quanto presenta il guscio esterno  $3d^{10}$  completamente riempito. Esso subisce facilmente ossidazione e dismutazione se esposto all'aria grazie all'azione ossidante dell'ossigeno atmosferico coadiuvata dall'umidità.

In soluzione acquosa Cu(I) è presente a basse concentrazioni in seguito all'instaurarsi dell'equilibrio:



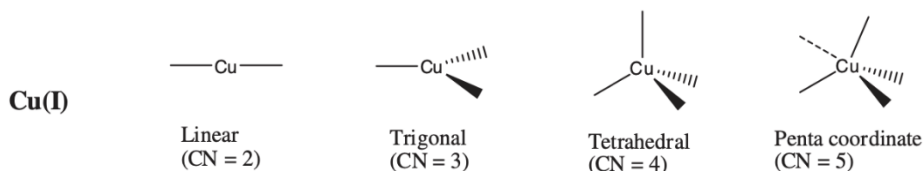
Tale instabilità viene confermata dai potenziali standard di riduzione delle coppie redox  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  e dalla coppia  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^0$  in cui si evidenzia che la prima coppia è più riducente della seconda:



Ciò è la dimostrazione di come in alcuni casi, ioni  $\text{Cu}^+$  trasferiscano spontaneamente elettroni su altri ioni  $\text{Cu}^+$  dando luogo a dismutazione.

Cu(I) è un acido di Lewis capace di formare composti di coordinazione. Secondo la teoria di Pearson ha un carattere '*soft - borderline*' formando preferenzialmente legami dativi con basi di Lewis anch'esse *soft* come tioeteri, nitrili, isonitrili, cisteine, metionine, alogenuri (Cl, Br, I) e fosfine, ma è in grado anche di formare complessi di coordinazione con leganti misti *soft/hard* come amminofosfine, ossofosfine e tiofosfine.

I numeri di coordinazione (CN) dipendono dalle caratteristiche del legante che va ad influire anche sulla stabilità dei complessi di Cu(I). I più comuni risultano essere: CN=2 che definisce una geometria lineare, CN=3 ovvero una geometria triangolare planare e CN=4 con geometria tetraedrica.



**Figura 6:** Geometrie di coordinazione per Cu(I)

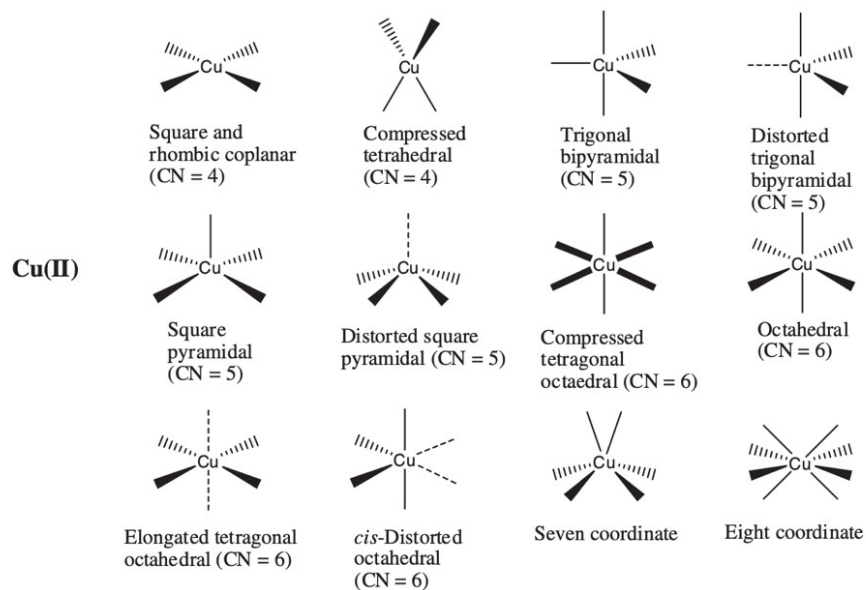
## Cu(II)

Tale ione è caratterizzato dalla presenza dell'orbitale più esterno d parzialmente riempito con 9 elettroni possedendo quindi un elettrone spaiato che lo rende paramagnetico.

Lo stato di ossidazione +2 abbiamo visto essere il più stabile sia all'aria che in ambiente acquoso. Questa stabilità è dovuta al fatto che, in acqua, la dissociazione di tali sali è accompagnata dalla formazione del complesso ionico  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  che stabilizza il  $\text{Cu}^{2+}$  facilitando anche la solubilizzazione di tali Sali. Per tali ragioni questi complessi sono idrosolubili come: nitrato di rame, il cloruro di rame e l'idrossido di rame. Solitamente si presentano colorati in blu, verde e in alcuni casi in rosso scuro a seconda del tipo di legante presente.

Il Cu(II) è un acido di Lewis definito *hard-borderline* secondo la classificazione di Pearson ed è quindi in grado di formare dei complessi stabili con leganti *hard* come  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$  e  $\text{CN}^-$  e con leganti con struttura chimica più complessa contenenti atomi donatori di elettroni come ossigeno e azoto.

I complessi di Cu(II) hanno numeri di coordinazione 4, 5, 6 ai quali corrisponde più di una geometria del complesso. A CN=4 corrispondono la geometria tetraedrica o quadrata planare, a CN=5 corrispondono la struttura piramidale o triangolare bpiramidale mentre a CN=6 corrisponde una struttura ottaedrica.



**Figura 7:** Geometrie di coordinazione per Cu(II)

### 1.3.2 Omeostasi del rame

Il rame è un micronutriente indispensabile per diverse funzioni biologiche importanti. Questo è dovuto anche alle sue capacità redox che vengono sfruttate per il funzionamento di decine di proteine come il citocromo-C ossidasi (COX), il NADH deidrogenasi-2 (ND2), il Cu/Zn-superossido dismutasi (SOD1) e la tirosinasi (Denoyer et al. 2015).

Il rame entra quindi in gioco in molti processi quali: lo sviluppo e il mantenimento delle ossa, dei tessuti connettivi, del cervello, del cuore e di altri organi. È coinvolto nella formazione dei globuli rossi e dell'assorbimento e trasporto di ferro, nel metabolismo del colesterolo e del glucosio e nella sintesi e rilascio di proteine ed enzimi oltre a stimolare il sistema immunitario.

Per tali motivi la concentrazione del metallo nell'organismo è regolata da un sistema di omeostasi che ne permette di eliminare l'eccesso in modo da evitare il raggiungimento di concentrazioni tossiche. La tossicità del rame è legata alla sua capacità di catalizzare la produzione di radicali liberi dannosi per lipidi, proteine, DNA e altre biomolecole.

Di conseguenza l'assunzione di troppo o di troppo poco metallo, porta ai rispettivi stati di eccesso o carenza entrambi nocivi per lo stato di buona salute.

Il fabbisogno giornaliero di rame raccomandato risulta essere di 0.9 mg per gli adulti, 1.0 mg per le donne in gravidanza e 1.3 mg per le donne in allattamento (Milne 1998).

L'assunzione del rame avviene mediante la dieta: alcune fonti alimentari di rame sono i vegetali a foglia verde, il fegato animale, i molluschi, il cioccolato, le noci e i semi, l'acqua potabile (de Romana et al. 2011).

L'organismo umano contiene tra gli 80 e i 120 mg di rame, dove il 10% risulta essere localizzato a livello del fegato (Iakovidis, Delimaris, and Piperakis 2011).

Il mantenimento dell'omeostasi del rame è regolato da tre processi: assorbimento, distribuzione ed eliminazione.

### **Assorbimento**

L'assorbimento del rame avviene principalmente a livello dello stomaco e dell'intestino tenue in particolare a livello duodenale mentre la sua distribuzione in circolo è regolata dal fegato (Tisato et al. 2010).

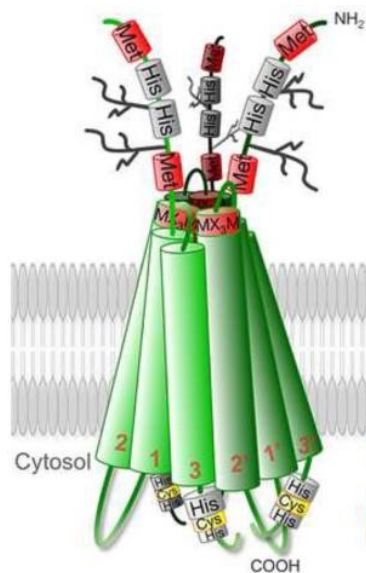
I quantitativi di rame assorbito variano dal 15 al 97% a seconda della sua quantità, della forma in cui si trova e dalla presenza in dieta di elementi che possono interferire con l'assorbimento come zinco e cadmio o grandi quantità di acido fitico e di zuccheri semplici. Anche la presenza di fibre non digeribili che si legano al rame sequestrandolo ne impediscono l'assorbimento. Al contempo vi sono anche proteine, fosfati e citrati che ne accrescono l'assorbimento (Linder et al. 1996).

### **Distribuzione**

La distribuzione del rame nell'organismo viene mediata da diverse proteine plasmatiche. In particolare, circa il 65-70% del rame libero viene veicolato ai vari tessuti mediante legame con la ceruloplasmina sintetizzata a livello degli epatociti. Il rame può però essere trasportato anche mediante il legame all'albumina, alla transcupreina o Cu-diistidina (Tapiero, Townsend, and Tew 2003).

I primi studi vennero effettuati su cellule eucariotiche appartenenti al lievito *Saccharomyces cerevisiae* negli anni '90 in cui furono identificate come responsabili

dell'ingresso in cellula del rame le proteine CTR1 e CTR3 (*copper transport protein*) contenenti diversi residui in grado di coordinare il rame come istidina, cisteina e metionina (Tisato, et al. 2010).



hCTR1 (*Human copper transporters*) è l'analogo umano di queste proteine costituito da un dominio transmembrana formato da tre segmenti e due domini terminali amminico e carbossilico, situati sui lati opposti della membrana plasmatica in particolare quello amminico sul lato extracellulare e quello carbossilico su quello citosolico. Con tali domini forma un omotrimerico avente un poro centrale che permette l'ingresso del metallo nella cellula. (Maryon et al. 2007).

**Figura 8:** Struttura del trasportatore

Esso è un trasportatore specifico per molti metalli monovalenti motivo per il quale viene associato ad alcuni enzimi appartenenti alla famiglia delle reduttasi (metalloreduttasi) che riducono il  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  prima che entri nella cellula. Questa peculiarità è confermata da studi di competizione che hanno dimostrato che il trasporto di  $\text{Cu(I)}$  è inibito dallo ione  $\text{Ag(I)}$ , ma non da ioni multivalenti come  $\text{Zn(II)}$ ,  $\text{Fe(II)}$ ,  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{Cd(II)}$  (Lee et al. 2002).

Dunque, il rame legato alle proteine plasmatiche arriva a livello della cellula dove viene ridotto a  $\text{Cu(I)}$  da reduttasi specifiche per legarsi poi al trasportatore hCTR1 nei domini terminali ricchi in istidina e metionina. hCTR1 trasporta il rame con alta affinità in modo tempo dipendente e saturabile permettendogli di attraversare la membrana cellulare e raggiungere l'ambiente intracellulare. Una volta nella cellula, diverse proteine legano il rame in modo da prevenire reazioni causali o un rilascio improvviso dello ione che, vista la sua natura altamente reattiva, sarebbe dannoso per la cellula. Tale legame ha inoltre lo scopo di permettere al metallo di essere trasferito al target specifico. La distribuzione intracellulare del rame è mediata da diverse proteine citosoliche definite '*chaperones*' tra queste va ricordata COX-17 responsabile del trasporto del rame alla citocromo-c-ossidasi dei mitocondri; CCS1

che fornisce rame alla superossido dismutasi Cu/Zn che protegge le cellule dai radicali superossido ed infine ATOX1 che veicola il rame, attraverso la rete del Golgi, all'ATPasi di tipo P, ATP7A e ATP7B, regolandone la concentrazione all'interno della cellula (Denoyer et al. 2015).

È stato poi evidenziato che la maggior parte del rame citoplasmatico viene complessato da parte del glutatione il quale, avendo una bassa affinità per il metallo, lo trasferisce alle proteine '*chaperones*' ad alta affinità che a loro volta lo trasferiscono alle proteine target aventi massima affinità per il rame (Denoyer et al. 2015). Il GSH ha anche la funzione di trasferire il rame alle metallothioneine ovvero proteine ricche di cisteine che hanno un ruolo nella detossificazione dei metalli a livello intracellulare (Harris 2000).

Studi successivi su cellule prive del trasportatore CTR1 hanno poi dimostrato l'esistenza di alternativi sistemi di trasporto del rame. In particolare, è stato individuato DMT1 trasportatore di metalli divalenti che permette l'ingresso in cellula di rame(II) (Arredondo and Nùñez 2005).

Inoltre, recentemente è stato scoperto che l'ingresso di farmaci antitumorali a base di platino può essere mediato dal trasportatore ad alta affinità per il rame CTR1. Tali trasportatori sono quindi in grado di regolare la sensibilità delle cellule tumorali umane alla terapia a base di platino. I meccanismi molecolari alla base di questo processo restano però tutt'oggi ancora sconosciuti (Kidane, T.Z. et al. 2012).

## **Eliminazione**

L'escrezione del rame è fondamentale per la vita della cellula in quanto eliminando il metallo in eccesso evita che si verifichino stati di tossicità cellulare. L'escrezione del rame avviene principalmente a livello del fegato ed in particolare attraverso la bile. È stato infatti stimato che al giorno all'interno della bile vengono riversati circa 2.5 mg di rame (Linder and Hazegh-Azam 1996).

L'efflusso di rame dalla cellula viene mediato da due ATPasi di tipo P aventi struttura simile: ATP7A e ATP7B. La prima risulta essere maggiormente espressa nell'epitelio intestinale, in gran parte degli altri tessuti e nel fegato mentre la seconda risulta essere espressa nei reni, nel fegato e in basse quantità nell'encefalo (Tanzi, R.E. et al. 1993).



Si tratta di proteine con otto domini transmembrana contenenti nella parte N-terminale citoplasmatica sei siti di legame per il rame.

A seguito del legame del metallo a queste due proteine avviene, a causa di una rilocalizzazione subcellulare, uno spostamento dalla posizione basale, nella rete trans del Golgi, ad altri compartimenti vescicolari e nel caso di ATP7A alla membrana plasmatica.

Quando i livelli di rame intracellulari tornano alla normalità ATP7A e ATP7B ritornano nuovamente nella posizione iniziale ovvero nel TGN.

### **1.3.3 Rame e patologie associate**

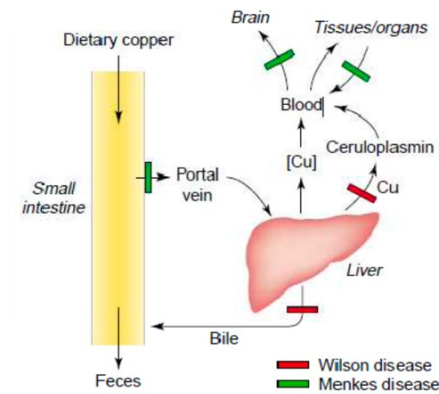
Il mantenimento dell'omeostasi del rame negli organismi viventi è fondamentale in quanto alterate concentrazioni di questo metallo possono essere causa di patologie e disturbi sia neurologici (malattie di Menkes e Wilson) sia neurodegenerativi (malattia di Alzheimer e Parkinson) (Strausak et al. 2002).

La malattia di Wilson è una malattia autosomica recessiva dovuta ad una mutazione del gene ATP7B che codifica per l'ATPasi che media l'escrezione del rame tramite la bile. Ciò comporta l'accumulo di rame nel fegato, nel cervello e in altri organi. Questa patologia può portare a diverse manifestazioni cliniche come cirrosi epatica, epatite, insufficienza epatica, sintomi neurologici come tremori, distonia e condizioni psicologiche (Gitlin, J.D. 2003).

Tra i farmaci utilizzati per il trattamento di questa patologia va ricordato: il tetratiomolibdato (TM), la trientina e la D-penicillamina (D-pen) nati come chelanti del rame e come potenziali farmaci anti-angiogenici (Brewer 2001).

La malattia di Menkes invece è una sindrome congenita recessiva legata al cromosoma X, causata da mutazioni del gene che codifica per l'ATPasi ATP7A, responsabile dell'escrezione del rame. Questa mutazione comporta una perdita di funzione della proteina causando una carenza di rame nel sangue, nei reni, nel fegato e nel cervello in quanto un mancato funzionamento del trasportatore ATP7A a livello intestinale provoca una diminuzione dell'assorbimento del rame nel tratto gastro intestinale con conseguente accumulo nella cellula e diminuzione del riversamento del metallo nel circolo sanguigno.

I principali sintomi della malattia sono ipotermia, anomalie del tessuto connettivo, anomalie della pelle dei capelli e delle ossa e degenerazione neurologica progressiva oltre a morte prematura (Gromadzka et al. 2010).



**Figura 9:** Ripartizione del rame nella malattia di Wilson e di Menkes

È stato poi evidenziato che un'alterata omeostasi del rame è concausa anche in patologie neurodegenerative come l'Alzheimer e la malattia di Parkinson.

La malattia di Alzheimer è definita da un declino cognitivo progressivo che porta a demenza senile. Esso è dovuto alla formazione di placche create dalla deposizione di proteina  $\beta$ -amiloide che porta alla perdita di comunicazione tra le cellule nervose e danni cerebrali. Si è visto infatti che il rame insieme ad altri metalli favorisce l'assemblaggio di questa proteina (Tisato et al. 2010).

Un'altra malattia neurodegenerativa importante è il morbo di Parkinson. Essa colpisce la capacità di locomozione dei pazienti. È stato evidenziato che l'esposizione a lungo termine a rame e magnesio aumenta il rischio di insorgenza di questa patologia. Il rame, infatti, è in grado di indurre l'aggregazione di  $\alpha$ -sinucleina, proteina ampiamente implicata nel Parkinson e in altre malattie neurodegenerative. L'aggregazione di questa proteina causa una disfunzione del sistema ubiquitina-proteasoma che influenza la malattia (Montes et al. 2014).

## **1.4 COMPLESSI DI RAME COME AGENTI ANTITUMORALI**

### **1.4.1 Il ruolo del rame nelle neoplasie**

Numerosi studi effettuati negli ultimi decenni hanno evidenziato significativi cambiamenti nel processo omeostatico del rame ovvero nelle fasi di assorbimento, distribuzione ed eliminazione in pazienti affetti da una patologia oncologica. In particolare, sono stati riscontrati nel siero e nel tumore dei pazienti, concentrazioni di rame 2-3 volte maggiori rispetto ai soggetti sani, al contrario di altri ioni come zinco e ferro che non mostravano cambiamenti significativi (Zuo et al. 2006).

Gli elevati livelli di rame sono stati riscontrati in soggetti affetti da varie forme di cancro come: linfoma di Hodgkin, sarcoma, tumore alla cervice, alla prostata, al seno, al polmone, al cervello etc.

Questo risulta essere supportato anche dal fatto che il rame sembra essere un co-fattore essenziale per il processo di angiogenesi, indispensabile per la crescita e la sopravvivenza della massa tumorale. Questo metallo viene richiesto per la secrezione e l'attivazione di vari fattori angiogenici come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), l'angiogenina, TNF- $\alpha$  e le interleuchine IL-1, IL-6, IL-8 (Lowndes and Harris 2005).

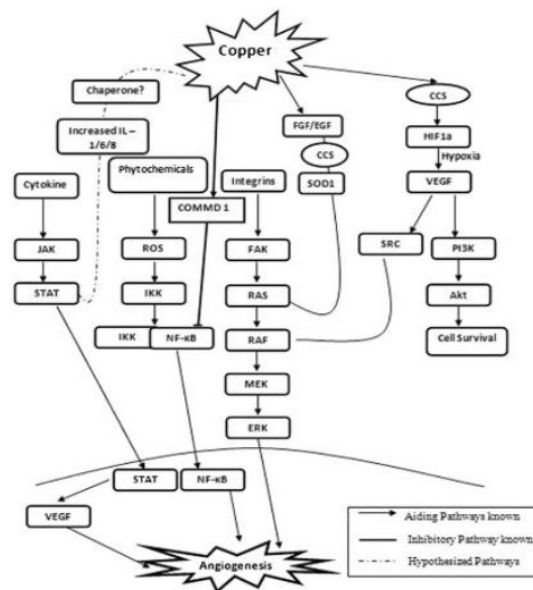
È stato poi identificato in diverse tipologie di tumori un incremento anche dei livelli ematici di ceruloplasmina connesso con lo stadio della patologia tumorale (Gupte and Mumper 2009).

A seguito di queste evidenze, l'accumulo anomalo di rame a livello delle cellule tumorali può essere una caratteristica distintiva delle cellule alterate rispetto a quelle sane, proprietà che può essere usata come ipotetico target per nuovi farmaci antitumorali (Daniel et al. 2004). Così come un'analisi dei livelli ematici di ceruloplasmina potrebbe essere utile per la diagnosi del tumore e per stabilire la prognosi della malattia e l'efficacia della chemioterapia.

Il rame a concentrazioni fisiologiche induce un processo di fosforilazione ossidativa oltre a possedere un'azione antiossidante. Il rame in eccesso porta a neurodegenerazione e angiogenesi. La prima è conseguente alla via di efflusso del rame mediata dalla proteina chaperon ATP7B (pare vi sia anche un'implicazione da

parte della proteina MURR1), mentre nel processo di angiogenesi sono coinvolti gli *chaperones* CCS e ATOX1 (Devi, Dhivya M, and Sulochana 2016).

Questi trasportatori di rame risultano quindi sovra espressi in diverse forme tumorali portando ad un aumento dell'internalizzazione di rame tramite hCTR1 seguito da una maggiore distribuzione agli enzimi rame-dipendenti tramite il percorso ATOX1-ATP7B ed un conseguente aumento di rame ai mitocondri tramite COX17 e SCO2 (De Luca, et al. 2019).



**Figura 10:** Chaperons del rame coinvolti nel processo di angiogenesi

Il rame gioca quindi un ruolo fondamentale nel processo di angiogenesi, fenomeno che avviene in diverse fasi della vita: durante lo sviluppo embrionico e post-embriologico, durante il ciclo riproduttivo e la riparazione di ferite (Quesada, Munoz-Chàpuli, and Medina 2006). Esso si basa su un complesso bilancio tra attivatori e inibitori dell'angiogenesi, di conseguenza, una mal regolazione di questo processo fisiologico è indice di una condizione patologica che si manifesta anche durante la formazione di tumori solidi (Turski and Thiele 2009).

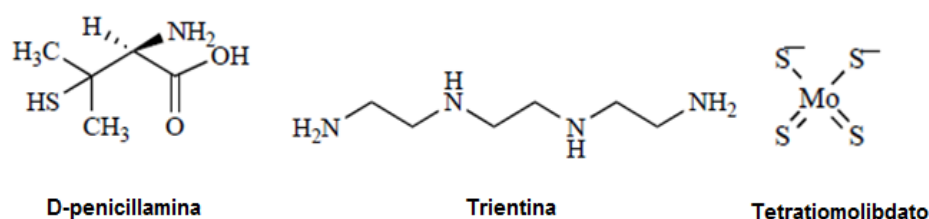
Il rame influenza la formazione di nuovi vasi sanguigni in diversi modi. Agisce attivando i fattori angiogenici endogeni, ma anche legandosi alle proteine ceruloplasmina, eparina e glicil-L-istidil-L-lisina, facendo in modo che acquisiscano

un'attività angiogenica che si manifesta con la stimolazione delle cellule endoteliali (Raju et al. 1982).

A partire da tali evidenze, si è cercato di controllare il processo angiogenico mediante la regolazione dei livelli di rame (Khan and Merajver 2007).

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato l'efficacia degli agenti chelanti il rame nel trattamento dell'angiogenesi, tra questi tre usati anche nella malattia di Wilson troviamo: il tetratiomolibdato, la trientina e la D-penicillamina (Denoyer et al. 2015).

Per tutti e tre i farmaci è stato dimostrato tramite appositi studi una significativa inibizione della crescita tumorale associata ad una soppressione dell'angiogenesi.



**Figura 11:** Strutture dei primi composti utilizzati come chelanti di rame nella terapia antitumorale

Da tutto ciò si può evincere come l'elevata concentrazione ematica di rame si può correlare con l'incidenza tumorale, la progressione maligna e la comparsa di recidiva. Oltre al fatto che l'accumulo di rame a livello delle cellule tumorali può essere considerato una caratteristica distintiva di queste cellule rispetto a quelle sane, proprietà che può essere usata come target per nuovi farmaci antitumorali.

#### 1.4.2 Sviluppo di complessi di rame

La ricerca di nuovi composti antitumorali *metal-based* con proprietà farmacologiche migliori rispetto al cis-platino si è resa necessaria proprio a causa dei numerosi effetti avversi e dallo sviluppo di fenomeni di resistenza a livello cellulare legati all'utilizzo di tale composto che spesso portano al fallimento della terapia (Kelland 2000).

La scelta di usare il rame per realizzare nuovi agenti antitumorali la si deve al fatto che, essendo un metallo endogeno essenziale per l'organismo, risulta essere meno tossico per le cellule normali rispetto a quanto lo è per le cellule tumorali. A tal proposito è stato riscontrato un aumento dell'*uptake* di rame a livello delle cellule tumorali che ha incoraggiato lo sviluppo di questi composti come potenziali agenti antitumorali (Santini, et al. 2014).

I composti a base di rame presentano meccanismo d'azione, biodistribuzione e tossicità diversi da quelle dei derivati del platino per cui potrebbero dimostrarsi efficaci nel trattamento di tumori poco sensibili alla chemioterapia o che hanno sviluppato resistenza ai farmaci a base di platino (Tisato, et al. 2010). Anche se ad oggi il loro meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiaro, è emersa la possibilità che alla base dell'attività citotossica di questi complessi ci siano meccanismi d'azione DNA-indipendenti e quindi altri target molecolari quali: enzimi contenenti gruppi tiolici e processi redox. In tal senso, la generazione di ROS, tramite reazione di Haber-Weiss e la diminuzione del GSH rappresentano due dei maggiori effetti cellulari che si manifestano in cellule tumorali trattate con questi complessi (Koppenol 2001).

La natura dei leganti va ad influenzare la stabilità del complesso, la geometria di coordinazione e va a determinare l'idrofilicità o idrofobicità del complesso modulandone la biodisponibilità. Per quanto riguarda la stabilità, generalmente il legame del Cu(I) è termodinamicamente favorito dall'inclusione di più donatori di zolfo e fosforo rispetto ad ossigeno ed azoto e da numeri di coordinazione inferiori, mentre Cu(II) è più stabile nelle coordinazioni a quattro, cinque e sei.

I complessi a base di rame devono essere stabili per poter trasportare il metallo a livello del target desiderato, ma anche sufficientemente labili per permettere poi al metallo di interagire con il sito di legame una volta raggiunto il bersaglio d'azione (Tisato, et al. 2010).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati complessi di Cu(I) e Cu(II) con diversi tipi di leganti tra cui: *S*-donatori come tiosemicarbazoni (TSCs) o ditiocarbammati, *O*-donatori come piridine, *N*-donatori come imidazoli, *S,N*-donatori come i

ditiocarbazati e fosfine proposti poi come potenziali agenti antitumorali (Cristina Marzano et al. 2009).

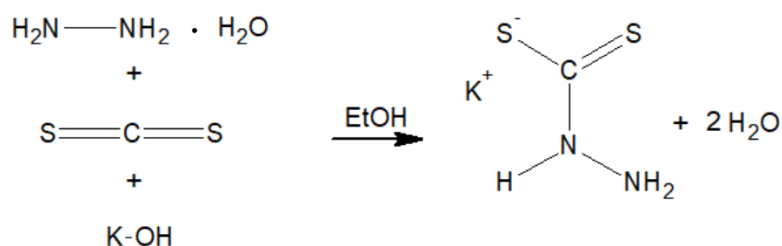
## **1.5 COMPLESSI DI RAME CON LEGANTE DITIOCARBAZATO**

I complessi metallici dei ditiocarbazati ( $H_2NNHCS_2^-$ ) sono oggetto di studi considerevoli. La presenza di atomi donatori *N* duri e *S* morbidi nelle ossature di questi leganti consente loro di reagire prontamente con gli ioni metallici di transizione, realizzando complessi metallici stabili e intensamente colorati, alcuni dei quali hanno mostrato interessanti proprietà fisico-chimiche e attività biologiche significative (Ali et al. 2008). In particolare i ditiocarbazati di nichel(II) e rame(II) sono stati ampiamente studiati e segnalati per mostrare proprietà antimicrobiche, antileucemiche e antitumorali (Kalia, Lumba et al. 2011).

Per tali motivazioni, i ricercatori hanno intrapreso la sintesi di nuovi leganti, donatori di *N,S*, attraverso la condensazione di basi di Schiff con aldeidi e chetoni ottenendo una serie di complessi con proprietà differenti impiegati nella realizzazione di numerosi complessi metallici (Hazari et al. 1996). Ne è un esempio il DTCZ, *N*-metil,*S*-metil ditiocarbazato, un ditiocarbazato con due sostituenti metilici avente ottime proprietà coordinanti. Ad oggi la sua reattività nei confronti dei metalli e soprattutto del rame è stata poco studiata se confrontata con quella del suo omologo inferiore  $H_2NNHCSS$ .

### **1.5.1 Chimica dei ditiocarbazati**

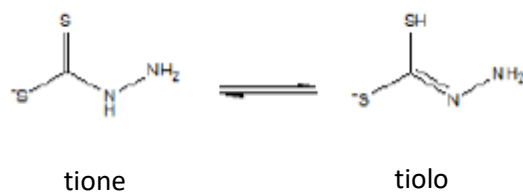
Lo ione ditiocarbazato  $H_2NNHCS_2^-$  si forma in seguito alla reazione di condensazione tra idrazina idrato e disolfuro di carbonio in presenza di idrossido di potassio:



**Figura 12:** Reazione di sintesi del ditiocarbazato

In soluzione esso è presente in due forme tautomeriche 'tione-tiolo' in equilibrio tra loro a causa della presenza di funzioni tioammidiche -HN(C=S). Allo stato solido questi composti rimangono nella forma tautomerica di tione (Ali et al. 2005).

La forma tautomerica di tione è relativamente instabile nella forma monomerica e tende a convertirsi nel legame CS più stabile mediante enolizzazione se presente almeno un protone adiacente (Ali et al. 1977).

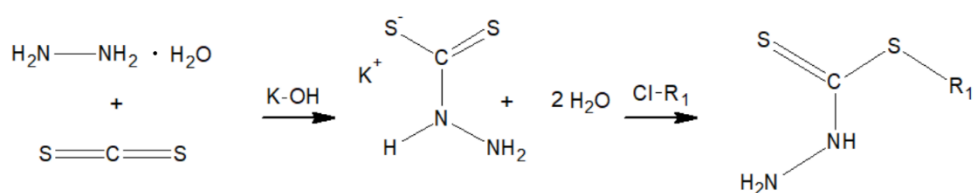


**Figura 13:** Forme di risonanza del DTCZ

I derivati del ditiocarbazato hanno quattro potenziali atomi donatori: due atomi di azoto e due atomi di zolfo. Questi quattro atomi donatori sono teoricamente disponibili per il coordinamento con ioni metallici; infatti, studi hanno dimostrato che i derivati del ditiocarbazato generalmente si comportano come leganti donatori di *N-S*, anche se in alcuni casi la sostituzione di gruppi organici sugli atomi di azoto porta alla chelazione di *S,S*.

Il ditiocarbazato *S*-sostituito si forma attraverso una sostituzione nucleofila dopo l'aggiunta di alogenuro organico.

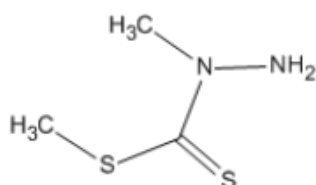




**Figura 14:** Reazione di sintesi del ditiocarbazato S-sostituito

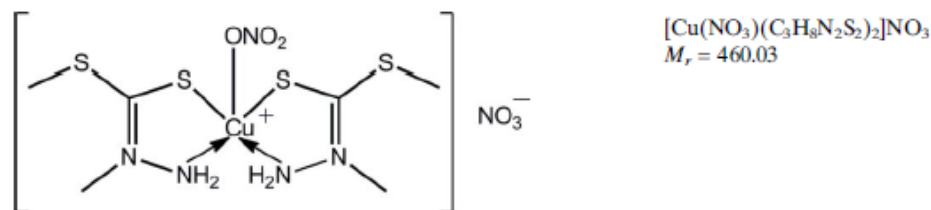
I leganti ditiocarbazato sostituiti in S ( $\text{H}_2\text{N}-\text{HN}-\text{C}(=\text{S})\text{S}-\text{R}_1$ ) hanno un gruppo amminico primario libero  $\text{NH}_2$  che è suscettibile alle reazioni di addizione nucleofila con aldeidi e chetoni per formare basi di Schiff.

Nel caso in cui il gruppo  $\text{R}_1$  dello zolfo e l'idrogeno dell'azoto vengano sostituiti da un gruppo metilico ( $-\text{CH}_3$ ) si ottiene l'*N*-metil,*S*-metil ditiocarbazato, DTCZ ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2$ ), chelante attualmente in studio per le sue capacità di complessarsi con diversi ioni metallici, tra cui il rame, con il quale può formare complessi utili come agenti antitumorali.



**Figura 15:** Struttura DTCZ

Al riguardo, in letteratura si trovano articoli inerenti ad un complesso metallico il nitrato di bis(2,*S*-dimetilditiocarbazato-*N*3,*S*)-(nitrato-*O*)rame(II), isolato come sottoprodotto di reazione ottenuto in seguito ad idrolisi di un legante tridentato base di *Schiff* messo a reagire con del nitrato di rame(II)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ .



**Figura 16:** Struttura del  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2)_2]\text{NO}_3$

Nel complesso  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2)_2]\text{NO}_3$ , l'atomo Cu(II) si trova all'interno di una geometria di coordinazione  $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}$  quadrata-piramidale distorta definita da due leganti bidentati N,S e un atomo di O derivato da un nitrato monodentato (Hazari et al. 2012).

### 1.5.2 Complessi metallici derivati dal ditiocarbazato

I complessi metallici dei derivati dal ditiocarbazato presentano caratteristiche strutturali uniche. Diversi studi hanno dimostrato che la coordinazione con ioni metallici fornisce, in alcuni casi, composti con una maggiore citotossicità e una maggiore attività biologica rispetto al legante libero corrispondente, anche nei confronti di cellule tumorali. Per queste motivazioni, complessi tra rame e ditiocarbazato, legante bidentato donatore di atomi N ed S, hanno suscitato notevole interesse per il loro potenziale uso terapeutico (Afrasiabi et al. 2005).

I composti derivati da ditiocarbazato e tiosemicarbazide sono tra gli agenti chelanti più studiati (Mayes et al. 2009). La presenza di atomi donatori di zolfo tenero e di azoto duro consente il coordinamento con un'ampia gamma di ioni metallici di transizione e non, producendo complessi metallici stabili con interessanti proprietà strutturali, fisico-chimiche e attività biologiche pronunciate. Essi si comportano generalmente come leganti bidentati (N,S) che formano anelli chelati a cinque membri. Gli ioni dei metalli di transizione sono buoni candidati per la realizzazione di complessi in quanto possiedono posti vacanti negli orbitali d e f che facilitano la coordinazione con i leganti. Metalli di transizione come manganese, cobalto, nichel e rame sono stati indagati intensamente, poiché possiedono stati di ossidazione

variabili, diversi numeri di coordinazione e sono inoltre capaci di legarsi ad un'ampia varietà di leganti attraverso atomi donatori quali O, S, N, P, C e alogenuri (Meggers, 2007).

La presenza nel legante di un atomo donatore aggiuntivo in una posizione adeguata, può incrementare la sua capacità di coordinazione aumentando la densità da mono a esa-dentato, dando origine a diverse geometrie e architetture di coordinazione con applicazioni potenzialmente benefiche nella scienza dei materiali (Morshedi et al. 2009).

Generalmente suddetti complessi vengono realizzati impiegando leganti con donatori di zolfo perché utili nel modificare le caratteristiche di idrofobicità (Ali et al. 1974).

### **1.5.3 Attività biologica**

Vista la limitazione all'uso dei farmaci derivati dal cis-platino nella cura di molte forme tumorali, i ricercatori si sono concentrati negli anni sulla sintesi di nuovi farmaci a base metallica. I principali fattori che influenzano l'attività biologica di un determinato composto sono: la forma della molecola, la capacità di chelare ioni metallici, la lipofilia, gli effetti sterici e quelli elettronici (Gringauz et al. 1997). Pertanto gli agenti a base metallica mostrano un potenziale nel trattamento del cancro introducendo la possibilità di meccanismi d'azione farmacologici unici attraverso la selezione del metallo centrale, le proprietà cinetiche del complesso, lo stato di ossidazione del metallo, il numero e il tipo di ligandi e la geometria di coordinazione adottata.

Il rame, come micronutriente essenziale per tutti gli organismi, svolge ruoli cruciali in funzioni biologiche critiche come il trasporto di ossigeno, il metabolismo energetico, la sintesi di melanina, la segnalazione cellulare e l'attività enzimatica. Inoltre, le cellule e i tessuti tumorali internalizzano più rame delle cellule normali tant'è che il suo metabolismo viene implicato nelle metastasi, nell'angiogenesi e nella crescita tumorale. Per questo motivo risulta essere uno degli ioni metallici maggiormente utilizzato nella sintesi di complessi in associazione con diverse tipologie di leganti.

Gli effetti antitumorali di questi leganti possono essere in parte attribuiti alla capacità di complessare il rame cellulare tumorale, portando al legame e all'inibizione del proteasoma e a sua volta avviando l'apoptosi specifica della cellula tumorale. Gli attuali agenti chemioterapici (cis-platino, carboplatino e oxaliplatino) sono altamente tossici e quindi la loro efficacia nell'eradicazione dei tumori è notevolmente limitata. Leganti donatori *S,N*, come i ditiocarbazati, possono dunque essere utilizzati con lo scopo di ridurre alcuni di questi effetti collaterali (Hogarth Graeme 2012). Molti scienziati si sono uniti alla ricerca di nuove terapie mirate nella speranza di ridurre la tossicità massimizzando la potenza; così facendo l'inibizione del proteasoma è diventata una terapia notevole a questo proposito.

## **1.6 MECCANISMO D'AZIONE DEI COMPLESSI DITIOCARBAZONICI DI RAME**

I complessi di rame hanno dimostrato di avere una minor tossicità ed un più ampio spettro di attività rispetto ai farmaci a base di platino, superando la resistenza acquisita dalle cellule tumorali a tale composto. Evidenze che vanno a supportare l'ipotesi che i complessi di rame abbiano un meccanismo d'azione diverso dai farmaci a base di cis-platino (Santini, et al. 2014).

Nonostante ciò, la maggioranza degli studi effettuati su essi si concentrano ancora sulla capacità di questi complessi di interagire con il DNA. È stato osservato che gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  interagiscono con elevata affinità al DNA causando lo svolgimento e il riavvolgimento della doppia elica e portando a mutazioni ed errori durante la trascrizione. Inoltre, essendo  $\text{Cu}^{2+}$  uno ione metallico redox attivo può causare danni ossidativi al DNA. In questo secondo caso è coinvolta la generazione di radicali liberi dell'ossigeno che causano scissione aspecifica dei filamenti. Questi cambiamenti conformazionali al DNA influenzano anche l'attività della polimerasi. Mentre gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  si coordinano con i gruppi fosfato e con le basi azotate, i complessi possono legarsi al DNA tramite interazioni non covalenti dipendenti dalla geometria di coordinazione e dalla natura del legante (Erxleben 2018).

Recenti studi hanno spostato l'attenzione verso altri possibili meccanismi d'azione che coinvolgono i complessi metallici a base di rame, evidenziando nuovi possibili bersagli tra cui la topoisomerasi e il complesso multiproteico del proteasoma 26S.

### 1.6.1 Inibizione dell'attività del proteasoma

Il proteasoma è un grande complesso multiproteico ATP-dipendente formato da: una parte centrale, il proteasoma 20S detto 'core', che esercita l'attività proteolitica e due cappucci, i complessi regolatori 19S. Questi complessi si associano tra loro formando il proteasoma 26S localizzato sia a livello nucleare che a livello citoplasmatico modulando e degradando le proteine intracellulari (Coux, Tanaka and Goldberg 1996).

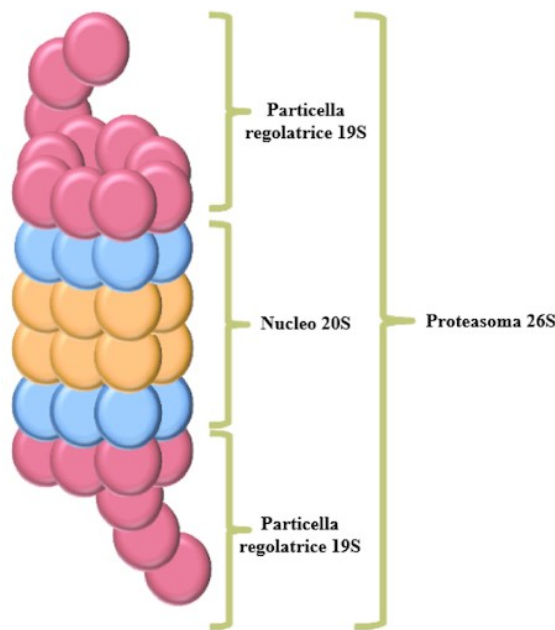
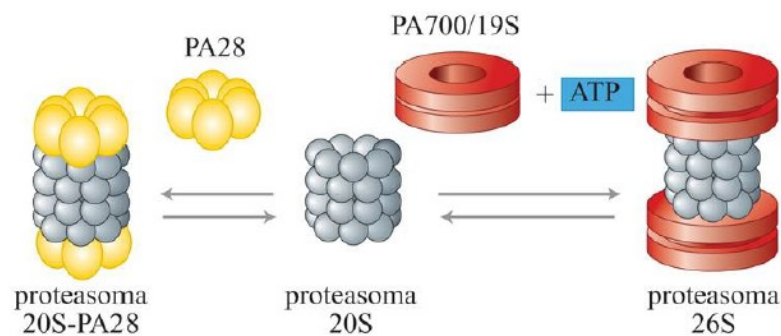


Figura 17: subunità proteasoma 26S

Il core centrale, ovvero il proteasoma 20S, è un complesso cilindrico cavo formato da quattro anelli, costituiti da ventotto polipeptidi totali impilati l'uno sull'altro. Gli anelli più esterni sono composti da sette diverse subunità  $\alpha$  mentre in quelli interni sono presenti altrettante subunità  $\beta$  (Baumeister et al. 1998). Le subunità  $\alpha$  hanno il compito di regolare l'entrata e l'uscita dei substrati dal citoplasma formando una sorta di barriera selettiva tra esso e la camera catalitica del proteasoma. Le subunità

$\beta$  invece contengono i siti catalitici che si affacciano sulla parte interna del cilindro (Jung, Catalgol and Grune 2009). Il core, dunque, contiene sei siti attivi (tre in ogni anello  $\beta$ ) aventi differente attività proteolitica: due presentano attività 'chimotripsino-simile' (CT-L) tagliando dopo i residui idrofobici, due eseguono un taglio 'tripsino-simile' (T-L) a seguito di amminoacidi basici e due rompono i legami peptidici dopo residui acidi con attività 'caspasi-simile' (C-L) (Kisselev and Goldberg 2001).

I complessi 19S hanno il compito di controllare l'ingresso dei substrati nel core del proteasoma. Ciascuno di essi è formato da una base e da una copertura. Quest'ultima contiene almeno nove polipeptidi e si lega alla catena poliubiquinata con elevata affinità tagliandola dal substrato. La base, formata invece da otto polipeptidi, si associa alle estremità del proteasoma 20S (Kohler et al. 2001).



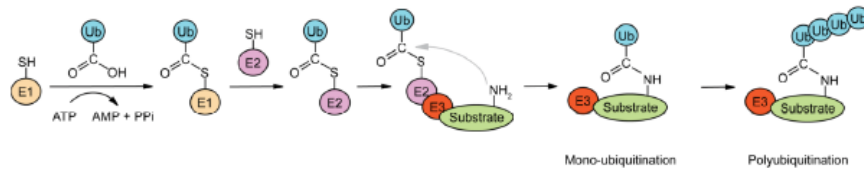
**Figura 18:** Assemblaggio del proteasoma 26S

Il processo di degradazione proteolitica mediata dal proteasoma può essere distinto in due fasi:

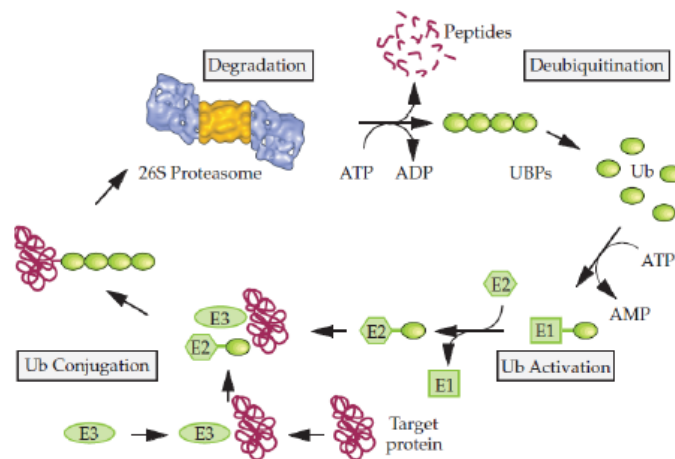
1. Formazione di legami covalenti tra molecole di ubiquitina e la proteina target;
2. Degradazione della proteina poliubiquitinata da parte del core del proteasoma 26S.

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) svolge un ruolo essenziale nella degradazione di oltre l'80% delle proteine intracellulari. Con il termine ubiquitinazione si intende un processo di legame covalente dell'ubiquitina ad una

proteina target, altamente regolato, il quale coinvolge diversi enzimi. L'ubiquitina è una piccola proteina costituita da 76 residui di amminoacidi presenti nelle cellule eucariotiche. L'attivazione dell'ubiquitina avviene ad opera dell'enzima E1 il quale utilizza l'energia dell'idrolisi dell'ATP per formare un legame tioestere tra sé stesso e l'ubiquitina. Successivamente all'attivazione l'ubiquitina viene trasferita all'enzima coniugante E2 che agisce formando un tioestere dell'ubiquitina. Lo step successivo è catalizzato da un'ubiquitina ligasi ovvero dall'enzima E3 che porta alla formazione di un isopeptide tra il gruppo C-terminale dell'ubiquitina e il gruppo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> dei residui di lisina della proteina substrato. A questo punto la maggior parte della proteina bersaglio, modificata da questa catena di poliubiquitina, viene riconosciuta e degradata dal complesso proteasoma 26S (Yang et al. 2021).



**Figura19:** Formazione della proteina poliubiquitinata (Brugarolas et al. 2012).



**Figura 20:** Meccanismo d'azione del sistema ubiquitina-proteasoma (Voges et al. 1999).

Il proteasoma è essenziale per diverse funzioni cellulari tra cui: il controllo della progressione del ciclo cellulare, l'attivazione dell'apoptosi, la regolazione

dell'espressione genica e lo sviluppo della risposta infiammatoria (Nalepa, Rolfe and Harper 2006).

Il sistema proteasoma 26S assume quindi notevole importanza per le cellule tumorali in quanto regola i meccanismi di proliferazione, apoptosi e angiogenesi e formazione di metastasi. Per tutti questi motivi si è pensato di utilizzare degli inibitori del proteasoma per realizzare nuove potenziali terapie antitumorali. È stato evidenziato che cellule sane e cellule tumorali rispondono in modo diverso all'inibizione del proteasoma: per quanto riguarda le cellule non tumorali, inibito il proteasoma, esse vanno incontro ad un arresto del ciclo cellulare, mentre le cellule tumorali nelle stesse condizioni rispondono innescando il processo apoptotico (Adams 2003). Per questo motivo colpire il sistema ubiquitina-proteasoma è risultato una strategia antitumorale favorevole. Attualmente sono diversi gli inibitori del proteasoma in uso nonostante presentino vari effetti collaterali. Per questa ragione la ricerca di nuovi farmaci è in fase di evoluzione. Negli ultimi anni è stato dimostrato che diversi complessi di rame sono in grado di inibire l'attività del proteasoma *in vitro* e *in vivo*. Vari chelanti tra cui la 8-idrossichinolina, il ditiocarbamato e il cliochinolo, possono reagire con i sali di rame formando dei complessi in grado di agire da inibitori del proteasoma fino ad indurre l'apoptosi in colture di cellule tumorali umane (Zhang et al. 2017). Anche la complessazione del rame da parte della pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) porta ad un composto in grado di inibire le funzioni del proteasoma ed indurre la morte in cellule umane di tumore alla mammella (MDA-MB-231) e tumore alla prostata. Infine, il complesso rame-pirritione esercita un'azione antitumorale in quanto è in grado di inibire la crescita cellulare legandosi al sito attivo dei complessi regolatori 19S del proteasoma (Che et al. 2021).

### **1.6.2 Complessi di rame come inibitori della Topoisomerasi I, II**

Gli inibitori della topoisomerasi sono agenti antitumorali utilizzati in monoterapia o in strategie polifarmacologiche. Le topoisomerasi sono enzimi nucleari che regolano l'avvolgimento del DNA svolgendo funzioni essenziali nella replicazione e nella trascrizione dello stesso. In particolare, le topoisomerasi I creano discontinuità transitorie del singolo filamento, mentre le topoisomerasi II creano



rottture transitorie del DNA a doppio filamento. Per questi motivi esse rappresentano un bersaglio per la chemioterapia antitumorale al punto che, i loro inibitori, sono componenti essenziali di molti regimi terapeutici (Qin et al. 2007). Gli inibitori delle topoisomerasi vengono classificati in due gruppi: 'veleni delle topoisomerasi' e 'inibitori catalitici'. I primi stabilizzano il complesso di scissione reversibile, formato tra topoisomerasi e DNA, formando un complesso ternario. I secondi, colpiscono prevalentemente la Topo II prevenendo la scissione dei filamenti di DNA attraverso l'inibizione dell'attività dell'ATPasi, per cui andando ad impedire l'idrolisi dell'ATP bloccano la dissociazione delle topoisomerasi dal DNA. In ogni caso gli inibitori convertono l'enzima topoisomerasi in uno strumento per uccidere (Molinaro et al. 2020).

### **1.6.3 Variazione dell'equilibrio redox indotto da complessi metallici**

La tossicità cellulare del rame dovuta alla produzione di ROS può essere sfruttata anche nella terapia antitumorale. Sia gli ioni Cu(I) che quelli Cu(II) partecipano alla reazione di ossido-riduzione e in presenza di specie superossido o di agenti riducenti quali, acido ascorbico o glutazione, il Cu(II) può essere ridotto a Cu(I) catalizzando la formazione di radicali idrossili a partire dal perossido di idrogeno tramite la reazione di Haber-Weis. Il radicale idrossile, specie molto reattiva, è poi in grado di interagire con molecole biologiche sottraendo un idrogeno ad un carbonio a cui è legato un gruppo amminico portando alla formazione di proteine e acido grassi radicalici con conseguente danno ossidativo per la cellula (Koppenol et al. 2001).

Lo squilibrio redox che si viene a creare induce l'innescò del processo apoptotico. Per tali ragioni sono stati utilizzati, in alcune occasioni, complessi di rame(II) come potenziali agenti antiproliferativi nella chemioterapia antitumorale sfruttando la capacità di tali complessi di indurre l'accumulo di ROS, coerentemente con i loro potenziali redox, in alcune linee cellulari tumorali umane innescando l'attivazione di meccanismi di difesa antiossidante da parte della cellula stessa (Sîrbu et al. 2017).

Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) è un importante ROS prodotto dalla catena respiratoria mitocondriale. In condizioni normali gli enzimi antiossidanti convertono il radicale superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) in  $H_2O_2$ , e l'ossidasi (CAT) o la glutazione

perossidasi (GPX) lo decompongono in acqua, mantenendo l'equilibrio redox delle cellule (Costa, Scholer-Dahirel, and Mechta-Grigoriou 2014).

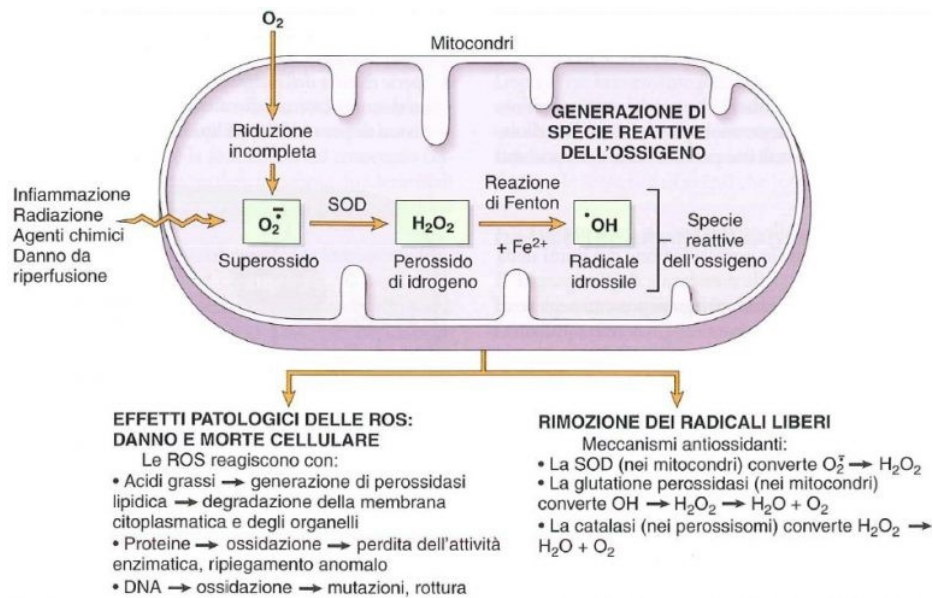


Figura 21: Ruolo dei ROS nel danno cellulare (Kumar et al. 2015).

Studi elettrochimici hanno mostrato che i complessi di rame(II) possiedono proprietà di ossidoriduzione quasi reversibili. Per tale motivo essi possono indurre la reazione di Fenton all'interno della cellula per produrre ROS come: radicali idrossilici e radicali superossido a partire dal perossido di idrogeno (Qi et al. 2018).



L'accumulo di ROS è inoltre uno dei modi principali per causare danno mitocondriale. I mitocondri svolgono un importante ruolo regolatorio nella crescita cellulare, nella proliferazione, nella differenziazione, nella morte e in altre attività vitali e per questo risultano essere un bersaglio di molti farmaci. A tal proposito è stato osservato che l'esposizione cellulare ai complessi di Cu(II) causa una significativa diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale, fenomeno che determina apoptosi. Proprio per questo viene preso in considerazione come possibile target per una terapia antitumorale (Qi et al. 2018).

Il sovraccarico intracellulare di ROS che si viene a formare utilizzando complessi di rame(II) può danneggiare significativamente il DNA, i lipidi e le proteine di membrana portando inoltre a danni secondari al DNA indotti da una risposta allo

stress ossidativo che, come conseguenza, porta alla morte cellulare (Yang et al. 2016).

## 2. OBIETTIVO DELLA TESI

Questo progetto di tesi sperimentale si contestualizza nell'ambito della ricerca di potenziali nuovi farmaci antitumorali del tipo *metal-based*, aventi il rame come centro metallico.

Lo sviluppo di questi nuovi composti a base metallica è stato favorito dalla scoperta delle proprietà antineoplastiche del cis-platino. Quest'ultimo nonostante il suo enorme successo nel trattamento di un'ampia gamma di neoplasie ha mostrato elevata tossicità sistemica e comparsa di resistenza che ne ha, di conseguenza, notevolmente limitato l'utilizzo in ambito clinico.

Per queste ragioni, si è cercato negli ultimi anni, di portare alla luce nuovi centri metallici, diversi dal platino, identificando nuovi meccanismi d'azione con lo scopo di sviluppare complessi metallici che potessero superare i limiti dettati dall'uso del cis-platino e dei suoi analoghi.

In questo ambito di studio, l'attenzione si è direzionata nei confronti di complessi di rame come potenziali agenti antitumorali in quanto, essendo un oligoelemento essenziale per l'organismo ed un cofattore implicato in molteplici processi fisiologici, può avere una tossicità minore rispetto ad altri metalli esogeni.

Diverse evidenze scientifiche dimostrano che i complessi di rame esplicano la loro attività antiproliferativa con un meccanismo d'azione diverso da quello del cis-platino e, per questo motivo, potrebbero garantire un più ampio spettro d'azione e risultare efficaci contro tumori insensibili o resistenti ai trattamenti chemioterapici convenzionali. I complessi *metal-based* ottenuti a partire dal rame offrono dunque nuove modalità di intervento per la terapia chemioterapica a seguito di un suo alterato metabolismo nelle cellule tumorali rispetto a quelle non tumorali con conseguente accumulo all'interno delle prime. Ciò ha aperto la strada ad una nuova interessante strategia nelle cure.

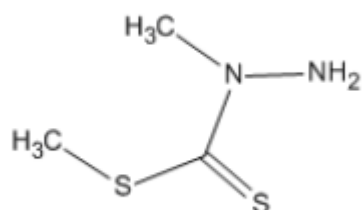
Durante il progetto di tesi mi sono dedicata alla sintesi e caratterizzazione di tre complessi metallici di Cu(II) con legante ditiocarbazato (DTCZ), e successivamente alla valutazione dell'attività citotossica, su cellule tumorali umane, nel laboratorio della Professoressa Valentina Gandin all'interno del Dipartimento di Scienze del farmaco dell'Università di Padova.

Per quanto riguarda la sintesi è stato utilizzato il legante DTCZ, sintetizzato dalla Dott.ssa Cristina Bolzati, e sali diversi di  $\text{Cu}^{2+}$ , disponibili in commercio, quali:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{CuSO}_4$ .

I complessi ottenuti sono stati successivamente caratterizzati mediante spettrometria di massa ESI(+), spettrometria IR e analisi elementare al fine di determinare la purezza del prodotto di sintesi e verificare l'esatta stechiometria di reazione. Sono inoltre stati eseguiti anche studi di stabilità, con spettrofotometro UV-visibile.

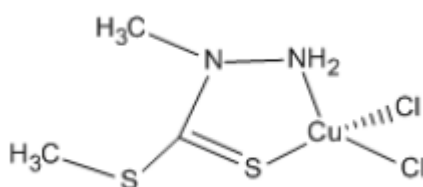
In conclusione è stata valutata, per ogni singolo complesso e per il legante libero, l'attività citotossica *in vitro* su un ampio pannello di linee cellulari tumorali, sia sensibili che resistenti al platino, in colture tridimensionali attraverso l'APH assay.

Di seguito sono riportate le strutture chimiche del legante e dei complessi sintetizzati e testati in questo lavoro di tesi.



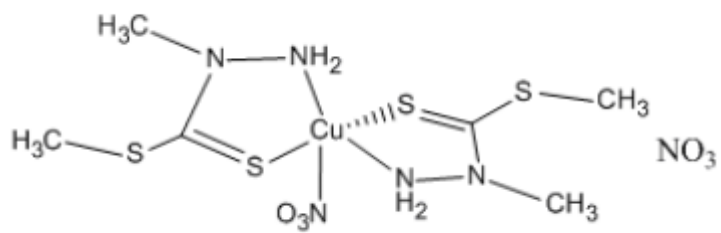
**Figura 22:** Legante N-metil,S-metil ditiocarbazato

MW: 136.23 uma



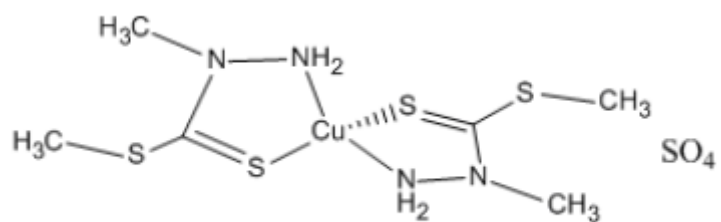
**Figura 23:** complesso Cu1 [Cu(DTCZ)Cl<sub>2</sub>]

MW: 270.68 uma



**Figura 24:** complexo Cu<sub>2</sub> [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>

MW: 460.02 uma



**Figura 25:** complexo Cu<sub>3</sub> [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]

MW: 336.01 uma

### 3. PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 MATERIALI, STRUMENTAZIONI E METODI

Il Legante N-metil,S-metil ditiocarbazato (DTCZ) è stato sintetizzato dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Bolzati.

Tutti i restanti reagenti ed i solventi utilizzati nelle sintesi descritte sono stati acquistati da *Sigma-Aldrich Chemicals*.

L'analisi elementare (C, H, N, S) è stata effettuata mediante strumento *Carlo Erba 1106*.

Gli spettri IR sono stati registrati allo stato solido in pastiglie di KBr con uno spettrofotometro *nicolet-IS10 Thermoscientific*, lavorando nella regione compresa tra i 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

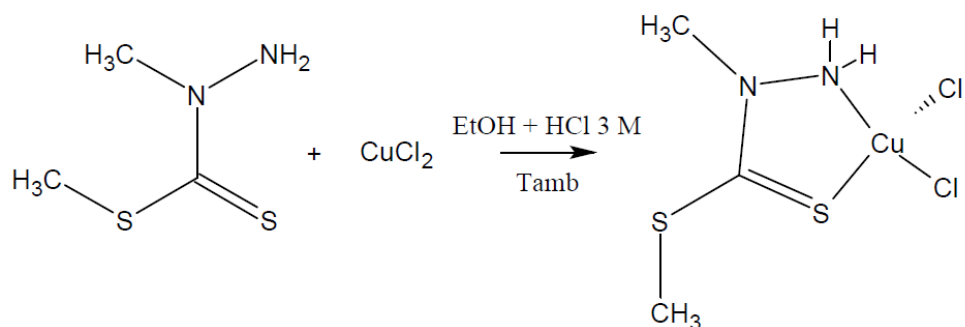
Gli spettri di massa sono stati ottenuti con uno spettrofotometro *ESI-MS LCQ Fleet Thermoscientific* attraverso l'analisi di una soluzione diluita degli analiti in acqua e acetonitrile al 50%.

Gli spettri UV-visibili, relativi alla stabilità nel tempo dei complessi sintetizzati, sono stati registrati con uno spettrofotometro *Agilent Technologies Cary60*.

## 3.2 SINTESI DEI COMPLESSI DI Cu(II)

### 3.2.1 Complesso [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] (Cu1)

Reazioni:



Procedimento:

0,088 mmol (15 mg) di cloruro di rame (CuCl<sub>2</sub>) vengono solubilizzati in 20 ml di EtOH acido per HCl 3M (6 gocce). Allo stesso modo vengono portati in soluzione 0,202 mmol (27.57 mg) di legante DTCZ.

In un pallone di reazione vengono messe a contatto le due soluzioni che reagiscono sviluppando, nel giro di pochi secondi, una soluzione color verde acceso e la rapida formazione di un precipitato verde. La reazione viene condotta per circa due ore a temperatura ambiente in continua agitazione, tramite l'ausilio di un agitatore magnetico.

Trascorse due ore la soluzione appare limpida con abbondante precipitato verde acceso. A questo punto si procede con la filtrazione, su apposito filtro, al fine di recuperare il precipitato sul quale vengono poi eseguiti in successione una serie di lavaggi con etanolo acido seguito da diclorometano ed etere etilico. Durante tali passaggi il precipitato rimane sul filtro mentre le acque di lavaggio, raccolte nel pallone sottostante risultano limpide, ad indicare che la filtrazione e i successivi lavaggi non hanno solubilizzato il prodotto di reazione, ma esclusivamente le impurezze solubili eventualmente presenti.

Il filtro contenente il prodotto finale viene poi posto ad asciugare in pompa e trasferito in una vial.



Il decorso della reazione è stato valutato mediante cromatografia su strato sottile (TLC), eseguita deponendo su una lastra di gel di silice (fase stazionaria) i due prodotti di partenza, CuCl<sub>2</sub> e DTCZ, e campioni dalla miscela di reazione prelevati ad intervalli regolari di tempo.

Fase Mobile: [(NH<sub>4</sub>)Ac 1M + MeOH] in rapporto 1:4;

RF CuCl<sub>2</sub> = 0 → 0,2

RF DTCZ = 0,84

RF [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] = 0

L'analisi è stata condotta anche sul prodotto finale, che è risultato privo di impurezze (purezza > 95%).

Caratterizzazione:

**Formula chimica:** C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

**Massa esatta:** 268,88 uma

**Peso Molecolare:** 270,68 uma

**Aspetto:** solido, verde acceso; resa 74%

**Solubilità:** il complesso è solubile in H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O 0,9% NaCl, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, DMSO; insolubile in CH<sub>3</sub>CHCH<sub>3</sub>.

**Analisi Elementare:**

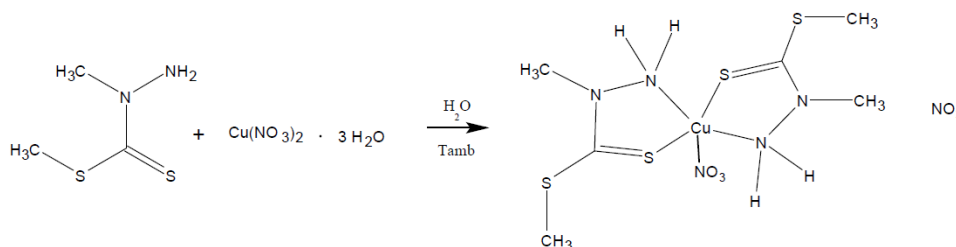
	<i>C%</i>	<i>H%</i>	<i>N%</i>	<i>S%</i>	<i>Cl%</i>
<i>Teorico</i>	13.31	2.98	10.35	23.69	26.19
<i>Sperimentale</i>	13.35	2.68	10.14	22.77	

**ESI(+)-full-MS in H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 (m/z, abbondanza %):** 199.07 ([Cu(DTCZ)]<sup>+</sup>, 39); 240.04 ([Cu(CH<sub>3</sub>CN)(DTCZ)]<sup>+</sup>, 97).

**IR (KBr cm<sup>-1</sup>) v:** 1610(C=S) ; v : 3066, 1412(CH<sub>3</sub>) ; v : 1314(NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) ; v : 1170(C-N) ; v : 3447(NH)

### 3.2.2 Complesso $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (Cu2)

#### Reazioni:



#### Procedimento:

0,103 mmol (25 mg) di nitrato di rame ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) vengono solubilizzati in acqua distillata. Allo stesso modo vengono portati in soluzione 0,238 mmol (32,43 mg) di legante DTCZ con del EtOH.

In un pallone da reazione vengono messe a contatto le due soluzioni, che reagendo tra loro, sviluppano una colorazione nera. La reazione viene condotta per circa due ore a temperatura ambiente in continua agitazione, tramite l'ausilio di un agitatore magnetico.

Trascorse due ore la soluzione si presenta con limpida senza chiara presenza di precipitato.

Si procede dunque, all'evaporazione del solvente in eccesso insufflando all'interno del pallone dell'azoto, grazie al quale si nota che sulle parate del pallone è presente del precipitato blu/viola che appare come una polvere granulosa. A questo punto si riprendere il precipitato con qualche mL di etanolo e si trasferisce il tutto in un filtro in modo tale da procedere con le successive fasi di lavaggio operate con etanolo seguito da diclorometano ed etere etilico. Durante tali passaggi il precipitato rimane sul filtro mentre le acque di lavaggio, raccolte nel pallone sottostante risultano limpide, ad indicare che la filtrazione e i successivi lavaggi non hanno solubilizzato il prodotto di reazione, ma esclusivamente le impurezze solubili eventualmente presenti.

Al termine il filtro contenente il prodotto finale viene posto ad asciugare in pompa da vuoto e trasferito in una vial.

Il decorso della reazione è stato valutato mediante cromatografia su strato sottile eseguita deponendo su una lastra di gel di silice i due prodotti di partenza,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

e DTCZ, e campioni della miscela di reazione prelevati ad intervalli regolari di tempo.

Fase Mobile: [(NH<sub>4</sub>)Ac 1M + MeOH] in rapporto 1:4;

RF Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = 0 → 0,1

RF DTCZ = 0,83

RF [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub> = 0

L'analisi è stata condotta anche sul prodotto finale, che è risultato privo di impurezze (purezza > 95%).

Caratterizzazione:

**Formula chimica:** C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>CuN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>

**Massa esatta:** 458,93 uma

**Peso Molecolare:** 460,02 uma

**Aspetto:** solido cristallino, blu/viola; resa 83%

**Solubilità:** il complesso è solubile in H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O 0,9% NaCl, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, DMSO; insolubile in CH<sub>3</sub>CHCH<sub>3</sub>.

**Analisi Elementare:**

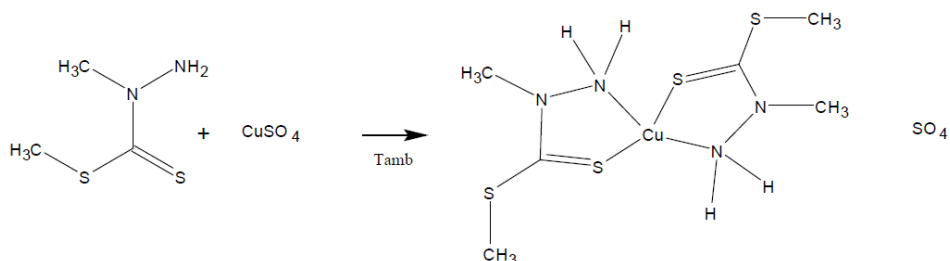
	<i>C%</i>	<i>H%</i>	<i>N%</i>	<i>S%</i>
<i>Teorico</i>	15.67	3.15	18.27	27.88
<i>Sperimentale</i>	15.57	3.34	18.09	27.73

**ESI(+)-full-MS in H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 (m/z, abbondanza %):** 334.02 ([Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]-H<sup>+</sup>, 97); 240.03 ([Cu(DTCZ)CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>, 62); 199.08 ([CuDTCZ]<sup>+</sup>, 45); 136.07 ([DTCZ+H<sup>+</sup>], 20).

**IR (KBr cm<sup>-1</sup>) v:** 1240 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); v: 1384(NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); v: 1624(C=S)

### 3.2.3 Complesso [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Cu3)

#### Reazioni:



#### Procedimento:

0,129 mmol (20 mg) di solfuro di rame (CuSO<sub>4</sub>) vengono solubilizzati in acqua, allo stesso modo vengono portati in soluzione 0,297 mmol (40.65 mg) di legante DTCZ ad opera di EtOH.

In un pallone di reazione vengono messe a contatto le due soluzioni che reagiscono sviluppando, nel giro di pochi secondi, una soluzione color blu scuro. La reazione eseguita a temperatura ambiente e in costante agitazione si presenta, dopo un paio di ore, con un lieve precipitato bluastro.

Si procede con la filtrazione del precipitato, che nonostante l'ausilio di filtri di opportuna porosità, durante le fasi di lavaggio penetra nel pallone sottostante.

A questo punto si asciuga il solvente insufflando all'interno del pallone dell'azoto per poi riprendere il precipitato con etanolo. Il tutto viene filtrato nuovamente e lavato con EtOH, diclorometano ed etere etilico. Il filtro contenente il prodotto finale viene poi posto ad asciugare in pompa e trasferito in una vial.

Il decorso della reazione è stato valutato mediante TLC eseguita deponendo su una lastra di gel di silice i due prodotti di partenza, CuSO<sub>4</sub> e DTCZ, e campioni della miscela di reazione prelevati ad intervalli regolari di tempo.

Fase Mobile: [(NH<sub>4</sub>)Ac 1M + MeOH] in rapporto 1:4;

RF CuSO<sub>4</sub> = 0

RF DTCZ = 0,84

RF [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] = 0

L'analisi è stata condotta anche sul prodotto finale, che è risultato privo di impurezze (purezza > 95%).

Caratterizzazione:

**Formula chimica:** C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>5</sub>

**Massa esatta:** 430,91 uma

**Peso Molecolare:** 432,06 uma

**Aspetto:** solido cristallino, blu/viola; resa 80%

**Solubilità:** il complesso è solubile in H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O 0,9% NaCl, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, DMSO; insolubile in CH<sub>3</sub>CHCH<sub>3</sub>.

**Analisi Elementare:**

	<i>C%</i>	<i>H%</i>	<i>N%</i>	<i>S%</i>
<i>Teorico</i>	16.68	3.73	12.97	37.10
<i>Sperimentale</i>	16.00	3.67	12.25	35.08

**ESI(+)-full-MS in H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 (m/z, abbondanza %):** 334.02 ([Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]-H<sup>+</sup>, 97); 240.03 ([Cu(DTCZ)CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>, 62); 199.08 ([CuDTCZ]<sup>+</sup>, 45); 136.07 ([DTCZ+H<sup>+</sup>], 20).

**IR (KBr cm<sup>-1</sup>) v:** 1636(C=S); v : 1117(SO<sub>4</sub><sup>-</sup>)

### 3.3 STUDIO DI STABILITÀ

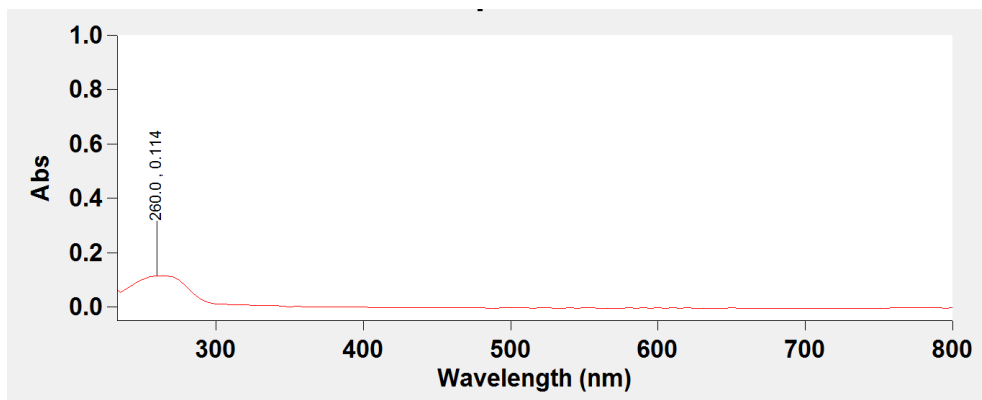
Un requisito chiave per lo sviluppo di un nuovo complesso è la stabilità chimica. Con tale termine si intende il mantenimento della struttura chimica identificata in un determinato intervallo di tempo. Lo studio della stabilità dei complessi è fondamentale, nella fase di *discovery*, al fine di procedere alla valutazione dell'attività biologica. Viene richiesta la stabilità del complesso dal momento in cui viene sintetizzato fino alla valutazione biologica, ma anche dal momento in cui viene solubilizzato, in apposito solvente, per i saggi biologici.

La stabilità viene valutata, in soluzione, mediante analisi UV-visibile utilizzando uno spettrometro *Agilent Technologies Cary60*. I complessi ed il legante libero sono stati solubilizzati dapprima in soluzione fisiologica e successivamente diluiti in 2mL di terreno bianco privo di siero e gli spettri sono stati registrati al tempo 0, dopo 24, 48 e 72 ore dalla solubilizzazione ad un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 200nm e 800nm in cuvette di quarzo. Durante il tempo intercorso tra un'analisi e l'altra, le soluzioni sono state conservate al buio a temperatura ambiente.

Per evitare l'insorgenza di muffa, sono stati preparati, in un primo momento, quattro tubi differenti per ciascun composto (T0, T24, T48 e T72), in ambiente sterile.

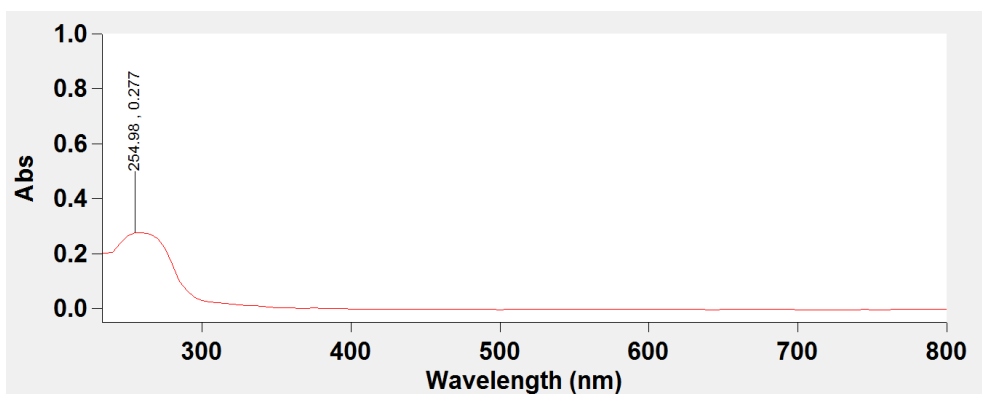
Come prima cosa è stata preparata, per ciascun composto, una soluzione madre solubilizzando i vari composti in acqua fisiologica su cui è stata poi eseguita una diluizione 1:10. Partendo da tale soluzione si preleva, per ciascun composto, il quantitativo di soluzione idonea per ottenere una concentrazione finale di 25 $\mu$ M in 2mL di terreno bianco ovvero RPMI bianco privo di siero che altrimenti, essendo ricco in proteine, maschererebbe il segnale di assorbanza dei campioni.

Spettro UV legante DTCZ

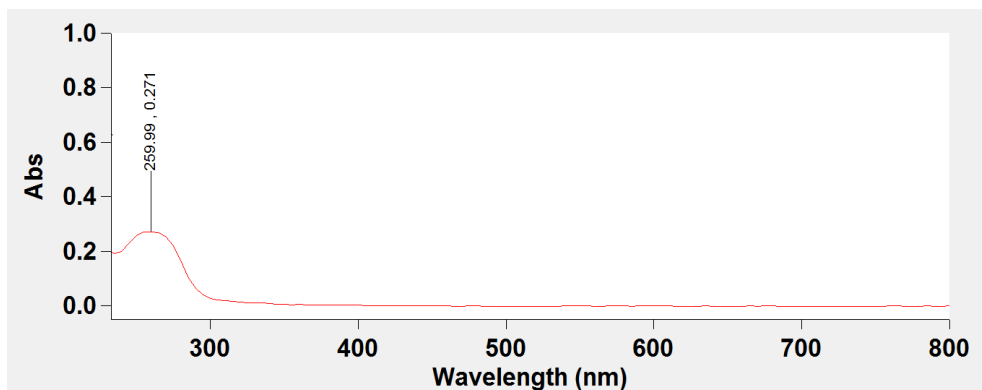


Spettro UV complesso Cu1 – [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] rispettivamente a T0, T24, T48 e T72

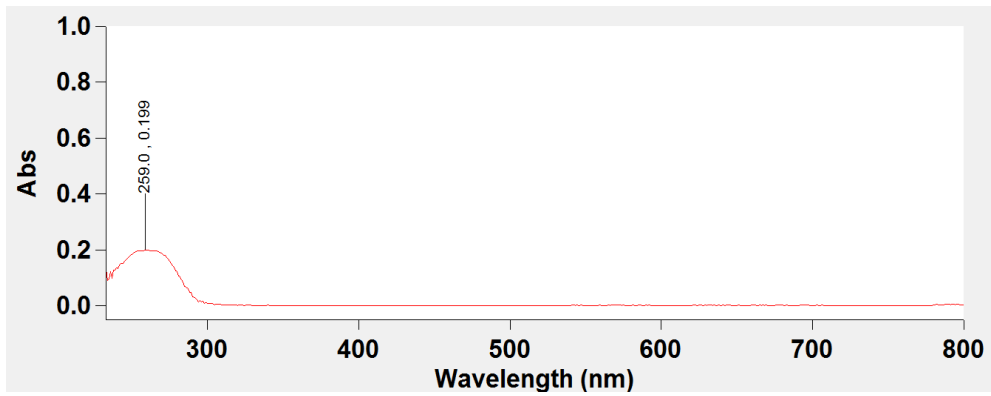
T0



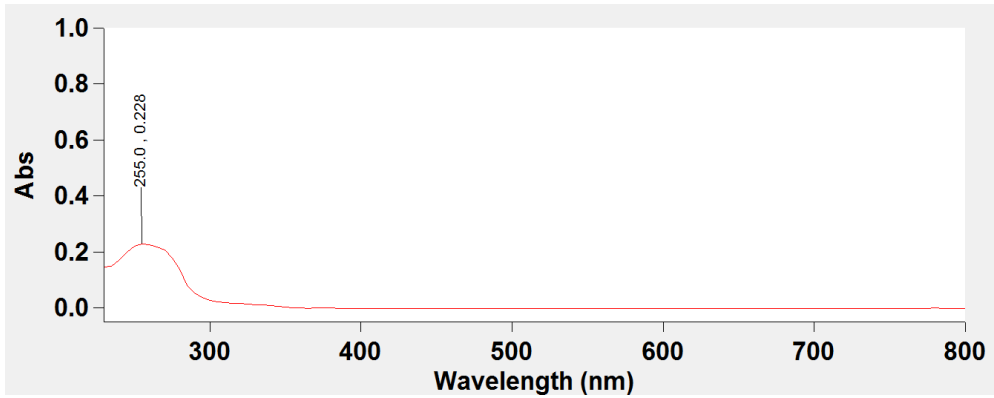
T24



T48

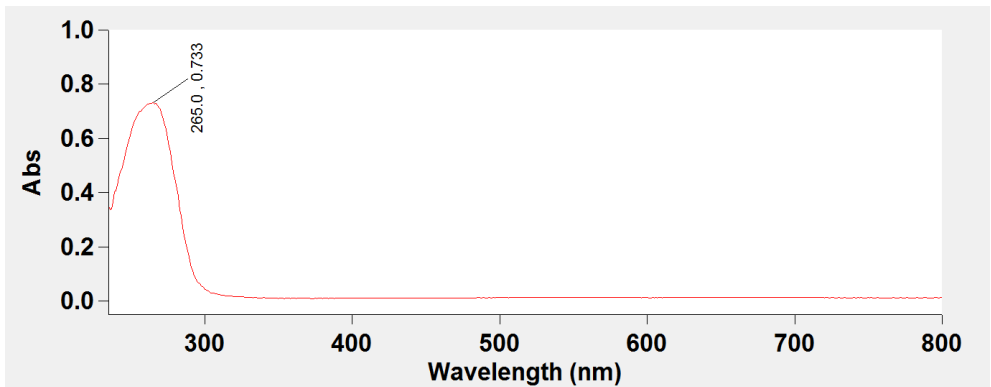


T72



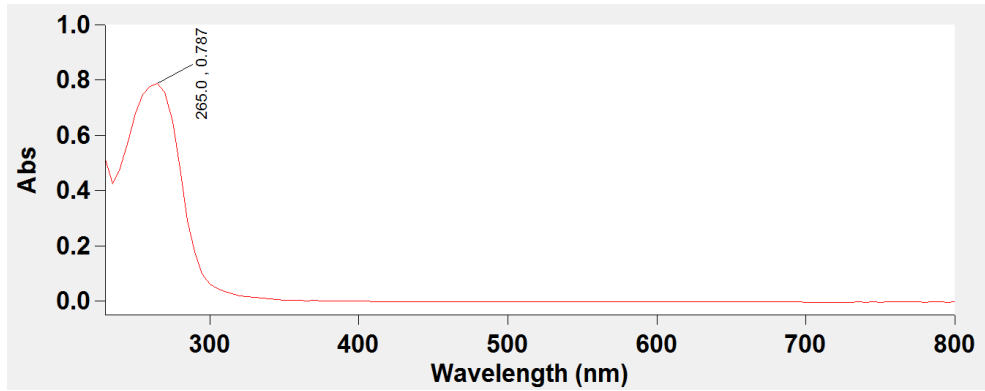
Spettro UV complesso  $\text{Cu}^{2+}$  -  $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$  rispettivamente a T0, T24, T48 e T72

T0

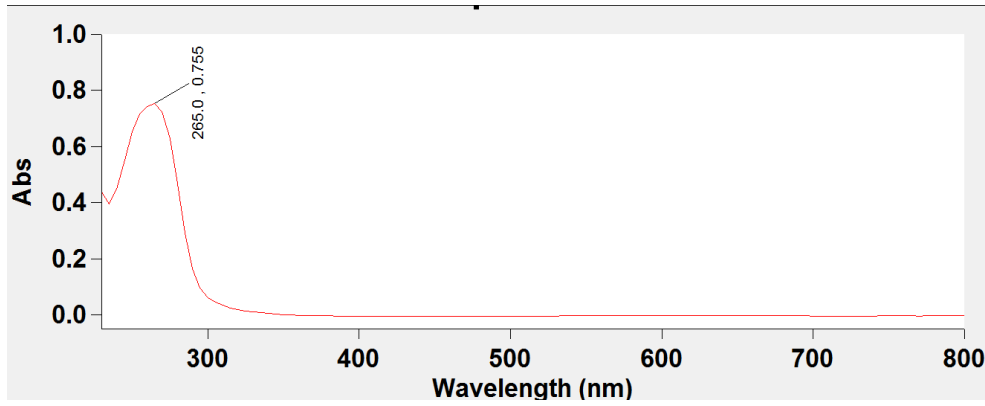




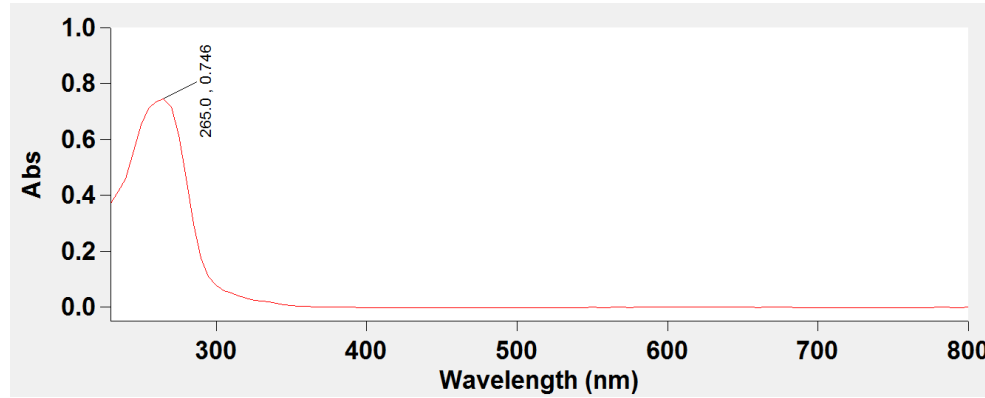
T24



T48

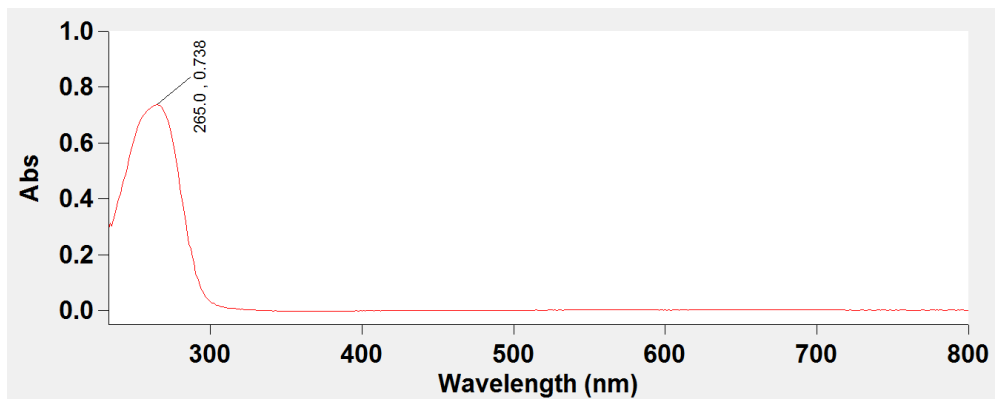


T72

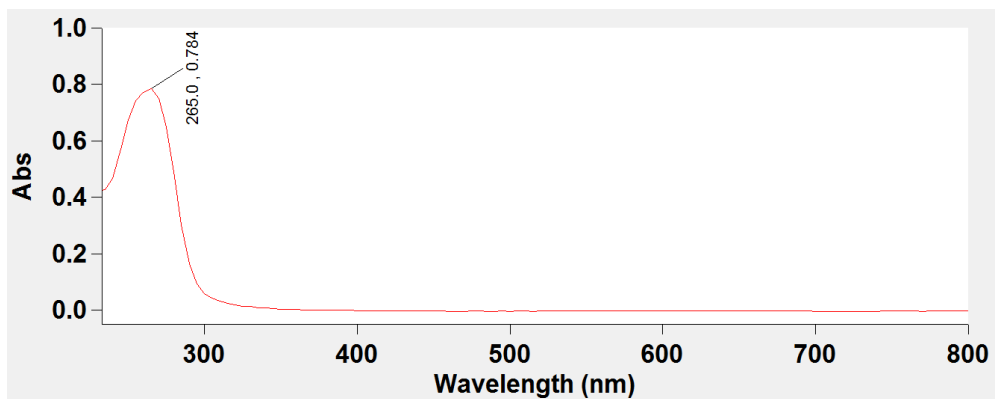


Spettro UV complesso Cu3 - [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]SO<sub>4</sub> rispettivamente a T0, T24, T48 e T72

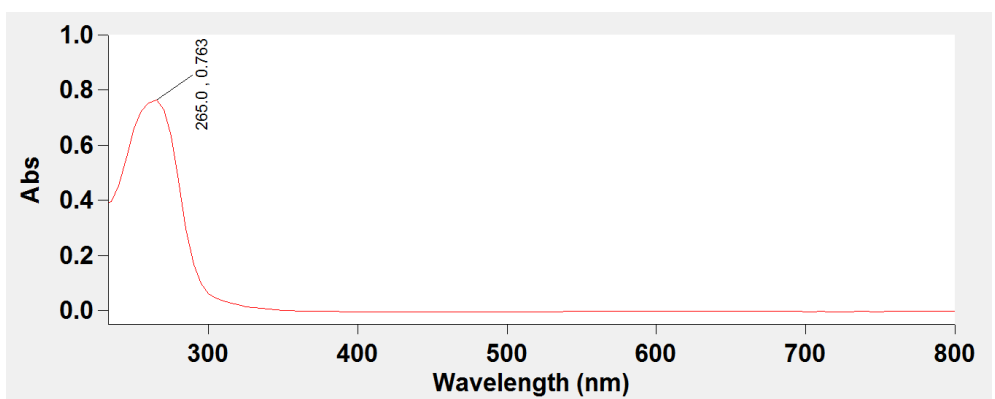
T0



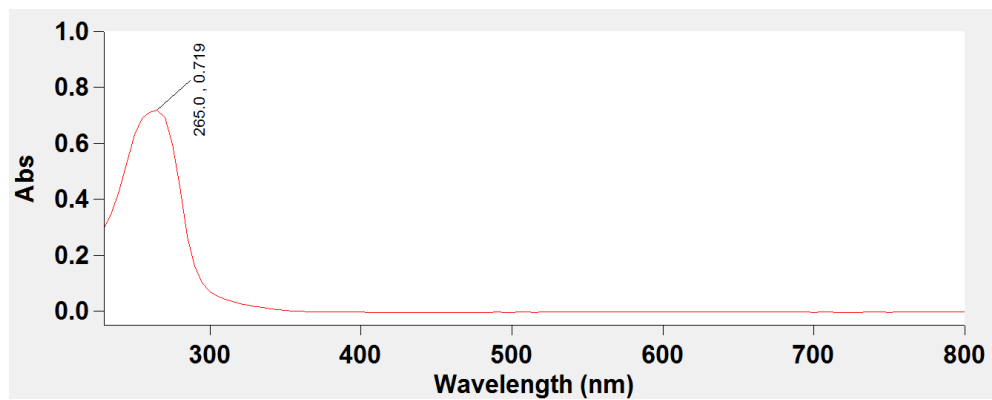
T24



T48



T72



## 3.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA: MATERIALI E METODI

### 3.4.1 Reagenti

La sostanza di riferimento utilizzata nei saggi di citotossicità è il cis-platino (*Sigma Chemical* St. Louis, MO.USA). Il colorante MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio bromuro), l'SDS (sodio dodecilsolfato), l'antibiotico (soluzione di penicillina 50 U/mL, streptomina 50 µg/mL) sono forniti dalla ditta *Sigma Aldrich*. I terreni coltura utilizzati, ovvero RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), F-12 Ham's (*Nutrient Mixture F-12 Ham Formulation*), il siero fetale bovino, la tripsina 2,5% e la glutammina sono forniti dalla ditta Euroclone (Milano, Italia).

Il PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) viene preparato in laboratorio solubilizzando in acqua NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> rispettivamente alle concentrazioni di 137 mmol/L, 2,7 mmol/L, 10 mmol/L e 2,8 mmol/L. Il pH della soluzione deve essere 7,4.

Per tutte le prove di citotossicità i composti R4, R12 ed R15 sono stati solubilizzati in H<sub>2</sub>O 0,9% NaCl.

### 3.4.2 Linee cellulari e condizioni di crescita

Le linee cellulari vengono preparate in *flasks* da 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup> e mantenute in fase logaritmica a 37°C in stufa termostatica a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) e in ambiente fortemente umidificato. I terreni di coltura utilizzati contengono il 10% di siero fetale bovino, antibiotici (penicillina: 50 unità·ml<sup>-1</sup>; streptomina: 50 µg·ml<sup>-1</sup>) e glutammina 2mM.

Il siero fetale, una volta scongelato, viene mantenuto per mezz'ora a 57°C con lo scopo di denaturare le proteine del complemento e, dopo raffreddamento a temperatura ambiente, ripartito in volumi di 10 ml per essere utilizzato nella preparazione dei terreni. Per l'allestimento delle subcolture e per il conteggio delle popolazioni cellulari, i monostrati vengono staccati a 37°C con PBS+EDTA e tripsina

0,25%, neutralizzata successivamente con terreno addizionato di antibiotici e siero al 10%.

### **Cellule HCT-15**

La linea cellulare HCT-15, fornita dall'Istituto Oncologico Veneto (IOV), rappresenta una linea cellulare di adenocarcinoma colon rettale umano avente un tempo di duplicazione di circa 21 ore. Queste cellule crescono in adesione al substrato e vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

### **Cellule 2008**

Si tratta di una linea cellulare proveniente da un paziente con carcinoma ovarico non trattato. Tale linea cellulare è stata fornita dal Prof. G. Marverti del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena. Il loro tempo di duplicazione è di circa 24 ore e crescono adese al substrato. Il terreno di coltura in cui crescono è RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

### **C13**

Tale linea cellulare corrisponde alla variante resistente al cis-platino della linea 2008. Queste cellule sono state rese resistenti *in vitro* mediante progressivo incremento della concentrazione di cis-platino nel mezzo di coltura e nei successivi 13 mesi sono stati selezionati i cloni resistenti. Entrambe le linee cellulari (2008 e C13) sono state fornite dal Prof. G. Marverti del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena. Le cellule crescono adese al substrato in terreno di coltura RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

### **Cellule PSN-1**

La linea cellulare PSN-1 fornita dal *National Institute for Cancer Research*, Genova, rappresenta una linea cellulare di adenocarcinoma umano pancreatico con mutazioni a livello del gene k-Ras e TP53. Queste cellule vengono mantenute in

terreno di coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

### **Cellule U1285**

La linea cellulare U1285, acquistata dall'*American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)*, rappresenta una linea umana di carcinoma polmonare non a piccole cellule. Le cellule crescono in adesione al substrato e hanno un tempo di duplicazione di 56 ore. Il terreno di coltura è l'RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

### **Cellule LoVo**

Rappresenta una linea cellulare di adenocarcinoma colon rettale. Hanno un tempo di duplicazione di circa 24 ore e crescono distese sul substrato aderenti le une alle altre. Vengono mantenute in coltura con terreno Ham's-F12 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

Sono state fornite dal Prof. F. Majone del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova, Italia. Tali cellule

## 3.5 TEST DI VITALITÀ CELLULARE

### 3.5.1 APH test su colture cellulari 3D

#### Protocollo sperimentale:

La semina degli sferoidi è analoga alla semina delle cellule per le colture in monostrato con la differenza che nel modello tridimensionale le cellule non crescono adese al substrato ma in sospensione grazie all'impiego del 20% di metilcellulosa che permette la formazione di uno sferoide. Le cellule vengono seminate in micropiastrea per sospensione da 96 pozzetti alla concentrazione di  $1,5-2,5 \cdot 10^3$  cellule per pozzetto in 100  $\mu\text{L}$  di RPMI-1640 privo del colorante rosso fenolo, che potrebbe dare interferenza con la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro e aggiungendo il 20% di metilcellulosa.

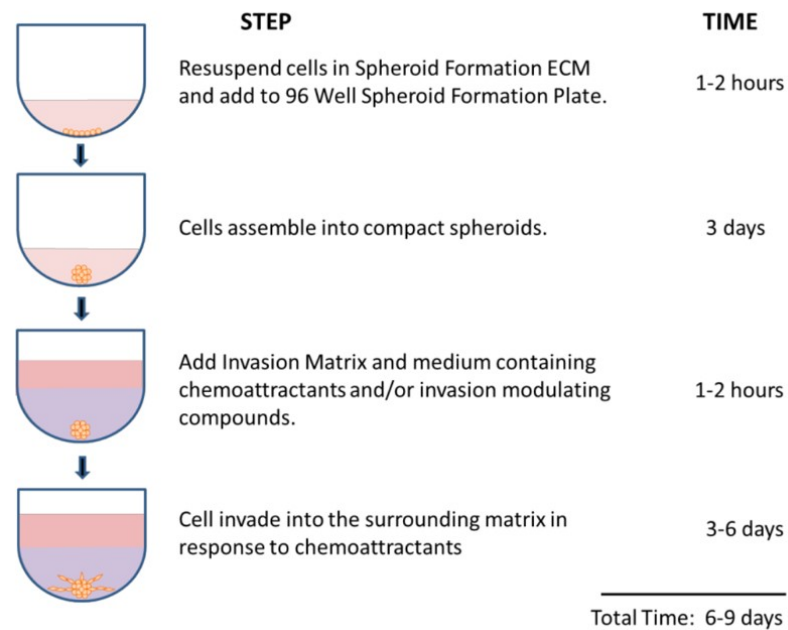


Figura 26: Schema di formazione e crescita di uno sferoide

Dopo 72 ore, le cellule sono trattate con i composti in esame a concentrazioni scalarmente decrescenti utilizzando come farmaco di riferimento il cis-platino. Dopo ulteriori 72 ore si procede all'aggiunta in ogni pozzetto di 100  $\mu\text{L}$  di una soluzione 2 mg/mL di p-nitro-fenilfosfato in sodio acetato 0,1 M e Triton X-100 allo

0,1% (pH 5,2). Dopo 5 ore di incubazione vengono aggiunti 10  $\mu$ L di NaOH 1 M ad ogni pozzetto e la micropiastra viene letta a 405 nm con *Bio-Rad 680 microplate reader*. L'assorbanza media dei pozzetti trattati con diverse concentrazioni di composto è espressa come percentuale di assorbanza dei pozzetti di controllo non trattati rispetto alla concentrazione di composto. Il valore di  $IC_{50}$  rappresenta la concentrazione di composto che riduce l'assorbanza media a 405 nm del 50% rispetto ai pozzetti di controllo non trattati.

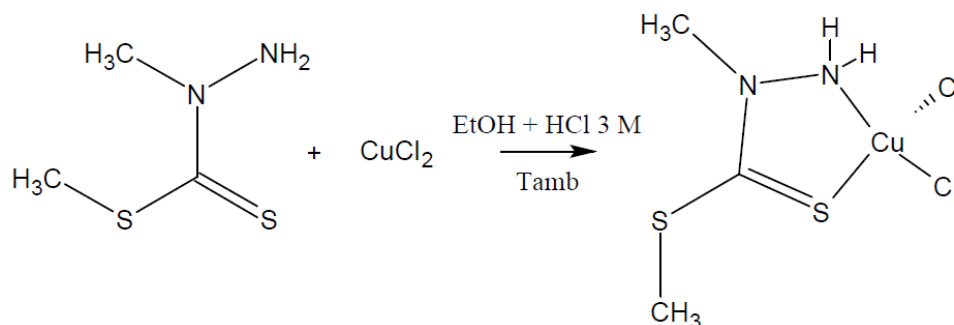


## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] (Cu1)

La sintesi del complesso è stata eseguita seguendo la procedura descritta al punto 3.2.1. il rapporto stechiometrico tra reagenti è 2,3:1. La reazione è stata condotta mantenendo il pH della soluzione tra 2-3 con l'ausilio di etanolo acido per HCl 3 M, al fine di ottenere una soluzione ricca di ioni cloruro, necessaria per spostare l'equilibrio di reazione verso la formazione del complesso finale.

Il prodotto di reazione si presenta come un solido di colore verde acceso di aspetto polveroso.



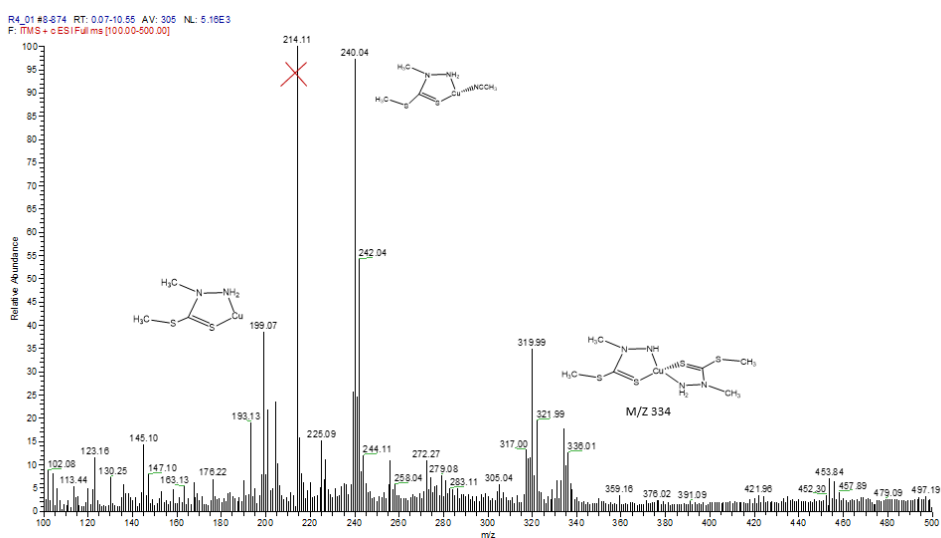
Durante la reazione di complessazione il rame si lega al legante in un rapporto stechiometrico metallo:legante 1:1 dando origine ad un complesso neutro monosostituito del tipo [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)], in cui il legante DTCZ lega il metallo attraverso i doppietti elettronici non condivisi del atomo di azoto dell'ammina -NH<sub>2</sub> e dello zolfo tiocarbonilico. La sfera di coordinazione del metallo è completata da due ioni cloruro; il complesso risulta così neutro.

Analisi elementare, spettrometrica e spettroscopica sono in accordo con la formulazione proposta.

Gli spettri di massa del complesso [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] sono stati eseguiti solubilizzando circa 2 mg del composto con la minima quantità di acqua deionizzata utile a portarlo in soluzione ed è poi stata preparata una soluzione opportunamente diluita del

complesso in acqua e aceto nitrile (CH<sub>3</sub>CN) al 50% per favorirne l'esposizione Coulombica in camera di ionizzazione. Lo spettro ESI(+)-MS del complesso è mostrato in **figura 27**.

Lo spettro completo (*full spectrum*) del complesso mostra la presenza di specie ioniche in cui il metallo si presenta allo stato di ossidazione +1 generate dalla rapida eliminazione dei due atomi di cloro (m/z 199 [Cu(DTCZ)]<sup>+</sup>, abbondanza ~40%), dalla eliminazione dei due atomi di cloro e addizione di acetonitrile (m/z 240 [Cu(CH<sub>3</sub>CN)(DTCZ)]<sup>+</sup>, abbondanza ~ 97%), nonché la specie [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z 334, abbondanza ~ 15%). Considerando i risultati dell'analisi elementare in perfetto accordo con la specie [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)], questa frammentazione è indice della bassa stabilità del complesso metallico nelle condizioni di ESI(+)-MS.



**Figura 27:** Esi(+)-full-MS [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] in H<sub>2</sub>O/ACN

Studi di frammentazione MS/MS hanno permesso una più sicura caratterizzazione degli ioni molecolari presenti nel *full spectrum*.

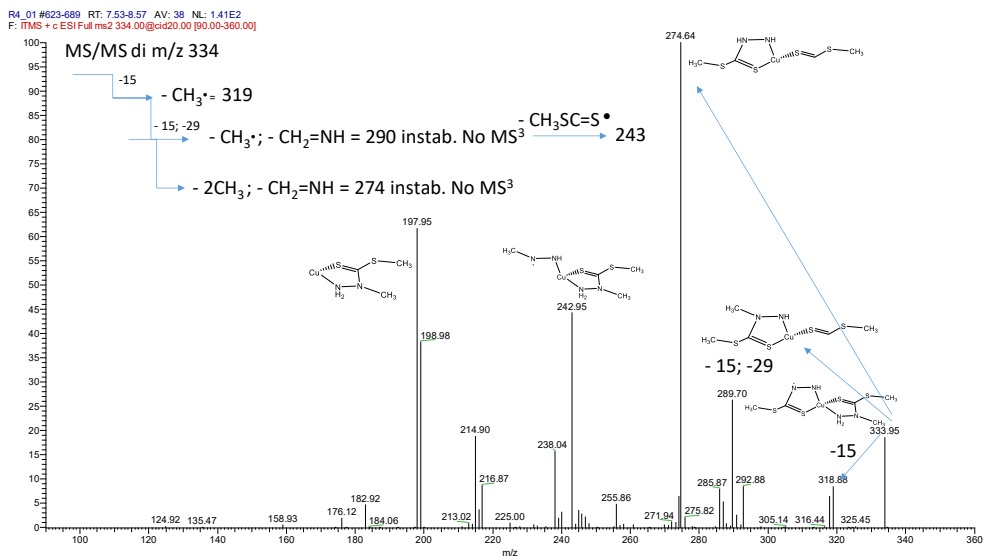


Figura 28: Esi(+)-full-MS frammentazione [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> in H<sub>2</sub>O/ACN

Analizzando lo spettro MS/MS del picco a m/z 334 si nota una progressiva frammentazione di uno dei due leganti DTCZ; è presente anche la specie a m/z 199 data dalla perdita totale di un legante (figura 28).

Analizzando, invece, lo spettro MS/MS del picco a m/z 240 si osserva la perdita della molecola CH<sub>3</sub>CN (m/z 199); lo spettro MS<sup>3</sup> della specie m/z 199 mostra lo ione molecolare protonato del DTCZ libero (m/z 136).

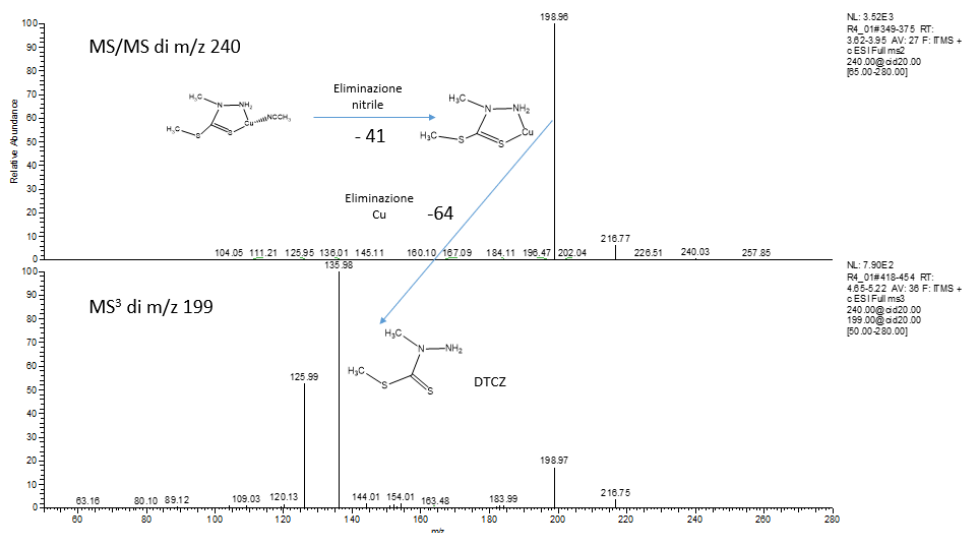


Figura 29: Esi(+)-full-MS frammentazione [Cu(CH<sub>3</sub>CN)(DTCZ)]<sup>+</sup> in H<sub>2</sub>O/ACN

La spettroscopia IR, eseguita confrontando lo spettro del complesso [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] con quello dei due reagenti, ha potuto confermare l'effettiva sintesi del complesso e il completo allontanamento dei reagenti in eccesso e di eventuali impurezze, durante le fasi di lavaggio.

Si notano le bande relative allo *stretching* del CH<sub>3</sub> a valori <3000 cm<sup>-1</sup> e quelle di *bending* alla lunghezza d'onda di 1412 cm<sup>-1</sup>.

A valori >3000 cm<sup>-1</sup> si trovano invece le bande relative al legame N-H, mentre al valore di 1170 cm<sup>-1</sup> si ha lo *stretching* del legame tra carbonio e azoto.

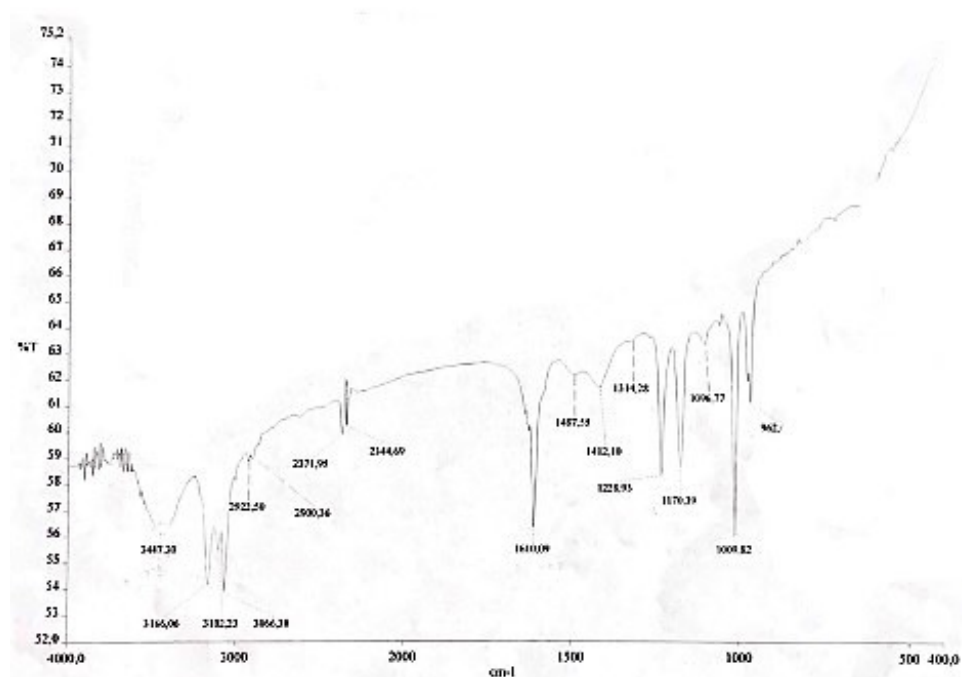
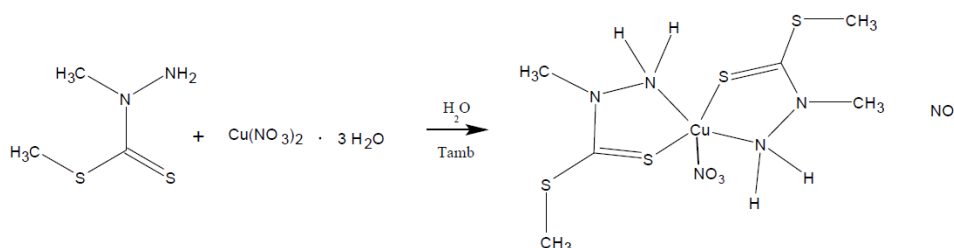


Figura 30: IR del complesso [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)] in pastiglie di KBr

## 4.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> (Cu<sub>2</sub>)

La sintesi del complesso è stata eseguita seguendo la procedura descritta al punto 3.2.2. il rapporto stechiometrico tra reagenti è 2,3:1. Il prodotto di reazione si presenta come un solido blu/viola di aspetto cristallino.



Durante la reazione di complessazione il rame si lega al legante in un rapporto stechiometrico metallo:legante 1:2 dando origine ad un complesso monocationico bi-sostituito del tipo [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, in cui il legante DTCZ lega il metallo attraverso i doppietti elettronici non condivisi del atomo di azoto dell'ammina -NH<sub>2</sub> e dello zolfo tiocarbonilico. Lo ione nitrato entra come legante nella sfera di coordinazione ragion per cui il complesso risulta monopositivo salificando poi con un ulteriore ione nitrato.

Ciò è confermato dall'analisi elementare.

Come in precedenza, gli spettri di massa del complesso [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> sono stati eseguiti solubilizzando circa 2 mg del composto con la minima quantità di acqua deionizzata utile a portarlo in soluzione ed è poi stata preparata una soluzione opportunamente diluita del complesso in acqua e aceto nitrile (CH<sub>3</sub>CN) al 50%.

Nel *full spectrum* in **figura 31** si nota, con un'abbondanza del 97%, un picco a valori di m/z 334 corrispondente alla specie [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, ottenuto dalla perdita di -NO<sub>3</sub> e di un protone H<sup>+</sup>, nonché dei seguenti ioni molecolari: m/z 240 [Cu(DTCZ)CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>, abbondanza 62%; m/z 199 [CuDTCZ]<sup>+</sup>, abbondanza 45%; m/z 136.07 [DTCZ+H<sup>+</sup>], abbondanza 20%.

Gli esperimenti di frammentazione MS/MS delle specie indicate confermano quanto riportato in precedenza.

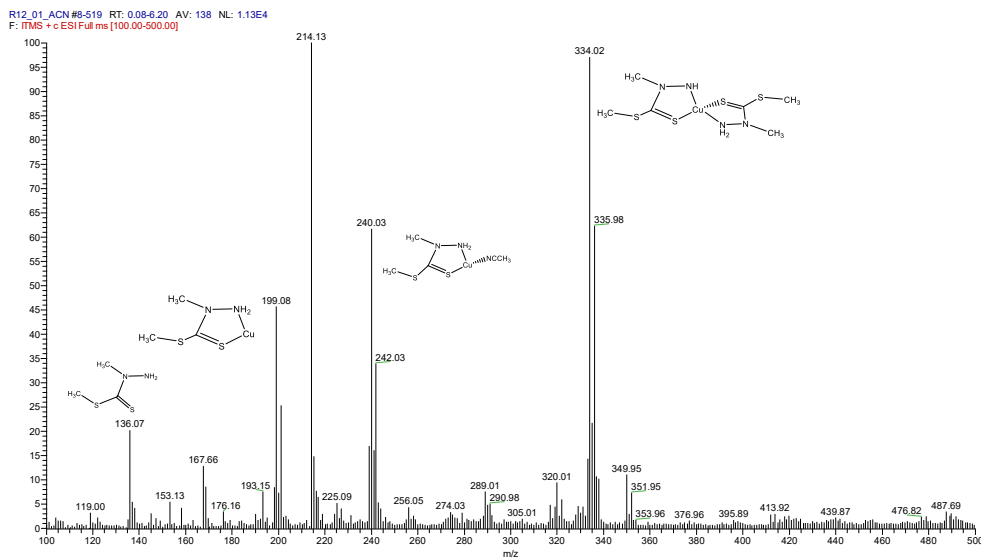


Figura 31: Esi(+)-full-MS frammentazione  $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$

Lo spettro IR conferma la presenza del nitrato con un picco che cade a  $1240\text{ cm}^{-1}$ . A  $1384\text{ cm}^{-1}$  si ha la banda relativa a  $\text{NH}_2^+$ , mentre la banda al valore di  $1624\text{ cm}^{-1}$  è corrispondente al doppio legame carbonio-zolfo.

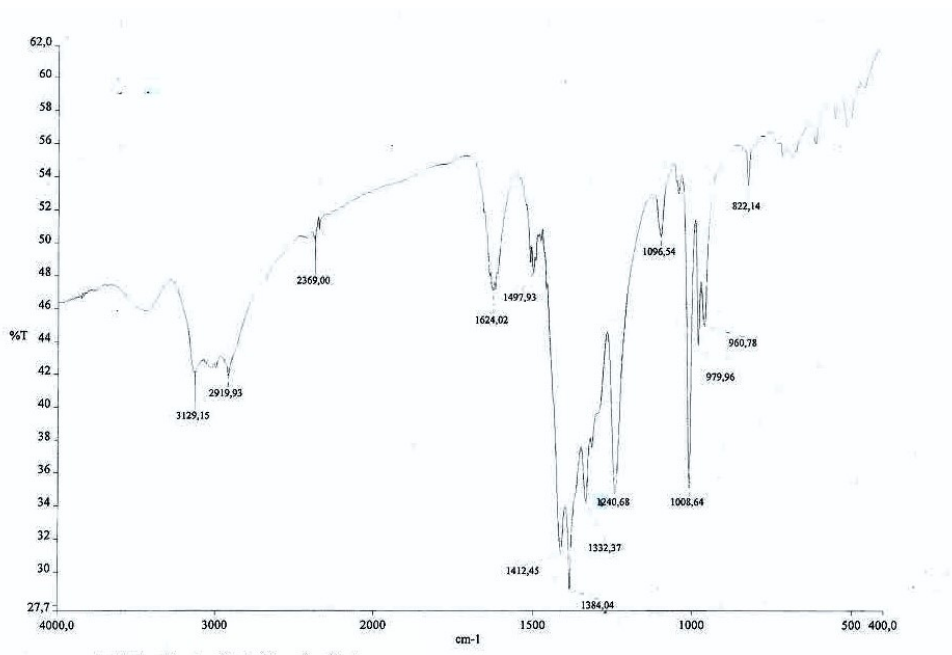
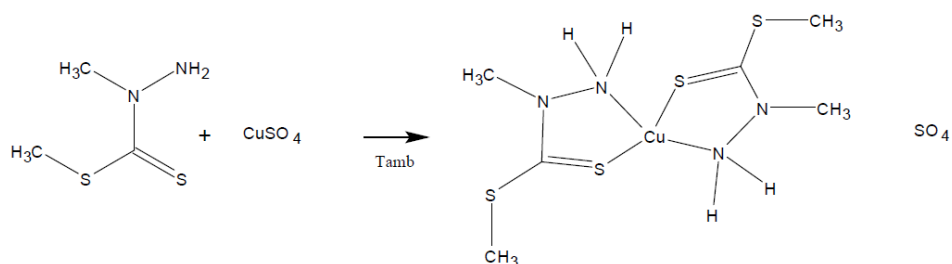


Figura 32: IR del complesso  $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$  in pastiglie di KBr

### 4.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO

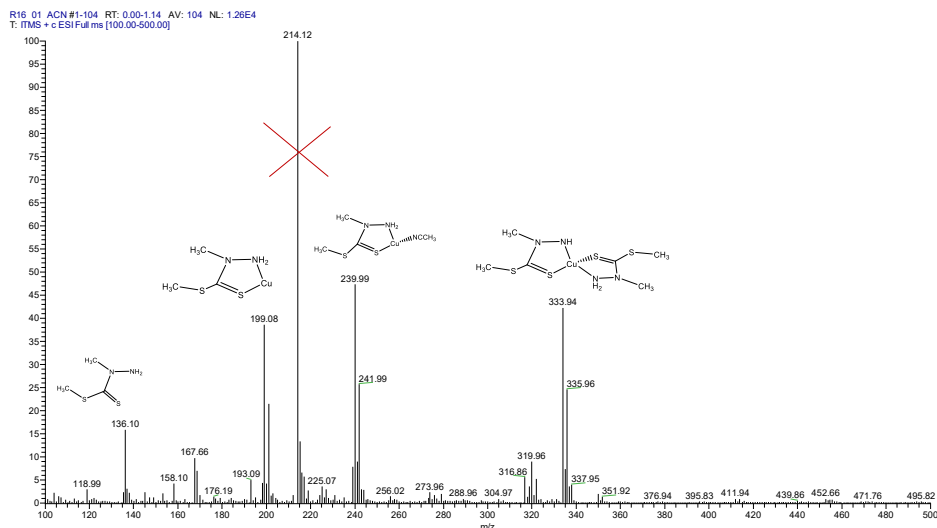
#### [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Cu3)

La sintesi del complesso è stata eseguita seguendo la procedura descritta al punto 3.2.3. Il rapporto stechiometrico tra reagenti è 2,3:1. Il prodotto di reazione si presenta come un solido di colore blu scuro.



Durante la reazione di complessazione il rame si lega al legante in un rapporto stechiometrico metallo:legante 1:2 dando origine ad un complesso carico bi-sostituito del tipo [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, in cui il legante DTCZ lega il metallo attraverso i doppietti elettronici non condivisi del atomo di azoto dell'ammina -NH<sub>2</sub> e dello zolfo tiocarbonilico. Lo ione solfato è presente come controione come confermato dall'analisi elementare.

Lo spettro ESI(+)-MS in **figura 33** del complesso [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presenta le stesse specie osservate per il [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>.

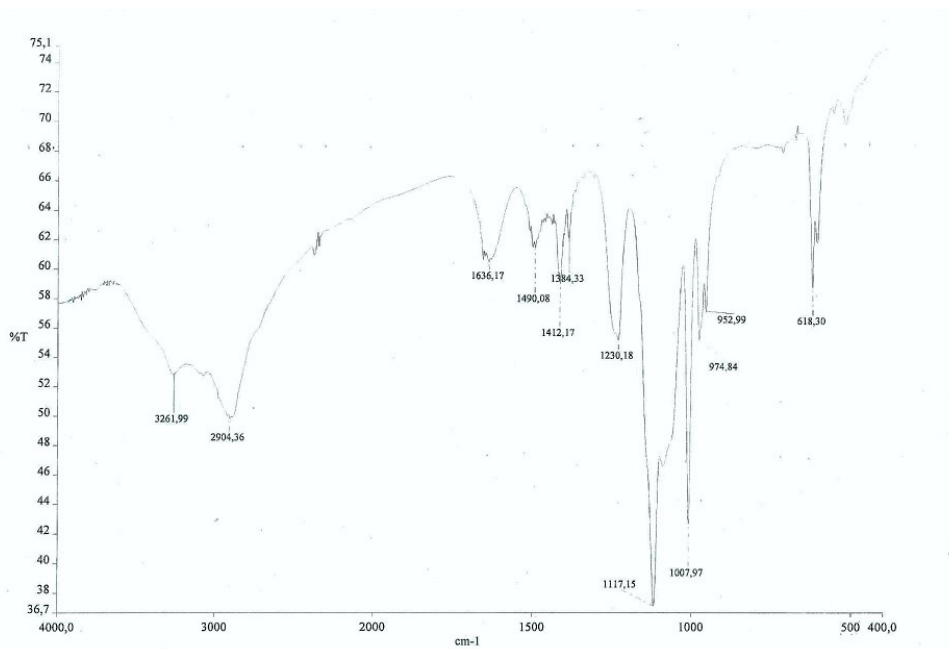


**Figura 33:** Esi(+)-full-MS frammentazione  $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{SO}_4]$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$

La presenza dello ione solfato come contro ione viene confermata anche dallo spettro IR, banda a  $1117\text{ cm}^{-1}$ .

Nella regione dello spettro che cade a valori  $<3000\text{ cm}^{-1}$  troviamo poi le bande corrispondenti agli stiramenti degli alcani ( $-\text{CH}_3$ ) mentre a valori compresi tra  $1450$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$  troviamo quelle relative ai piegamenti.

A  $1636\text{ cm}^{-1}$  si osserva lo stretching del doppio legame tra carbonio e zolfo.



**Figura 34:** IR del complesso  $[\text{Cu}(\text{DTCZ})_2\text{SO}_4]$  in pastiglie di KBr



## 4.4 STUDIO DI STABILITÀ

Dall'analisi degli spettri UV è emerso che i composti sintetizzati, una volta solubilizzati, mantengono la stabilità nelle 72 ore testate.

Infatti, dalla sovrapposizione delle curve di assorbimento registrate dopo 0, 24, 48 e 72 ore, si osserva che i valori di assorbanza rimangono pressoché invariati per tutti e tre i composti.

### Cu1 – [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)]

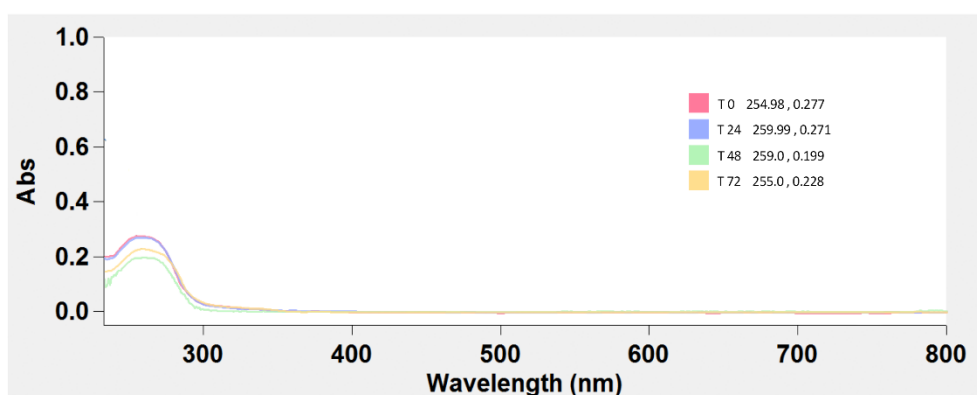


Figura 35: sovrapposizione curve di assorbimento del complesso [CuCl<sub>2</sub>(DTCZ)]

### Cu2 - [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>

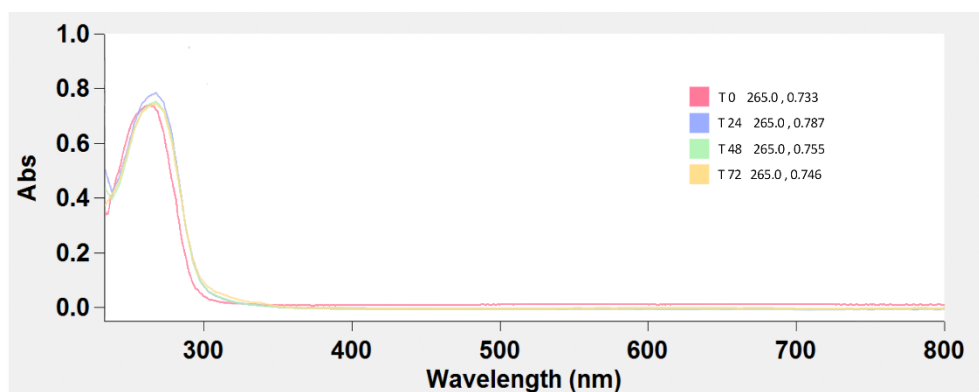
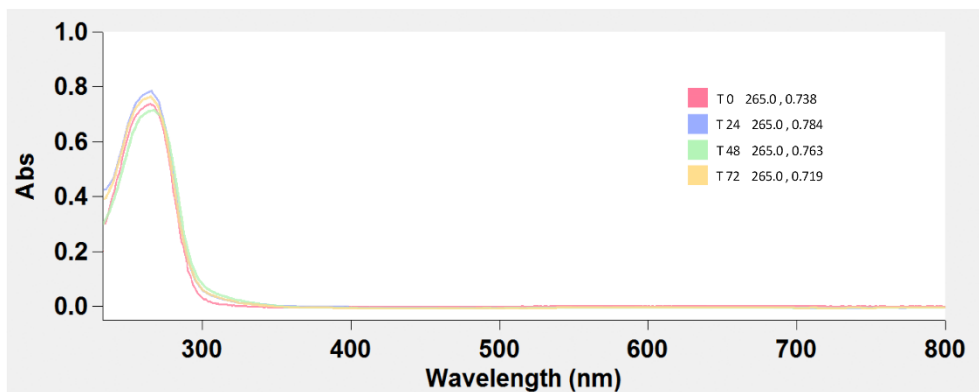


Figura 36: sovrapposizione curve di assorbimento del complesso [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>

**Cu3 - [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]SO<sub>4</sub>**



**Figura 37:** sovrapposizione curve di assorbimento del complesso [Cu(DTCZ)<sub>2</sub>]SO<sub>4</sub>

## 4.5 TEST DI VITALITÀ CELLULARE

### 4.5.1 APH test su colture cellulari tridimensionali

Gli sferoidi rappresentano delle colture cellulari tridimensionali in grado di riprodurre in modo più verosimile la struttura tumorale caratterizzata soprattutto da un centro ipossico.

È stato recentemente descritto che in colture cellulari monostrato (2D) i processi cellulari siano spesso alterati rispetto alle condizioni *in vivo* ed alcune funzioni che caratterizzano le cellule tumorali vengono perse in queste condizioni. Per questo motivo il 2D viene considerato un modello sperimentale scarsamente predittivo per la valutazione dell'attività antiproliferativa di nuovi potenziali agenti antitumorali. Una valida alternativa alle colture in monostrato è rappresentata dagli sferoidi, ovvero colture in 3D che mimano in modo nettamente più realistico il tessuto tumorale, riproducendo il microambiente cellulare nelle condizioni *in vivo*. In questo modo, è possibile ottenere un modello *in vitro* in cui le cellule tumorali non siano esposte in maniera uniforme ai nutrienti e all'ossigeno, come avviene nei tumori solidi umani.

Le linee cellulari utilizzate per la formazione degli sferoidi in questo progetto di tesi sono: HCT-15, cellule di adenocarcinoma colon rettale; 2008, cellule di adenocarcinoma ovarico; PSN-1 cellule di adenocarcinoma pancreatico umano; U1285 cellule di carcinoma polmonare e LoVo cellule di adenocarcinoma colon rettale.

La formazione di strutture tridimensionali è stata favorita dall'aggiunta al terreno di coltura di metilcellulosa, ad una concentrazione del 20%. Per tutte le linee cellulari è stato utilizzato RPMI-1640 bianco come *medium* di coltura.

I valori di IC<sub>50</sub> ottenuti nelle diverse linee cellulari sono riportati in **Tabella 1**.

**IC<sub>50</sub> (μM) ± D.S.**

	<b>HCT-15</b>	<b>2008</b>	<b>PSN-1</b>	<b>U1285</b>	<b>LoVo</b>
<b>DTCZ</b>	-	> 100	-	> 100	-
<b>Cu1</b>	9,40 ± 2,44	67,07 ± 3,64	34,49 ± 1,83	48,41 ± 7,27	> 100
<b>Cu2</b>	10,83 ± 3,69	43,40 ± 1,61	12,60 ± 2,24	25,39±2,32	> 100
<b>Cu3</b>	14,78 ± 2,10	63,67 ± 4,59	32,48 ± 3,01	19,98 ± 5,41	> 100
<b>Cis-platino</b>	68,20 ± 4,57	13,89 ± 0,85	55,53 ± 3,78	52,51 ± 1,31	29,41 ± 2,85

**Tabella 1:** Le cellule (2-3·10<sup>3</sup>) sono state trattate dopo 72h dalla semina con concentrazioni crescenti dei composti in esame. La citotossicità è stata valutata mediante APH test. I valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati mediante regressione lineare non logistica a 5 parametri. D.S.: deviazione standard.

Oltre ai complessi di Cu(II) in esame, è stato testato su modelli cellulari tridimensionali anche il legante ditiocarbazato (DTCZ), per valutare in quale misura esso possa contribuire all'attività citotossica del complesso risultante. Dai dati riportati in Tabella 1, si evince che il legante libero non possiede un'attività citotossica significativa nelle linee considerate, mostrando valori di IC<sub>50</sub> superiori a 100 μM.

I complessi di rame hanno invece dimostrato una buona attività antiproliferativa su quasi tutte le linee testate, con valori di IC<sub>50</sub> che si collocano nel micromolare. La loro attività citotossica risulta essere paragonabile o leggermente superiore rispetto a quella del cis-platino, composto di riferimento, essendo i loro valori medi di IC<sub>50</sub> vicini a quelli calcolati per il farmaco di riferimento. In particolare, Cu2 presenta un valore di IC<sub>50</sub> medio quasi 2 volte inferiore a quello calcolato per il cis-platino; mentre Cu1 mostra un valore medio di IC<sub>50</sub> circa 0,7 volte inferiore rispetto a quello del cis-platino.

Dai risultati ottenuti si può osservare che il complesso mediamente più attivo su tutte le linee cellulari considerate è Cu2, con un IC<sub>50</sub> media pari a 23,06 μM mentre quello mediamente meno attivo è Cu1, con una IC<sub>50</sub> media pari a 39,84 μM.

Tra tutte le linee cellulari impiegate, quella di adenocarcinoma colon rettale umano HCT-15 si è dimostrata la più sensibile al trattamento con i composti in esame che hanno mostrato, su questa linea cellulare, tutti e tre una citotossicità tra loro confrontabile nonostante le differenze strutturali tra il complesso monosostituito, Cu1, e quelli bisostituiti caratterizzati da due differenti controioni, Cu2 e Cu3; contrariamente si sono dimostrati scarsamente attivi per la linea cellulare LoVo, con un  $IC_{50}$  superiore a 100  $\mu$ M e anche per la linea cellulare di adenocarcinoma ovarico, 2008, dove tutti e tre i composti mostrano un'attività antiproliferativa nettamente inferiore rispetto a quella del il cis-platino (dalle 3 alle 5 volte meno efficaci rispetto al farmaco).

Analizzando i dati di citotossicità relativamente ai complessi testati al fine di evincerne eventuali SARs (relazione struttura-attività), non si evincono particolari relazioni nonostante Cu2 e Cu3, siano entrambi complessi di Cu(II) bisostituiti.

#### **4.5.2 Studi di resistenza crociata**

La valutazione delle proprietà antiproliferative dei composti di Cu(II) è stata svolta anche in linee cellulari caratterizzate dalla resistenza all'agente antitumorale dell'eccellenza, il cis-platino. I test di chemiosensibilità sono stati svolti su due linee cellulari umane di adenocarcinoma ovarico: la linea 2008 sensibile al cis-platino e la corrispettiva variante resistente C13, ottenuta in vitro mediante progressivo aumento della concentrazione di cis-platino nel terreno di coltura e successiva selezione dei cloni divenuti resistenti.

Le cellule sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti, trattate dopo 72 ore con concentrazioni crescenti dei composti in esame e al termine di ciò è stata determinata la vitalità cellulare mediante APH test.

Lo scopo degli studi di resistenza crociata è quello di verificare la capacità dei composti in esame di superare l'insorgere di resistenza alla terapia.

A seguito della determinazione dei valori di  $IC_{50}$  per i vari composti nelle linee cellulari in esame è stato possibile definire il Fattore di Resistenza (FR), espresso come il rapporto tra il valore di  $IC_{50}$  nelle cellule resistenti ed il valore di  $IC_{50}$  nelle cellule sensibili:

$$FR = \frac{IC_{50} \text{ cellule resistenti}}{IC_{50} \text{ cellule sensibili}}$$

Se il valore di FR calcolato risulta superiore a 2, si può affermare che la resistenza non viene del tutto superata, se invece risultasse inferiore a 2 la resistenza risulta completamente superata.

I risultati ottenuti sono riportati nella **Tabella 2** come  $IC_{50} (\mu M) \pm D.S.$

**$IC_{50} (\mu M) \pm D.S.$**

	<b>2008</b>	<b>C13</b>	<b>F.R.</b>
<b>Cu1</b>	67,07 ± 3,64	> 100	-
<b>Cu2</b>	43,40 ± 1,61	94,80 ± 3,06	2,18
<b>Cu3</b>	63,67 ± 4,59	> 100	-
<b>Cis-platino</b>	13,89 ± 0,85	105,47 ± 5,42	7,59

**Tabella 1:** Le cellule sono state trattate dopo 72h dalla semina con concentrazioni crescenti dei composti in esame. La citotossicità è stata valutata mediante APH test. I valori di  $IC_{50}$  sono stati calcolati mediante regressione lineare non logistica a 5 parametri. F.R.: fattore di resistenza ( $IC_{50}$  cellule resistenti/ $IC_{50}$  cellule sensibili). D.S.: deviazione standard.

I complessi di Cu(II) testati hanno dimostrato avere una scarsa attività antiproliferativa. Confrontando i dati relativi alle  $IC_{50}$  ottenute, Cu2 si è confermato essere il più attivo anche se con una citotossicità nettamente inferiore a quella del cis-platino mentre Cu1 si è dimostrato essere il meno attivo.

Inoltre, è possibile notare che tutti i complessi Cu1 e Cu2 non superano la resistenza al cis-platino, mentre Cu2 presenta una parziale resistenza crociata con il cis-platino, come evidenziato dal valore F.R superiore a 2.

## 5. CONCLUSIONI

In questo progetto di tesi sono stati sintetizzati e studiati tre nuovi complessi di rame(II) con legante *N,S*-donatore ditiocarbazato, due dei quali in forma bisostituita ed uno in forma monosostituita. Questi complessi sono stati preparati utilizzando sali diversi di  $\text{Cu}^{2+}$  come prodotti di partenza quali:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{CuSO}_4$ . La caratterizzazione è stata effettuata mediante analisi elementare e tecniche di analisi spettroscopica e spettrometrica. È stato inoltre verificato il loro profilo di stabilità in soluzione analizzando gli spettri UV-visibili raccolti al tempo zero e dopo 24, 48, e 72 ore dalla solubilizzazione in RPMI bianco privo di siero. Si è potuto così concludere che i tre complessi risultano stabili per tutto il tempo dell'analisi.

Tutti i complessi sono poi stati sottoposti a saggi di vitalità *in vitro* su modelli tridimensionali dove hanno dimostrato avere una significativa attività citotossica su un ampio pannello di linee tumorali umane con valori di  $\text{IC}_{50}$  medi inferiori a quelli del cisplatino. In particolare, questi studi hanno dimostrato non solo la maggior efficacia dei complessi rispetto al legante libero, sottolineando così l'importanza del rame all'interno del complesso, ma anche una maggior efficacia dei composti con struttura bisostituita in rispetto al composto monosostituito.

L'intero profilo di citotossicità è stato valutato su modelli cellulari tridimensionali in quanto essi mimano maggiormente l'ambiente tumorale *in vivo* e di conseguenza risultano essere più predittivi in rispetto ai modelli monodimensionali.

Inoltre, dal momento in cui i fenomeni di farmacoresistenza rappresentano uno dei più gravi limiti del trattamento chemioterapico si è deciso di inserire nel pannello di linee cellulari considerate anche una linea cellulare di adenocarcinoma ovarico (C13) resistente alla terapia con il cis-platino. Dai dati ricavati è emerso che nessuno dei tre complessi sintetizzati è in grado di superare il fenomeno di resistenza crociata come dimostrato dal calcolo del Fattore di Resistenza (FR) che assume un valore superiore a 2. Da ciò si potrebbe evincere l'ipotesi che i complessi agiscano con meccanismi citotossici simili a quelli del cis-platino.

In conclusione, gli studi effettuati in questo lavoro di tesi hanno messo in evidenza che i complessi di Cu(II) con legante ditiocarbazato risultano efficaci in termini di attività antiproliferativa *in vitro* non permettendo però di superare la problematica di farmacoresistenza.

Alla luce dei risultati ottenuti, sarebbe interessante dal punto di vista sintetico affinare il processo ed indirizzare la sintesi su nuovi complessi adoperando sali di  $\text{Cu}^{2+}$  diversi da quelli già impiegati. Dal punto di vista biologico invece, sarebbe interessante identificare il loro *target* e capirne il meccanismo d'azione.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, J. 2003. "Potential for Proteasome Inhibition in the Treatment of Cancer." *Drug Discov Today* 8, no. 7 (Apr): 307-15. [https://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446\(03\)02647-3](https://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446(03)02647-3).
- Afrasiabi Z., Sinn E., Kulkarni P.P., Ambike V., Padhye S., Deobagakar D., Heron M., Powell A.K. 2005. 'Synthesis and characterization of copper(II) complexes of 4-alkyl/aryl-1,2-naphthoquinones thiosemicarbazones derivatives as potent DNA cleaving agents. *Inorganica Chimica Acta*, 358 (6) , pp. 2023-2030.
- Al-Fartusie, Falah S., and Saja N. Mohssan. 2017. "Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body." *Indian Journal of Advances in Chemical Science*. <https://dx.doi.org/10.22607/IJACS.2017.503003>.
- Ali, M.A., & Livingstone, S.E. (1974). 'Metal complexes of sulfur-nitrogen chelating agents'. *Coordination Chemistry Reviews*, 13, 101-132.
- Arredondo, M., and M. T. Núñez. 2005. "Iron and Copper Metabolism." *Mol Aspects Med* 26, no. 4-5 (2005 Aug-Oct): 313-27. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.010>
- Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, and E. Seemüller. 1998. "The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease." *Cell* 92, no. 3 (Feb): 367-80. [https://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80929-0](https://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80929-0).
- Bayrak, A., T. Bayrak, E. Bodur, K. Kılınc, and E. Demirpençe. 2016. "The Effect of Hdl-Bound and Free Pon1 on Copper-Induced Ldl Oxidation." *Chem Biol Interact* 257 (Sep): 141-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.08.007>.
- Bloemink, M.J. and J. Reedijk. 1996. "Cisplatin and derived anticancer drugs: mechanism and current status of DNA binding." *Met Ions Biol Syst*. 32: p. 641-85

- Boulikas, Teni, Alexandros Pantos, Evangelos Bellis, and Petros Christofis. 2007. "Designing Platinum Compounds in Cancer: Structures and Mechanisms." *Cancer Therapy* 5(5):537–83.
- Brewer, G.J., Copper control as an antiangiogenic anticancer therapy: lessons from treating Wilson's disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. 226(7): p. 665-73.
- Buja, L. M., M. L. Eigenbrodt, and E. H. Eigenbrodt. 1993. "Apoptosis and Necrosis: Basic Types and Mechanisms of Cell Death." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 117(12):1208–14.
- Burkitt, M. J. 2001. "A Critical Overview of the Chemistry of Copper-Dependent Low Density Lipoprotein Oxidation: Roles of Lipid Hydroperoxides, Alpha-Tocopherol, Thiols, and Ceruloplasmin." *Arch Biochem Biophys* 394, no. 1 (Oct): 117-35. <https://dx.doi.org/10.1006/abbi.2001.2509>.
- Chen, X., Q. P. Dou, J. Liu, and D. Tang. 2021. "Targeting Ubiquitin-Proteasome System with Copper Complexes for Cancer Therapy." *Front Mol Biosci* 8: 649151. <https://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.649151>.
- Cohen, S., I. Bruchim, D. Graiver, Z. Evron, V. Oron-Karni, M. Pasmanik-Chor, R. Eitan, J. Bernheim, H. Levavi, A. Fishman, and E. Flescher. 2013. "Platinum-Resistance in Ovarian Cancer Cells Is Mediated by Il-6 Secretion Via the Increased Expression of Its Target Ciap-2." *J Mol Med (Berl)* 91, no. 3 (Mar): 357-68. <https://dx.doi.org/10.1007/s00109-012-0946-4>.
- Cohen, S. M. 2007. "New Approaches for Medicinal Applications of Bioinorganic Chemistry." *Curr Opin Chem Biol* 11, no. 2 (Apr): 115-20. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.012>.
- Cohen, S. M., Y. Mikata, Q. He, and S. J. Lippard. 2000. "Hmg-Domain Protein Recognition of Cisplatin 1,2-Intrastrand D(Gpg) Cross-Links in Purine-Rich Sequence Contexts." *Biochemistry* 39, no. 38 (Sep): 11771-6. <https://dx.doi.org/10.1021/bi001352l>.

- Coluccia, M., and G. Natile. 2007. "Trans-Platinum Complexes in Cancer Therapy." *Anticancer Agents Med Chem* 7, no. 1 (Jan): 111-23. <https://dx.doi.org/10.2174/187152007779314080>.
- Costa, A., A. Scholer-Dahirel, and F. Mechta-Grigoriou. 2014. "The Role of Reactive Oxygen Species and Metabolism on Cancer Cells and Their Microenvironment." *Semin Cancer Biol* 25 (Apr): 23-32. <https://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.007>.
- Daniel, K.G., et al., Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2004. **67**(6): p. 1139-51.
- Coux, Olivier, Keiji Tanaka, and Alfred L. Goldberg. 1996. "Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. " *Annual Review of Biochemistry* 65(1):801–47.
- Dasari, S., and P. B. Tchounwou. 2014. "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action." *Eur J Pharmacol* 740 (Oct): 364-78. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- De Luca, A., A. Barile, M. Arciello, and L. Rossi. 2019. "Copper Homeostasis as Target of Both Consolidated and Innovative Strategies of Anti-Tumor Therapy." *J Trace Elem Med Biol* 55 (Sep): 204-213. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.008>.
- de Romaña, D. L., M. Olivares, R. Uauy, and M. Araya. 2011. "Risks and Benefits of Copper in Light of New Insights of Copper Homeostasis." *J Trace Elem Med Biol* 25, no. 1 (Jan): 3-13. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.11.004>.
- Dedon, P. C., and R. F. Borch. 1987. "Characterization of the Reactions of Platinum Antitumor Agents with Biologic and Nonbiologic Sulfur-Containing Nucleophiles." *Biochem Pharmacol* 36, no. 12 (Jun): 1955-64. [https://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90494-1](https://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(87)90494-1).

- Denoyer, D., S. Masaldan, S. La Fontaine, and M. A. Cater. 2015. "Targeting Copper in Cancer Therapy: 'Copper That Cancer'." *Metallomics* 7, no. 11 (Nov): 1459-76. <https://dx.doi.org/10.1039/c5mt00149h>.
- Devarajan, P. 2005. "Cellular and Molecular Derangements in Acute Tubular Necrosis." *Curr Opin Pediatr* 17, no. 2 (Apr): 193-9. <https://dx.doi.org/10.1097/01.mop.0000152620.59425.eb>.
- Devi, S. R.Bharath., Aloysius Dhivya M, and K. N. Sulochana. 2016. "Copper Transporters and Chaperones: Their Function on Angiogenesis and Cellular Signalling. " *Journal of Biosciences* 41(3):487–96.
- Erxleben, Andrea. 2018. Interactions of Copper Complexes with Nucleic Acids.
- Frezza, M., S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, and Q. P. Dou. 2010. "Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy." *Curr Pharm Des* 16, no. 16 (Jun): 1813-25. <https://dx.doi.org/10.2174/138161210791209009>.
- Gitlin, J.D., Wilson disease. *Gastroenterology*, 2003. **125**(6): p. 1868-77.
- Gromadzka, G., B. Tarnacka, A. Flaga, and A. Adamczyk. 2020. "Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases-Therapeutic Implications." *Int J Mol Sci* 21, no. 23 (Dec). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms21239259>.
- Gupte, A. and R.J. Mumper, *Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment*. *Cancer Treat Rev*, 2009. **35**(1): p. 32-46.
- Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 1984. **219**(1): p. 1-14.
- Harris, E. D. 2000. "Cellular Copper Transport and Metabolism." *Annu Rev Nutr* 20: 291-310. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.291>.

- Hazari, S. K. S., Dey, B. K., Roy, T. G., Ganguly, B., Ng, S. W. & Tiekink, E. R. T. (2012). 'Bis(2,S-dimethyldithiocarbazate-k<sup>2</sup>N<sup>3</sup>,S)-(nitrate-kO)copper(II) nitrate'. *Acta Cryst.* E68, o1216
- Iakovidis, I., I. Delimaris, and S. M. Piperakis. 2011. "Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach." *Mol Biol Int* 2011: 594529. <https://dx.doi.org/10.4061/2011/594529>.
- Jung, T., B. Catalgol, and T. Grune. 2009. "The Proteasomal System." *Mol Aspects Med* 30, no. 4 (Aug): 191-296. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>.
- Jung, Y. and S.J. Lippard. 2007. "Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage". *Chem Rev*, 107(5): p. 1387-407.
- Katano, Kuniyuki et al. 2002." Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper." *Cancer Research* 62(22):6559–65.
- Kelland, L. 2007. "The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy." *Nat Rev Cancer* 7, no. 8 (Aug): 573-84. <https://dx.doi.org/10.1038/nrc2167>.
- Kelland, L. R. 2000. "Preclinical Perspectives on Platinum Resistance." *Drugs* 59 Suppl 4: 1-8; discussion 37-8. <https://dx.doi.org/10.2165/00003495-200059004-00001>.
- Khan, G.N. and S.D. Merajver, *Modulation of angiogenesis for cancer prevention: strategies based on antioxidants and copper deficiency.* *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(35): p. 3584-90.
- Kidane, T.Z., Farhad, R., Lee, K.J. *et al.* 2012. "Uptake of copper from plasma proteins in cells where expression of CTR1 has been modulated". *Biometals* **25**, 697–709. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9528-8>

- Kisselev, A. F., and A. L. Goldberg. 2001. "Proteasome Inhibitors: From Research Tools to Drug Candidates." *Chem Biol* 8, no. 8 (Aug): 739-58. [https://dx.doi.org/10.1016/s1074-5521\(01\)00056-4](https://dx.doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00056-4).
- Kostova, I. 2006. "Gold Coordination Complexes as Anticancer Agents." *Anticancer Agents Med Chem* 6, no. 1 (Jan): 19-32. <https://dx.doi.org/10.2174/187152006774755500>.
- Köhler, A., P. Cascio, D. S. Leggett, K. M. Woo, A. L. Goldberg, and D. Finley. 2001. "The Axial Channel of the Proteasome Core Particle Is Gated by the Rpt2 Atpase and Controls Both Substrate Entry and Product Release." *Mol Cell* 7, no. 6 (Jun): 1143-52. [https://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00274-x](https://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00274-x).
- Koppenol, W.H. 2001. "The Haber-Weiss Cycle-70 Years Later". Redox report: Communications in Free Radical Research 6(4):229-34.
- Lee, J., M. M. Peña, Y. Nose, and D. J. Thiele. 2002. "Biochemical Characterization of the Human Copper Transporter Ctr1." *J Biol Chem* 277, no. 6 (Feb): 4380-7. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M104728200>.
- Linder, M. C., and M. Hazegh-Azam. 1996. "Copper Biochemistry and Molecular Biology." *Am J Clin Nutr* 63, no. 5 (May): 797S-811S. <https://dx.doi.org/10.1093/ajcn/63.5.797>.
- Lowndes, S.A. and A.L. Harris, *The role of copper in tumour angiogenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. **10**(4): p. 299-310
- Marzano, C., M. Pelli, F. Tisato, and C. Santini. 2009. "Copper Complexes as Anticancer Agents." *Anticancer Agents Med Chem* 9, no. 2 (Feb): 185-211. <https://dx.doi.org/10.2174/187152009787313837>.
- Milne, D. B. 1998. "Copper Intake and Assessment of Copper Status." *Am J Clin Nutr* 67, no. 5 Suppl (05): 1041S-1045S. <https://dx.doi.org/10.1093/ajcn/67.5.1041S>.

- Mjos, K. D., and C. Orvig. 2014. "Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry." *Chem Rev* 114, no. 8 (Apr): 4540-63. <https://dx.doi.org/10.1021/cr400460s>.
- Molinaro, C., A. Martoriati, L. Pelinski, and K. Cailliau. 2020. "Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II." *Cancers (Basel)* 12, no. 10 (Oct). <https://dx.doi.org/10.3390/cancers12102863>.
- Montes, Sergio, Susana Rivera-Mancia, Araceli Diaz-Ruiz, Luis Tristan-Lopez, and Camilo Rios. 2014. "Copper and Copper Proteins in Parkinson's Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014.
- Nalepa, G., M. Rolfe, and J. W. Harper. 2006. "Drug Discovery in the Ubiquitin-Proteasome System." *Nat Rev Drug Discov* 5, no. 7 (Jul): 596-613. <https://dx.doi.org/10.1038/nrd2056>.
- Natile, Giovanni, and Mauro Coluccia. 2001. "Current Status Of Trans - Platinum Compounds in Cancer Therapy." *Coordination Chemistry Reviews* 216–217: 383–410. [https://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(01\)00315-0](https://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(01)00315-0).
- Orvig, C., and M. J. Abrams. 1999. "Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction." *Chem Rev* 99, no. 9 (Sep): 2201-4. <https://dx.doi.org/10.1021/cr980419w>.
- Peres, L. A., and A. D. da Cunha. 2013. "Acute Nephrotoxicity of Cisplatin: Molecular Mechanisms." *J Bras Nefrol* 35, no. 4 (2013 Oct-Dec): 332-40. <https://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20130052>.
- Powell, Saul R. 2000. "The Antioxidant Properties of Zinc." *The Journal of Nutrition* 130(5):1447–54.
- Predki, P. F., and B. Sarkar. 1992. "Effect of Replacement Of "Zinc Finger" Zinc on Estrogen Receptor Dna Interactions." *J Biol Chem* 267, no. 9 (Mar): 5842-6.

- Prestayko, A. W., J. C. D'Aoust, B. F. Issell, and S. T. Crooke. 1979. "Cisplatin (Cis-Diamminedichloroplatinum II)." *Cancer Treat Rev* 6, no. 1 (Mar): 17-39. [https://dx.doi.org/10.1016/s0305-7372\(79\)80057-2](https://dx.doi.org/10.1016/s0305-7372(79)80057-2).
- Puckett, C. A., R. J. Ernst, and J. K. Barton. 2010. "Exploring the Cellular Accumulation of Metal Complexes." *Dalton Trans* 39, no. 5 (Feb): 1159-70. <https://dx.doi.org/10.1039/b922209j>.
- Qi, J., Q. Yao, L. Tian, and Y. Wang. 2018. "Piperidylthiosemicarbazones Cu(II) Complexes with a High Anticancer Activity by Catalyzing Hydrogen Peroxide to Degrade Dna and Promote Apoptosis." *Eur J Med Chem* 158 (Oct): 853-862. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.034>.
- Quesada, A.R., R. Muñoz-Chápuli, and M.A. Medina, *Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials*. Med Res Rev, 2006. **26**(4): p. 483-530.
- Raju, K.S., et al., *Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis*. J Natl Cancer Inst, 1982. **69**(5): p. 1183-8.
- Raveh, O., I. Pinchuk, E. Schnitzer, M. Fainaru, Z. Schaffer, and D. Lichtenberg. 2000. "Kinetic Analysis of Copper-Induced Peroxidation of Hdl, Autoaccelerated and Tocopherol-Mediated Peroxidation." *Free Radic Biol Med* 29, no. 2 (Jul): 131-46. [https://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00332-4](https://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00332-4).
- Rosenberg, B., L. VanCamp, J. E. Trosko, and V. H. Mansour. 1969. "Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents." *Nature* 222, no. 5191 (Apr): 385-6. <https://dx.doi.org/10.1038/222385a0>.
- Santini, C., M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, and C. Marzano. 2014. "Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents." *Chem Rev* 114, no. 1 (Jan): 815-62. <https://dx.doi.org/10.1021/cr400135x>.
- S.B. Kalia, K. Lumba & P. Sankhyan (2011) Magnetic and spectral studies on nickel(II) and copper(II) dithiocarbazates derived from isoniazid, Journal of Coordination Chemistry, 64:7, 1216-1228, DOI: <https://doi.org/10.1080/00958972.2011.565414>



- Shaloam, D., & Tchounwou, P.B.2014. "Cisplatin in cancer therapy : Molecular mechanisms of action". *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin>
- Sîrbu, A., O. Palamarciuc, M. V. Babak, J. M. Lim, K. Ohui, E. A. Enyedy, S. Shova, D. Darvasiová, P. Rapta, W. H. Ang, and V. B. Arion. 2017. "Copper(II) Thiosemicarbazone Complexes Induce Marked ROS Accumulation and Promote Nrf2-Mediated Antioxidant Response in Highly Resistant Breast Cancer Cells." *Dalton Trans* 46, no. 12 (Mar): 3833-3847. <https://dx.doi.org/10.1039/c7dt00283a>.
- Strausak, Daniel, Julian F. B. Mercer, Hermann H. Dieter, Wolfgang Stremmel, and Gerd Multhaup. 2001. "Copper in Disorders with Neurological Symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson Diseases." Pp. 175–85 in *Brain Research Bulletin*, vol. 55.
- Tanzi, R. E. et al. 1993. "The Wilson Disease Gene Is a Copper Transporting ATPase with Homology to the Menkes Disease Gene." *Nature Genetics* 5(4):344–50.
- Tapiero, H., D. M. Townsend, and K. D. Tew. 2003. "Trace Elements in Human Physiology and Pathology. Copper." *Biomed Pharmacother* 57, no. 9 (Nov): 386-98. [https://dx.doi.org/10.1016/s0753-3322\(03\)00012-x](https://dx.doi.org/10.1016/s0753-3322(03)00012-x).
- Thompson, K. H., and C. Orvig. 2003. "Boon and Bane of Metal Ions in Medicine." *Science* 300, no. 5621 (May): 936-9. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1083004>.
- Tisato, F., C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, and C. Santini. 2010. "Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies." *Med Res Rev* 30, no. 4 (Jul): 708-49. <https://dx.doi.org/10.1002/med.20174>.
- Turski, M. L., and D. J. Thiele. 2009. "New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease." *J Biol Chem* 284, no. 2 (Jan 09): 717-21. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800055200>.

- Wang, D., and S. J. Lippard. 2005. "Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs." *Nat Rev Drug Discov* 4, no. 4 (Apr): 307-20. <https://dx.doi.org/10.1038/nrd1691>.
- Wehbe, Mohamed, Ada W. Y. Leung, Michael J. Abrams, Chris Orvig, and Marcel B. Bally. 2017. "A Perspective – Can Copper Complexes Be Developed as a Novel Class of Therapeutics? " *Dalton Trans*.
- Yang, H., X. Chen, K. Li, H. Cheaito, Q. Yang, G. Wu, J. Liu, and Q. P. Dou. 2021. "Repurposing Old Drugs as New Inhibitors of the Ubiquitin-Proteasome Pathway for Cancer Treatment." *Semin Cancer Biol* 68 (Jan): 105-122. <https://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.013>.
- Yang, L., Y. Yuan, C. Fu, X. Xu, J. Zhou, S. Wang, L. Kong, Z. Li, Q. Guo, and L. Wei. 2016. "Lz-106, a Novel Analog of Enoxacin, Inducing Apoptosis Via Activation of Ros-Dependent Dna Damage Response in Nsclcs." *Free Radic Biol Med* 95 (06): 155-68. <https://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.007>.
- Zhang, F., Z. J. Bao, D. M. Shi, P. Xiang, L. Xiao, Y. Q. Huang, G. S. Zhang, and S. M. Yin. 2016. "Efficacy of a Quadruple Therapy Regimen for Helicobacter Pylori Eradication after Partial Gastrectomy." *Braz J Med Biol Res* 49, no. 2 (Feb): e5080. <https://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20155080>.
- Zhang, Z., H. Wang, M. Yan, and C. Zhang. 2017. "Novel Copper Complexes as Potential Proteasome Inhibitors for Cancer Treatment (Review)." *Mol Med Rep* 15, no. 1 (Jan): 3-11. <https://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.6022>.
- Zuo, X.L., et al., *Levels of selenium, zinc, copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia*. *Biol Trace Elem Res*, 2006. **114**(1-3): p. 41-53